

Занятие 5

Физиология микроорганизмов. Метаболизм микробов, их питание. Питательные среды.
Влияние физических и химических факторов на микробы. Стерилизация и дезинфекция.
Дыхание и размножение микроорганизмов.

План занятия:

1. Физиология микроорганизмов.
2. Химический состав микроорганизмов.
3. Метаболизм бактерий: анаболизм и катаболизм.
4. Питание бактерий, типы питания: источники углерода, энергии, электронов, азота, факторы роста, сапрофиты, паразиты.
5. Механизмы питания: пассивный (простая и облегченная диффузия), активный транспорт, транслокация радикалов
6. Питательные среды: классификация по составу, консистенции, назначению.
7. Влияние физических факторов на микроорганизмы: температура, высушивание, лучевая энергия (световые, ультрафиолетовые, радиоактивные лучи), ультразвук, давление.
8. Влияние химических факторов на микроорганизмы.
9. Основные группы дезинфицирующих средств, используемых в микробиологической практике (поверхностно-активные вещества, фенол, окислители, галогены, соли тяжелых металлов, кислоты, щелочи, спирты, красители и пр.).
10. Понятие о стерилизации и дезинфекции.
11. Методы стерилизации: физические, химические и механические.
12. Понятие об асептике и антисептике.
13. Дыхание бактерий: бродильный и окислительный катаболизм.
14. Виды микробов по типам дыхания: облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы, облигатные анаэробы, аэротолерантные анаэробы, капнофилы.
15. Особенности размножения прокариот (бактерий, спирохет, актиномицетов, микоплазм)
16. Фазы размножения бактерий в питательной среде.
17. Размножение эукариот (грибов и простейших).

Физиология бактерий

Физиология бактерий изучает жизнедеятельность, метаболизм, питание, энергию роста и размножение бактерий, а также их взаимодействие с окружающей средой. Метаболизм бактерий лежит в основе изучения и разработки методов их культивирования, получения чистых культур и их идентификации. Выяснение физиологии патогенных и условно-патогенных бактерий важно для анализа патогенеза вызываемых ими инфекционных болезней, для микробиологической диагностики, проведения лечения и профилактики инфекционных заболеваний, регуляции взаимоотношения человека с окружающей средой, а также для использования бактерий в биотехнологических процессах в целях получения биологически активных веществ.

Химический состав бактериальной клетки. Бактериальная клетка на 80–90% состоит из воды, и только 10% приходится на долю сухого вещества. Вода в клетке находится в свободном или связанном состоянии. Она выполняет механическую роль в обеспечении тургора, участвует в гидролитических реакциях. Удаление воды из клетки путем высушивания приводит к приостановке процессов метаболизма, прекращению размножения.

Состав сухого вещества распределен следующим образом: 52% составляют белки, 17% — углеводы, 9% — липиды, 16% — РНК, 3% — ДНК и 3% — минеральные вещества.

Белки являются ферментами, а также составной частью клетки, входят в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки служат антигенами и токсинами

бактерий. В состав бактерий входят отсутствующие у человека D-аминокислоты, а также диаминопимелиновая кислота.

Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди-, олигосахаров и полисахаридов, а также входят в состав комплексных соединений с белками, липидами и другими соединениями. Полисахариды находятся в составе некоторых капсул, клеточной стенки; крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами. Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов.

Липиды или жиры входят в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат запасными веществами, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены. У некоторых бактерий в клетке находятся воски, эфиры миколовой кислоты. Микоплазмы — единственные представители прокариот, имеющие в составе цитоплазматической мембраны стеролы.

Нуклеиновые кислоты. В бактериальной клетке присутствуют все типы РНК: иРНК, тРНК, рРНК. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, моносахаров, органических кислот.

