**Занятие 9**

**Физиология микроорганизмов. Метаболизм. Питание микроорганизмов, питательные среды. Влияние физических и химических факторов намикробы. Стерилизация и дезинфекция.**

**Физиология микроорганизмов**

**Физиология** изучает все процессы жизнедеятельности микроорганизмов - их метаболизм, питание, дыхание, рост и размножение.

**Метаболизм** представляет собой совокупность противоположных процессов – катаболизма и анаболизма.

* ***Катаболизм (энергетический метаболизм*)** процесс расщепления крупных молекул на более мелкие при котором происходит высвобождение энергии. Высвобождаемая при этом энергия накапливается в виде макроэргических соединений молекулы АТФ и используется в процессе жизнедеятельности клетки.
* При ***анаболизме*** осуществляется синтез высокомолекулярных соединений, используемых для образования клеточных структур. Поэтому анаболизм нередко называют ***конструктивным метаболизмом.*** Процесс протекает с использованием энергии, высвободившейся в результате энергетического метаболизма.

**Энергетический метаболизм (биологическое окисление).** В зависимости от использования кислорода существует два типа биологического окисления:

* **Бродильный метаболизм (брожение)**
* **Окислительный метаболизм (дыхание)**

**Типы питания микроорганизмов.** Микроорганизмы различаются ***по типам питания*** в зависимости от усвояемых источников **углерода и азота.**

* В зависимости от источника углерода бактерии подразделяют на ***аутотрофы*** и ***гетеротрофы***.

**Аутотрофы.**

* ***Аутотрофы*** (от греч. *autos*- сам, *trophe* – питание) способны синтезировать все необходимые соединения из простых веществ. Используют в качестве источника углерода углекислый газ и или другие карбонаты.

К ним относятся большинство бактерий, обитающих в почве (нитрифицирующие, серобактерии и пр. Организмы, для которых источником энергии является свет называются ***фотоаутотрофами. Хемоаутотрофы*** в качестве источника энергии используют органические соединения.

**Гетеротрофы**

* ***Гетеротрофы*** (от греч. *hеtеros* - другой, *trophе* - питание) используют в качестве источника углерода органические соединения.

Источником углерода для них являются гексозы, многоатомные спирты и аминокислоты. Организмы, для которых источником энергии является свет называются ***фотогетеротрофами. Хемогетеротрофы*** в качестве источника энергии используют органические соединения

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **категория** | **источник энергии** | **источник****углерода** | **представитель** |
| **фотоаутотрофы** | Свет | CO2 | Цианобактерии, лишайники |
| **фотогетеротрофы** | Свет | Органические вещества  | Фотосинтезирующие бактерии |
| **хемоаутотрофы** | Органические вещества | CO2 | Серобактерии, железобактерии |
| **хемогетеротрофы** | Органические вещества | Органические вещества  | Простейшие, грибы,большинство бактерий  |

**Механизмы питания микроорганизмов.** Поступление питательных веществ внутрь микробной клетки осуществляется:

* **Пассивным переносом:**

- **простая диффузия (перенос веществ из области высокой концентрации в область низкой )**

 **- облегченная диффузия (с помощью белков переносчиков – *пермеаз и транслокация)***

* **Активным переносом:**

 ***-* Ионный транспорт** (**унипорт,** **симпорт,** **антипорт)**

 **- ATФ-зависимый перенос**

* **Транслокация радикалов (фосфотрансферный путь)**

**Питательные среды.** Культивирование микроорганизмов в условиях *in vitro* осуществляется на **питательных средах.** Для того чтобы микроорганизмы росли и развивались, питательные среды должны отвечать следующим требованиям:

* Оптимальный состав. В их состав должны входить все необходимые компоненты, которые нужны для развития микробов
* Изотоничность
* Оптимальный рН среды
* Стерильность (необходима для того, чтобы избегать конкурентной борьбы между микробами)
* Определенный окислительно-восстановительный потенциал
* Стандартизированный состав
* Соответствующая вязкость и прозрачность (для лучшего изучения характера микробных колоний)
* Проста в приготовлении и экономически выгодна

**Классификация питательных сред.** В современной классификации учитываются ***физико-химические свойства, состав и назначение*** питательных сред. По составу компонентов различают ***естественные (натуральные) и синтетические*** питательные среды.

В зависимости от консистенции питательные среды могут быть ***жидкими, полужидкими и плотными.***

* К жидким питательным средам относятся мясо-пептонный бульон (МПБ), пептонная вода и др.
* Для создания полужидких и плотных питательных сред к ним добавляют агар или желатин.