ДНК выполняет в бактериальной клетке наследственную функцию. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара дезоксирибозы и фосфатной группы. Азотистые основания представлены пуринами (аденин, гуанин) и пиримидинами (тимин, цитозин). Нуклеотиды соединяются в полинуклеотидную цепочку посредством фосфодиэфирных связей между 5'-концом одного нуклеотида и 3'-концом другого. Сцепление между двумя цепями обеспечивается водородными связями между комплементарными азотистыми основаниями: аденина с тимином, гуанина с цитозином. Нуклеотидные цепи антипараллельны: на каждом из концов линейной молекулы ДНК расположен 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи. Процентное содержание количества гуанин/цитозин (ГЦ)-пар в ДНК определяет степень родства между бактериями и используется при определении таксономического положения бактерий. Минеральные вещества обнаруживаются в золе, полученной после сжигания клеток. В большом количестве представлены N, S, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, а также микроэлементы Zn, Cu, Co, Ba.

Азот входит в состав белков, нуклеотидов, коферментов. Сера входит в виде сульфгидрильных групп в структуру белков. Фосфор в виде фосфатов представлен в нуклеиновых кислотах, АТФ, коферментах. В качестве активаторов ферментов используются ионы Mg, Fe, Mn. Ионы K и Mg необходимы для активации рибосом. У многих бактерий имеются сидерохромы, которые обеспечивают транспортировку ионов Fe внутрь клетки в виде растворимых комплексных соединений.

Катаболизм 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.

Классификация бактерий по типам питания и способам получения энергии. Поскольку основными компонентами бактерий являются органические соединения, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды, остов которых построен из атомов углерода, то для их роста требуется постоянный приток атомов углерода.

В зависимости от источника усвояемого углерода бактерии подразделяют на:

аутоотрофы, использующие для построения своих клеток неорганический углерод в виде CO_2 ;

гетеротрофы, использующие органический углерод, легкоусвояемыми источниками которого являются гексозы, многоатомные спирты и аминокислоты.

Белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты — крупные полимерные молекулы, которые синтезируются из мономеров в реакциях поликонденсации, протекающих с поглощением энергии. Энергия запасается бактериальной клеткой в форме молекул АТФ.

Организмы, для которых источником энергии является свет, называются фототрофами. Те организмы, которые получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций, называются хемотрофами.

Среди хемотрофов выделяют литотрофы (от греч. lithos — камень), способные использовать неорганические доноры электронов (H_2 , NH_3 , H_2S , Fe^{2+} и др.), и органотрофы, которые используют в качестве доноров электронов органические соединения.

Бактерии, изучаемые медицинской микробиологией, являются гетерохемо- органотрофами. Отличительная особенность этой группы в том, что углерод у них служит источником энергии. Степень гетеротрофности у различных бактерий неодинакова. Среди них выделяют сапрофиты, питающиеся мертвым органическим материалом и независимы от других организмов; паразиты — гетеротрофные микроорганизмы, зависимые в получении питательных веществ от макроорганизма. Различают облигатные и факультативные паразиты. Облигатные паразиты полностью лишены возможности жить вне клеток. К ним относятся представители родов *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia* и *Chlamydia*, размножающиеся только внутри клеток макроорганизма. Факультативные паразиты могут жить и без хозяина и размножаться, так же как и сапрофиты, на питательных средах *in vitro*, т.е. вне организма.

Транспорт веществ в бактериальную клетку

Для того чтобы питательные вещества могли подвергнуться превращениям в цитоплазме клетки, они должны проникнуть в клетку через пограничные слои, отделяющие клетку от окружающей среды. Ответственность за поступление в клетку питательных веществ лежит на цитоплазматической мембране.

Существует два типа переноса веществ в бактериальную клетку: пассивный и активный.

При пассивном переносе вещество проникает в клетку только по градиенту концентрации. Затрат энергии при этом не происходит. Различают две разновидности пассивного переноса: простую и облегченную диффузию. Простая диффузия — неспецифическое проникновение веществ в клетку, при этом решающее значение имеет величина молекул и липофильность. Облегченная диффузия протекает с участием белка-переносчика. Скорость этого способа переноса зависит от концентрации вещества в наружном слое.

При активном переносе вещество проникает в клетку против градиента концентрации при помощи белка-переносчика — пермеазы. При этом происходят затраты энергии. Имеется два типа активного транспорта. При первом небольшие молекулы (аминокислоты, некоторые сахара) «накачиваются» в клетку и создают концентрацию, которая может в 100–1000 раз превышать концентрацию этого вещества снаружи клетки. Второй тип, получивший название транслокация радикалов, обеспечивает включение в клетку некоторых сахаров (например, глюкозы, фруктозы), которые в процессе переноса фосфорилируются, т.е. химически модифицируются. Для осуществления этих процессов в бактериальной клетке локализуется специальная фосфотрансферная система.

Поступив в клетку, органический источник углерода и энергии вступает в цепь биохимических реакций, в результате которых образуются АТФ и ингредиенты для биосинтетических процессов. Биосинтетические (конструктивные) и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. Они тесно связаны между собой через общие промежуточные продукты, которые называются **амфиболитами**.

Культивирование бактерий в системах *in vitro* осуществляется на питательных средах.

Искусственные питательные среды должны отвечать следующим требованиям.

1. Питательная среда должна содержать воду, так как все процессы жизнедеятельности бактерий протекают в воде.

2. В среде должен содержаться органический источник углерода и энергии (углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды). Часто используется пептон — продукт неполного гидролиза белков, состоящий из поли-, олиго- и дипептидов.

3. Для синтеза белков, нуклеотидов, АТФ и коферментов бактериям требуются источники азота, серы, фосфаты и другие минеральные вещества, в том числе микроэлементы. Источником азота могут служить пептон и соли аммония. Сера и фосфор бактерии способны утилизировать в виде неорганических солей: сульфатов и фосфатов. Для нормального функционирования ферментов бактериям требуются ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} .

4. Решающее значение для роста микроорганизмов имеет pH среды. С этой целью питательную среду забуферивают, чаще всего используя фосфатный буфер.

5. Большинство бактерий способны расти на изотоничных средах, что достигается добавлением NaCl в концентрации 0,87%. Бактерии, не способные расти на средах с концентрацией соли ниже 1%, называются галофильными.

При необходимости к питательной среде добавляют факторы роста, ингибиторы роста определенных бактерий, субстраты для действия ферментов, индикаторы.

6. Питательные среды должны быть стерильными.

В зависимости от консистенции питательные среды могут быть жидкими, полужидкими и плотными. Плотность среды достигается добавлением агара.

Агар добавляют в концентрации 0,5% — для полужидких сред и 1,5–2% — для создания плотных сред.

Различают простые, сложные, элективные, минимальные, дифференциально-диагностические и комбинированные среды. К **простым средам** относятся пептонная вода, питательный бульон, мясопептонный агар. На основе этих простых сред готовят сложные, например сахарный и сывороточный бульоны, кровяной агар.

Под **элективными** понимают среды, на которых лучше растет какой-то определенный микроорганизм. Например, щелочной агар, имеющий pH 9, служит для выделения холерного вибриона. Другие бактерии, в частности кишечная палочка, из-за высокого pH на этой среде не растут. **Среды обогащения** стимулируют рост какого-то определенного микроорганизма, ингибируя рост других. Например, среда, содержащая селенит натрия, стимулирует рост бактерий рода *Salmonella*, ингибируя рост кишечной палочки.

Дифференциально-диагностические среды служат для изучения ферментативной активности бактерий. Примером служат среды Гисса, используемые для изучения способности бактерий ферментировать сахара.

Комбинированные питательные среды сочетают в себе элективную среду, подавляющую рост сопутствующей флоры, и дифференциальную среду, диагностирующую ферментативную активность выделяемого микроба. Примером служат среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые при выделении патогенных кишечных бактерий. Обе эти среды ингибируют рост кишечной палочки.

Физические, химические и биологические факторы окружающей среды оказывают различное воздействие на микроорганизмы: бактерицидное — приводящее к гибели клетки; бактериостатическое — подавляющее размножение микроорганизмов; мутагенное — изменяющее наследственные свойства микробов.

Влияние температуры. Представители различных групп микроорганизмов развиваются в определенных диапазонах температур.

Психрофилы растут при температуре от -10 до 37°C . К психрофилам относится большая группа сапрофитов — обитателей почвы, морей, пресных водоемов и сточных вод (железобактерии, псевдомонады, светящиеся бактерии, бациллы). Некоторые психрофилы могут вызывать порчу продуктов питания на холоде. Способностью расти при низких

температурах обладают и некоторые патогенные бактерии (возбудитель псевдотуберкулеза и чумы). В зависимости от температуры культивирования свойства бактерий меняются.