По составу различают простые и сложные питательные среды

* ***К простым средам относятся –*** мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар, пептонная вода и пр.
* При добавлении к простым средам крови, сыворотки, углеводов получают  ***сложные питательные среды,*** например: кровяной агар, сахарный и сывороточный бульоны.

В зависимости от цели применения различают:

* ***Основные (универсальные) питательные среды*** применяют для культивирования большинства неприхотливых микроорганизмов. К этим средам можно отнести МПА, МПБ, пептонную воду.
* ***Специальные питательные среды*** позволяют культивировать микроорганизмы, не размножающиеся на обычных питательных средах. Н-р, для культивирования менингококков и пневмококков не растущих на обычных средах, применяют кровяные и сывороточные среды. К специальным средам относятся ***среды обогащения.*** Эти среды содержат компоненты (факторы роста), стимулирующие рост соответствующих микроорганизмов, н-р,среда содержащая селенит натрия стимулирует рост сальмонелл
* ***Элективные питательные среды*** используют для культивирования определенного вида микроорганизмов. Н-р, щелочной агар служит для выделения холерного вибриона, в таких условиях ингибируется рост других бактерий; среда с высоким содержанием соли (ЖСА) стимулирует рост стафилококков. Жидкие элективные среды также можно использовать в качестве сред *обогащения* и *накопления*. При применении таких сред облегчается процесс получения культуры надлежащих микробов из патологического материала. Н-р, для выделения шигелл из испражнений больного дизентерией целесообразно в начале провести инокуляцию материала на селенитовый бульон.
* ***Дифференциально-диагностические среды*** позволяют дифференцировать различные микроорганизмы, н-р, на основании их ферментативной активности, и облегчают их идентификацию. К таким средам относятся среда Эндо, Гисса, Клиглера и др.
* ***Комбинированные питательные среды*** сочетают в себе элективную среду, и дифференциальную среду. Примером таких сред является среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые для выделения патогенных кишечных бактерий. Обе среды ингибируют рост кишечной палочки
* ***Консервирующие транспортные среды*** (глицериновая смесь, фосфатный буфер, тиогликолевая среда для анаэробов и др.) применяются для первичной инокуляции и транспортировки патологического материала. Эти среды предупреждают отмирание патогенных микробов и подавляют рост сапрофитов.

**Влияние факторов окружающей среды на микроорганизмы**

Факторы окружающей среды оказывают влияние на жизнедеятельность, рост, размножение и гибель микроорганизмов. Факторы, влияющие на микроорганизмы, подразделяются на ***физические, химические и биологические*.** Действие этих факторов может быть различным в зависимости от их природы и особенностей микроорганизмов. Н-р, влияние может быть губительным или благоприятным для роста микробов.

**Влияние физических факторов на микроорганизмы**

**Температура**. По отношению к температуре все микроорганизмы делятся на три группы:

* ***Психрофильные*** (от греч. *psychros*- холод, *philеo*- люблю) ***микроорганизмы***-минимальная t– 00C, оптимальная– 6-200C, максимальная– 300C
* ***Мезофильные*** (от греч. *mеsos*- средний) ***микроорганизмы***- минимальная t– 100C, оптимальная– 34-370C, максимальная– 450C
* ***Термофильные*** (от греч. *termos* - тепло, жар) или теплолюбивые микроорганизмы развиваются при температуре выше 55° С - минимальная t – 300C, оптимальная– 50-600C, максимальная– 70-750C

**Высушивание** приводит к обезвоживанию цитоплазмы, нарушению целостности цитоплазматической мембраны, вследствие чего нарушается питание микробных клеток и наступает их гибель. К примеру, патогенные нейссерии (менингококки, гонококки), лептоспиры, бледная трепонема и др. погибают при высушивании через несколько минут. Холерный вибрион выдерживает высушивание 2 сут, сальмонеллы тифа - 2 мес, а микобактерии туберкулеза – до 3 мес. Для хранения культур микроорганизмов, вакцин и других биологических препаратов широко применяют метод **лиофильной сушки.** Сущность метода состоит в том, что предварительно микроорганизмы или препараты подвергают замораживанию, а затем их высушивают в условиях вакуума. При этом микробные клетки переходят в состояние анабиоза и сохраняют свои биологические свойства в течение нескольких месяцев или лет.

**Лучевая энергия**. В природе микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию ***солнечной радиации.*** Прямые солнечные лучи вызывают гибель многих микроорганизмов в течение нескольких часов. Губительное действие солнечного света обусловлено активностью ***ультрафиолетовых лучей (УФ-лучи)*** с длиной волны 254-300 нм. Они инактивируют ферменты клетки и повреждают ДНК. Патогенные бактерии более чувствительны к действию УФ-лучей, чем сапрофиты.