Мезофилы растут в диапазоне температур от 10 до 47°C, оптимум роста около 37°C. Они включают в себя основную группу патогенных и условно-патогенных бактерий.

Термофилы существуют при более высоких температурах (от 40 до 90°C). На дне океана в горячих сульфидных водах живут бактерии, развивающиеся при температуре 250–300°C и давлении 265 атм. Термофилы обитают в горячих источниках, участвуют в процессах самонагрева навоза, зерна, сена.

Температурный фактор учитывается при осуществлении стерилизации. Вегетативные формы бактерий погибают при температуре 60°C в течение 20–30 мин, споры — в автоклаве при 120°C в условиях пара под давлением.

Микроорганизмы хорошо переносят действие низких температур. Поэтому их можно долго хранить в замороженном состоянии, в том числе при температуре жидкого азота (–173°C).

Обезвоживание вызывает нарушение функций большинства микроорганизмов. Наиболее чувствительны к высушиванию возбудители гонореи, менингита, холеры, брюшного тифа, дизентерии и другие патогенные микроорганизмы. Более устойчивы микроорганизмы, защищенные слизью мокроты. Так, бактерии туберкулеза в мокроте выдерживают высушивание до 90 дней. Устойчивы к высушиванию некоторые капсуло- и слизееобразующие бактерии. Особой устойчивостью обладают споры бактерий.

Для продления жизнеспособности при консервировании микроорганизмов используют лиофилизацию — высушивание под вакуумом из замороженного состояния. Лيوфилизированные культуры микроорганизмов и иммунобиологические препараты длительно (в течение нескольких лет) сохраняются, не изменяя своих первоначальных свойств.

Ионизирующее излучение применяют для стерилизации одноразовой пластиковой микробиологической посуды, питательных сред, перевязочных материалов, лекарственных препаратов и др.

Неионизирующее излучение — ультрафиолетовые и инфракрасные лучи солнечного света, а также ионизирующее излучение — γ -излучение радиоактивных веществ и электроны высоких энергий губительно действуют на микроорганизмы уже через короткий промежуток времени.

Ультрафиолетовые (УФ) лучи, достигающие поверхности земли, имеют длину волны 290 нм. УФ-лучи применяют для обеззараживания воздуха и различных предметов в больницах, родильных домах, микробиологических лабораториях. С этой целью используют бактерицидные лампы ультрафиолетового излучения с длиной волны 200–400 нм.

Химические вещества могут оказывать различное действие на микроорганизмы: служить источниками питания; не оказывать какого-либо влияния; стимулировать или подавлять рост, вызывать гибель. Антимикробные химические вещества используются в качестве антисептических и дезинфицирующих средств, так как обладают бактерицидным, вирулицидным, фунгицидным действием и т.д.

Основные группы химических веществ используемых в качестве дезинфектантов и антисептиков в микробиологической практике.

ПАВ -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, йодиол), препараты хлора (хлорная известь, хлорамин, пантоцид)

Спирты (этиловый и пр.)

Кислоты, и их соли (борная, салициловая) и щелочи (соли аммония, квасцы);

Альдегиды (формальдегид - применяют в виде 40% раствора (формалин), гексаметиленetetрамин– уротропин, глутаральдегид и пр.)

Соли тяжелых металлов (ртуть, свинец, цинк, золото и др.)

Красители (бриллиантовый зеленый, этакридина лактат, метиленовый синий и др.) Уничтожение микробов в окружающей среде, на различных предметах и в материалах, осуществляют с помощью стерилизации и дезинфекции.

Стерилизация

Стерилизация — полное уничтожение микробов или полное их удаление (элиминация) из объекта. Различают тепловую, химическую, лучевую стерилизацию и стерилизацию фильтрованием.

Тепловая стерилизация основана на чувствительности микробов к высокой температуре. При 60°C вегетативные формы микробов погибают, а споры, содержащие воду в связанном состоянии и обладающие плотными оболочками, инактивируются при 160–170°C. Для тепловой стерилизации применяют в основном сухой жар и пар под давлением.