Другие виды лучистой энергии **- *рентгеновские лучи, α-, β-, γ-лучи*** оказывают губительное действие на микроорганизмы только в больших дозах, порядка 440-280 Дж/кг. Гибель микробов обусловлена разрушением ядерных структур и клеточной ДНК. Малые дозы излучений стимулируют рост микробных клеток.

Бактерицидное действие ***ионизирующего излучения*** используется для консервирования некоторых пищевых продуктов, ***стерилизации*** биологических препаратов (сывороток, вакцин и др.)

**Ультразвук** этозвуковые волны частотой выше 20 000 Герц. Одним из основных эффектов влияния ультразвука на микроорганизмы является ***эффект кавитации*** (от лат. *cavitum* - полость). **Ультразвук** вызывает значительное поражение микробной клетки. Под действием ультразвука газы, находящиеся в жидкой среде цитоплазмы, активируются, внутри клетки возникает высокое давление (до 10000 атм.) и образуются кавитационные полости. Это приводит к разрыву клеточной оболочки и гибели клетки.

Ультразвук используют для стерилизации пищевых продуктов (молока, фруктовых соков), питьевой воды.

**Высокое давление**. Высокое атмосферное давление не губительно для большинства микроорганизмов. В природе встречаются даже бактерии, живущие в морях и океанах на глубине 1000-10000 м под давлением от 100 до 900 атм. Некоторые виды бактерий выдерживают давление до 3000-5000 атм, а бактериальные споры - даже 20000 атм. Примечательно, что воздействие ***насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного*** приводит к гибели как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов. Этот способ **стерилизации** **паром под давлением** производят в автоклаве

**Дезинфектанты и антисептики**

* ***Поверхностно-активные вещества*** -жирные кислоты, мыла и прочие детергенты ( декамин, хлоргексидин и пр.)
* ***Фенол, крезол и их производные*** (трикрезол, фенол-резорцин, фенилсалицилат)
* ***Окислители*** (перекись водорода, перманганат калия, и др)
* ***Галогены –*** препараты йода (спиртовый раствор йода, раствор Люголя, йодоформ, йодинол), препараты хлора (хлорная известь, хлорамин, пантоцид)
* ***Спирты*** (этиловый и пр.)
* ***Кислоты, и их соли*** (борная, салициловая, бензойная, уксусная кислоты) и ***щелочи*** (соли аммония, квасцы);
* ***Альдегиды*** (формальдегид - применяют в виде 40% раствора (формалин), гексаметилентетрамин– уротропин, глутаральдегид и пр.)
* ***Соли тяжелых металлов*** (ртуть, свинец, цинк, золото и др.)
* ***Красители*** (бриллиантовый зеленый, риванол, этакридина лактат , метиленовый синий и др.)

**Дезинфекция** (обеззараживание) — это уничтожение патогенных микроорганизмов в различных объектах окружающей среды. Химические вещества, используемые для уничтожения микроорганизмов, называются ***дезинфицирующими.***

* Вещества, характеризующиеся выраженным антимикробным эффектом, но не обладающие токсичностью для макроорганизма, называются ***антисептическими средствами*** и применяются для гибели или подавления роста микробов, контактирующих с поверхностью кожи, слизистых оболочек и ран.

**Антисептика** - комплекс мер, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране, целом организме или на объектах внешней среды, с применением различных обеззараживающих химических веществ.Антисептика включает комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов в патологическом очаге, ране или другом объекте.

**Асептика** –комплекс профилактических мероприятий, препятствующих микробному загрязнению различных объектов (раны, операционного поля, кожи и слизистых и т. д.).

Стерилизацию белья и перевязочных материалов проводят в автоклавах, для контроля стерилизации в пробирку набирают бензоловую кислоту и пирамидон или резорцин, и если в конце стерилизации эти вещества расплавляются и превращаются в массу, это означает что стерилизация проведена должным образом.

Стерилизацию хирургических инструментов проводят в специальных стерилизаторах, но прежде их промывают механическим способом, затем помещают в емкость с кипящей водой, добавляют 1-2% раствор соды, кипятят 20-30 мин. С целью профилактики воздушно-капельных инфекций, лица входящие в операционную должны надевать маски и бахиллы. Разговоры строго запрещены. Целесообразно применение бактерицидных ламп

**Антисептика. *Антисептика*** – это система мер, способствующая уменьшению и уничтожению микробов в ране. Различают механическую, физическую, химическую, биологическую антисептику.