Стерилизацию сухим жаром производят в воздушных стерилизаторах (сухожаровых шкафах, или печах Пастера) при 180°C — 60 мин; 160°C — 150 мин. Сухим жаром стерилизуют лабораторную посуду, инструменты, силиконовую резину и другие объекты, которые не теряют своих качеств при высокой температуре.

Стерилизацию паром проводят в паровых стерилизаторах (автоклавах) под давлением (121°C, 15 мин; 134°C, 3–5 мин). Повышенное атмосферное давление приводит к увеличению температуры кипения. Под действием высокой температуры и пара споры погибают уже при 121°C в течение 15–20 мин. В паровом стерилизаторе стерилизуют перевязочный материал, металлические инструменты, питательные среды, растворы, инфекционный материал, белье и т.д.

Дробная стерилизация (тиндализация) проводится нагреванием объектов при 70–80°C в течение 30–60 мин для уничтожения вегетативных форм микробов. Метод применяют для обработки материалов, не выдерживающих температуру выше 100°C, например питательных сред с углеводами.

Химическая стерилизация основана на использовании токсичных газов: оксида этилена, смеси ОБ (смеси оксида этилена и бромистого метила) и формальдегида. Эти вещества являются алкилирующими агентами, инактивирующими активные группы в ферментах, других белках, а также нуклеиновые кислоты, что приводит к гибели микроорганизмов.

Стерилизация осуществляется паром при температуре от 20 до 60°C в специальных камерах. В больницах используют формальдегид, в промышленных условиях оксид этилена и смесь ОБ. Химическую стерилизацию используют для объектов, которые могут быть повреждены нагреванием (оптические приборы, электронная аппаратура).

Для стерилизации изделий из термолабильных материалов, снабженных оптическими устройствами, например эндоскопов, применяют обезвреживание с помощью химических растворов (стериллянтов). Стерилизованные объекты хранят не более 3 суток. Формальдегид (НСНО) — основной альдегид, используемый в специальной аппаратуре для стерилизации. Другой альдегид — глутаральдегид.

Лучевая стерилизация позволяет обрабатывать сразу большое количество предметов (например, одноразовых шприцев, инструментов, систем для переливания крови и т.д.). Она основана на использовании γ -излучения (источник — радиоактивные изотопы) или ускоренных электронов. Гибель микробов под действием γ -лучей и ускоренных электронов происходит в результате повреждения нуклеиновых кислот.

Стерилизация фильтрованием осуществляется с помощью различных фильтров (нитроцеллюлозных, керамических, асбестовых, стеклянных). Она позволяет освободить жидкости (питательные среды, сыворотку крови, лекарства) от микробов. Лучшими из всех известных типов являются мембранные фильтры.

В настоящее время все более широкое применение находят современные методы стерилизации, созданные на основе новых технологий, с использованием ионизированной плазмы, озона и др.

Контроль стерилизации проводится: микробиологическим методом

по изменению окраски химических индикаторов;
с помощью биотестов (из термоустойчивых штаммов спорообразующих бацилл)
путем технического контроля аппаратуры соответствующей службой.

Асептика и антисептика

Асептика — предотвращение контаминации (загрязнения) объектов или ран микробами. Асептика направлена на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, органы больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Асептика предусматривает меры защиты от микробов путем сохранения стерильности перевязочного материала, операционного белья, перчаток, инструментов, материала для обработки раны, а также дезинфекцию рук врача, операционного поля, аппаратуры, операционной и других помещений, применение масок и специальной одежды.

Антисептика — мероприятия, направленные на уничтожение микробов в патологическом очаге, ране или в другом объекте. Антисептика включает различные методы: механические (удаление инфицированных некротизированных тканей, инородных тел и т.д.); физические (дренирование ран, введение тампонов, наложение гигроскопических повязок); биологические (применение ферментов для лизиса нежизнеспособных клеток, бактериофагов и антибиотиков); химические, основанные на применении антимикробных веществ — антисептиков. По химическому составу различают следующие антисептики: галогены — препараты йода (спиртовой раствор йода, раствор Люголя, йодоформ), хлора (хлорамины, хлориты); окислители (перекись водорода, калия перманганат, обладающие, как и галогены, окислительными свойствами); кислоты и их соли (уксусная, борная, салициловая, тетраборат натрия), щелочи (аммиак и его соли, бура); спирты (этанол и др.); альдегиды (формальдегид, гексаметилен-тетрамин); детергенты (декамин, хлоргексидин.); производные 8-оксихинолина (хинозол, интестопан, нитроксолин), 4-хинолона (оксолиновая кислота), хиноксалина (хиноксидин, диоксидин); производные нитрофурана (фурацилин, фурагин); производные фенолов (резорцин, трикрезол, фенол-резорцин.), дегги (деготь березовый, ихтиол и др.); красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий.); соединения тяжелых металлов (дихлорид и оксицианид ртути, нитрат серебра, колларгол, протаргол, сульфат цинка, сульфат меди, окись цинка).

Для предотвращения роста микроорганизмов в лекарственных средствах применяют консерванты: альдегиды; гуанидина производные; кислоты неорганические и их соли; кислоты органические и их натриевые соли; ртути органические соединения.

В зависимости от способа получения энергии у бактерий имеется несколько типов метаболизма: окислительный, или дыхание; бродильный, или ферментативный; смешанный. Тип метаболизма определяет не только реакции, в результате которых образуется АТФ, но также конечные продукты этих реакций, которые используются при идентификации бактерий, и условия культивирования бактерий.

При использовании в качестве источника углерода и энергии глюкозы или других гексоз начальные этапы окисления глюкозы общие как при окислительном, так и при бродильном метаболизме. К ним относятся пути превращения глюкозы в пируват (при использовании в качестве источника энергии отличных от глюкозы гексоз, или дисахаридов, они в результате химических превращений вступают в цепь реакций, превращающих глюкозу в пируват).

Окислительный метаболизм. Бактерии, обладающие окислительным метаболизмом, энергию получают путем дыхания. Дыхание — процесс получения энергии в реакциях окисления-восстановления, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования, при котором донорами электронов могут быть органические (у органотрофов) и неорганические (у литотрофов) соединения, а акцептором — только неорганические соединения.

У бактерий, обладающих окислительным метаболизмом, акцептором электронов, или водорода (H^+), служит молекулярный кислород. В этом случае пируват полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот до CO_2 . Цикл трикарбоновых кислот выполняет функцию поставщика атомов водорода, который в форме восстановленного НАД

переносится на молекулярный кислород через ряд переносчиков, обладающих сложной структурно оформленной мультиферментной системой — дыхательной цепью. Дыхательная цепь у бактерий локализована в цитоплазматической мембране и во внутриклеточных мембранных структурах.

Переносчики, осуществляющие транспорт электронов (водорода) на молекулярный кислород, относятся к четырем классам дегидрогеназ, коферментами которых являются НАД, флавопротеины, хиноны и цитохромы. Электроны передвигаются от одного носителя к другому в направлении увеличивающегося окислительно-восстановительного потенциала. Конечным этапом переноса электронов (протонов) по дыхательной цепи служит восстановление цитохромов $a + a_3$ (цитохромоксидазы). Цитохромоксидаза — конечная оксидаза, передающая электроны на кислород. В процессе переноса электронов по цитохромам меняется валентность входящего в состав железопорфирированной группы железа.

Отношение бактерий к кислороду

В клетках кислород находится в связанном состоянии в составе воды и органических соединений. В атмосфере он присутствует в свободном состоянии в виде молекулярной формы, объемная доля которой составляет 21%. По отношению к кислороду, а также по использованию его в процессах получения энергии микроорганизмы подразделяются на три группы: облигатные аэробы, облигатные анаэробы, факультативные анаэробы.

Облигатные аэробы растут и размножаются только в кислородной среде, используя его для получения энергии путем кислородного дыхания.

Энергию они получают оксидативным метаболизмом, используя кислород как терминальный акцептор электронов в реакции, катализируемой цитохромоксидазой. Облигатные аэробы подразделяются на строгие аэробы, которые растут при парциальном давлении атмосферы воздуха, и микроаэрофилы, которые, используя кислород в процессах получения энергии, растут при его пониженном парциальном давлении.