* ***Механическая антисептика*** — первичная хирургическая обработка инфицированной раны, т. е. удаление омертвевших и нежизнеспособных тканей с краев и со дна раны.
* ***Физическая антисептика*** – проводится с помощью гигроскопичных ватных тампонов, высушивающих тампонов, присыпок, дренажа и пр. с целью предотвращения размножения микробов и накопления токсических веществ в ране
* ***Химическая антисептика*** – использование химических веществ, создающих неблагоприятные условия для микробов, останавливающие рост, развитие или вызывающие их гибель. Наиболее часто используемые:
* Нитрат серебра 1:500-1:3000 для промывания, 1% раствор бриллиантового зеленого - для обработки ран, 1% йод, йодинол - для промывания ран, операционного поля, для мытья рук, 2-5% раствор карболовой кислоты - для мытья перчаток и инструментов, формалин (40 %), фурациллин (1:5000), хлорамин (0,5-2%) и др.
* ***Биологическая антисептика*** – использование инъекций (в/в, в/м, в различные полости), ингаляций, а также путем введения антибиотиков на поверхность или внутрь раны

**Стерилизация**

* **Стерилизация** – это полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор
* Стерилизацию производят различными способами:
* ***физическими*** (воздействие высокой температуры, УФ-лучей);
* ***химическими*** (использование различных дезинфектантов, антисептиков и антибиотиков);
* ***механическими*** (использование бактериальных фильтров)

**Стерилизация физическими методами (тепловая стерилизация )**

* ***Стерилизация кипячением и прокаливание*** можно считать самыми простыми и доступными методами тепловой стерилизации. Для тепловой стерилизации применяют в основном ***сухой жар и пар под давлением.*** ***Стерилизацию сухим жаром*** или горячим воздухом осуществляют в печах Пастера (сушильных сухожаровых шкафах) при 165-1700C в течение 1 часа. Метод позволяет уничтожать не только вегетативные клетки, но и споры микроорганизмов. **Стерилизацию паром под давлением** производят в ***паровых стерилизаторах*** (автоклавах), способ основан на воздействии на стерилизуемые материалы насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного. При рабочем режиме в 2 атм. при 1210C в течение 30 мин. погибают как вегетативные, так и споровые формы микроорганизмов. ***Пастеризацию*** условно можно считать стерилизацией. В результате часовой экспозиции при 650-700C уничтожаются вегетативные формы микроорганизмов в пищевых продуктах (молоко, соки, вино, пиво и др.)

**Физическая стерилизация (лучевая стерилизация).** Используется для стерилизации термолабильных материалов.

* Применение *УФ-излучения* длястерилизации ограничено его низкой проницаемостью и высокой поглотительной активностью воды и стекла
* *Рентгеновское и гамма излучение.* Работа с ними требует строго соблюдения правил безопасности. Применяют для стерилизации бактериологических препаратов (сывороток, вакцин и пр.) одноразовых шприцев, чашек Петри, шовных материалов и пр.
* *Микроволновое излучение.* Основано на эффекте быстрого повышения температуры, применяют для повторной стерилизации длительно хранящихся сред.

**Механическая стерилизация.** *Стерилизацию через бактериальные фильтры* применяют в тех случаях, когда стерилизуемые предметы изменяются при нагревании. В микробиологической *практике используют асбестовые фильтры Зейтца, мембранные фильтры* из нитроцеллюлозы,изготовленные из каолина с примесью песка и кварца *фильтры (свечи) Шамберлана и фильтры* из инфузорной земли *Беркефельда*.Методом фильтрования стерилизуют питательные среды, содержащие белок, сыворотки, некоторые антибиотики, а также отделяют бактерии от вирусов, фагов и экзотоксинов

**Химическая стерилизация.** *Химическая стерилизация* проводится с применением губительных для микроорганизмов антимикробных препаратов- дезинфектантов и антисептиков, а также антибиотиков с избирательным действием и синтетических противомикробных препаратов**.** С этой целью также используют токсичные газы, н-р, оксид этилена.

**Контроль за качеством стерилизации.** Химический контроль – используются вещества с известной температурой плавления (сера - 1190 C, бензойная кислота – 120-1220 C, бензонафтол - 1100 C, манноза и карбамид- 132-1330 C) и индикаторные бумажки температурного режима. Оценка контроля осуществляется на основании изменений происходящих с указанными веществами, которые помещают в автоклав вместе со стерилизуемым материалом.

Биологический контроль – проводится с применением биотестов (бумажные полоски с нанесенными на поверхность споровыми бактериями устойчивыми к температуре). Оценка контроля осуществляется на основании гибели споровых бактерий на поверхности бумажек, которые помещают в автоклав вместе со стерилизуемым материалом.