У микроаэрофилов имеются ферменты, которые инактивируются при контакте с сильными окислителями и активны только при низких значениях парциального давления кислорода, например фермент гидрогеназа.

Облигатные анаэробы не используют кислород для получения энергии. Тип метаболизма у них — бродильный. Облигатные анаэробы подразделяются на две группы: строгие анаэробы и аэротолерантные.

Строгие анаэробы характеризуются тем, что молекулярный кислород для них токсичен: он убивает микроорганизмы или ограничивает их рост. Энергию строгие анаэробы получают маслянокислым брожением. К строгим анаэробам относятся, например, некоторые клостридии (*C. botulinum*, *C. tetani*) и бактериоиды. Аэротолерантные анаэробы не используют кислород для получения энергии, но могут существовать в его атмосфере. К ним относятся молочнокислые бактерии, получающие энергию гетероферментативным молочнокислым брожением.

Факультативные анаэробы способны расти и размножаться как при наличии кислорода, так и в его отсутствии. Они обладают смешанным типом метаболизма. Процесс получения энергии у них может происходить кислородным дыханием при наличии кислорода, а в его отсутствие переключаться на брожение.

Различное отношение микроорганизмов к кислороду связано с наличием у них ферментных систем, позволяющих существовать в атмосфере кислорода. Следует отметить, что в окислительных процессах, протекающих в атмосфере кислорода, при окислении флавопротеидов образуются токсические продукты: перекись водорода и закисный радикал кислорода, имеющий неспаренный электрон. Эти соединения вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот и окисление SH-групп белков.

Для нейтрализации токсичных форм кислорода микроорганизмы, способные существовать в его атмосфере, имеют защитные механизмы. У облигатных аэробов и факультативных

анаэробов накоплению закисного радикала препятствует фермент супероксиддисмутаза, расщепляющая закисный радикал на перекись водорода и молекулярный кислород: Перекись водорода у этих бактерий разлагается ферментом каталазой на воду и молекулярный кислород.

Аэротолерантные микроорганизмы не имеют супероксиддисмутазы, и ее функцию выполняет высокая концентрация ионов марганца, который, окисляясь под действием O_2 -, убирает тем самым супероксидный ион. Перекись водорода у этих микроорганизмов разрушается ферментом пероксидазой в катализируемых ею реакциях окисления органических веществ.

Строгие анаэробы не имеют ни каталазу, ни пероксидазу. Однако супероксиддисмутаза встречается у многих строгих анаэробов. Некоторые строгие анаэробы (роды *Bacteroides*, *Fusobacterium*) не выносят присутствия даже незначительного количества молекулярного кислорода, тогда как ряд представителей рода *Clostridium* могут находиться в атмосфере кислорода. Для культивирования строгих анаэробов создаются условия, позволяющие удалять атмосферный кислород: использование специальных приборов, анаэроостатов и анаэробных боксов, добавление в питательные среды редуцирующих кислород веществ, н-р тиогликолята натрия, использование поглотителей кислорода.

При внесении бактерий в питательную среду они растут и размножаются до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых компонентов среды не достигнет минимума, после чего рост и размножение прекращаются. Если на протяжении всего этого времени не прибавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов обмена, то получаем статическую (периодическую) бактериальную культуру, ведущую себя как многоклеточный организм, с генетическим ограничением роста.

На кривой роста бактерий в жидкой питательной среде, описывающей зависимость числа образующихся клеток от времени размножения, можно выделить нескольких фаз, сменяющих друг друга в определенной последовательности (лаг-фаза, экспоненциальная, стационарная и фаза отмирания).

1. Лаг-фаза (от англ. lag — отставать) — начальная фаза, которая охватывает промежуток времени между посевом бактерий и началом размножения. Ее продолжительность составляет в среднем 2–5 ч и зависит от состава питательной среды и возраста засеваемой культуры. Во время лаг-фазы бактерии адаптируются к новым условиям культивирования, идет синтез индуцибельных ферментов.

2. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток, которая зависит от вида бактерий и питательной среды. Период удвоения клеток называется временем генерации, которое варьирует от вида бактериальной культуры: у бактерий рода *Pseudomonas* оно равняется 14 мин, а у *Mycobacterium* — 24 ч. Величина клеток и содержание белка в них во время экспоненциальной фазы остаются постоянными. Бактериальная культура в этой фазе состоит из стандартных клеток.

3. Стационарная фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Так как скорость роста зависит от концентрации питательных веществ, то при уменьшении содержания последних в питательной среде уменьшается и скорость роста. Снижение происходит также из-за большой плотности бактериальных клеток, снижения парциального давления кислорода, накопления токсических продуктов обмена. Продолжительность стационарной фазы составляет несколько часов и зависит от вида бактерий и особенностей их культивирования.

4. Фаза отмирания наступает вследствие накопления кислых продуктов обмена или в результате автолиза под влиянием собственных ферментов. Продолжительность этой фазы колеблется от десятка часов до нескольких недель.

Накопление бактериальной массы (числа бактерий) при культивировании зависит от многих факторов (качество питательных сред, посевная доза, температура выращивания, pH, наличие активирующих рост добавок и др.). На жидких питательных средах рост и

размножение бактерий проявляются в виде диффузного помутнения, образования придонного осадка или поверхностной пленки. Особенность размножения бактерий рода *Leptospira* на жидких средах — отсутствие видимых проявлений роста.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток — колонии, которые принято считать потомками одной клетки. Колонии различаются формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окраской. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями в S-форме (от англ. smooth — гладкий). Колонии с матовой шероховатой поверхностью называют R-формами (от англ. rough — шероховатый). Окраска колоний определяется способностью бактерий синтезировать пигменты. Пигменты различаются по цвету, химическому составу и растворимости. Среди продуцируемых бактериями пигментов встречаются:

каротиноиды — жирорастворимые пигменты красного, желтого и оранжевого цветов. Они встречаются у представителей рода *Mycobacterium*, *Micrococcus*;

пирроловые — к ним относится спирторастворимый пигмент продигиозан, встречающийся у *Serratia marcescens*;

фенозиновые — к этой группе относится водорастворимый пигмент *Pseudomonas aeruginosa* пиоцианин, который, выделяясь в питательную среду, окрашивает ее;

меланины — нерастворимые пигменты черного и коричневого цветов (у бактерий рода *Porphyromonas*).

Пигменты предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезвреживают токсичные кислородные радикалы, обладают антибиотическими свойствами, принимают участие в реакциях, сопутствующих фотосинтезу в фототрофных бактериях.

Вид, форма, цвет и другие особенности колоний, а также характер роста на плотных питательных средах определяются как культуральные свойства бактерий и учитываются при их идентификации.

Помимо бинарного деления некоторые представители прокариот имеют иные способы размножения: актиномицеты могут размножаться путем фрагментации гифов; представители семейства *Streptomycetaceae* — спорами. Микоплазмы являются полиморфными бактериями, что обусловлено особенностями их размножения. Помимо поперечного деления микоплазмы могут размножаться почкованием. В этом случае основной морфологической репродуцирующей единицей служат элементарные тельца сферической или овоидной формы, размножающиеся фрагментацией и почкованием. Хламидии проходят через цикл развития, который предусматривает существование двух форм: внеклеточных инфекционных, малых размеров элементарных телец, не обладающих способностью к бинарному делению, и внутриклеточного, метаболически активного, крупных размеров ретикулярного тельца, способного к бинарному делению. В результате бинарного деления ретикулярного тельца формируются дочерние элементарные тельца, которые выделяются из клетки. Некоторые спирохеты, например *Treponema pallidum*, способны образовывать в неблагоприятных условиях цисты, которые, распадаясь на зерна, дают потомство новым бактериальным клеткам.

Некоторые неспорообразующие бактерии способны переживать неблагоприятные для размножения условия окружающей среды, переходя в некультивируемое (покоящееся) состояние. В этом состоянии бактериальные клетки сохраняют свою метаболическую активность, но не способны к непрерывному клеточному делению, необходимому для роста на жидких и плотных питательных средах. При смене условий существования, в частности при попадании в организм человека или животных, клетки вновь приобретают способность к размножению и сохраняют свой патогенный потенциал. Переход в некультивируемое состояние обеспечивает сохранение патогенных бактерий в межэпидемические и межэпизоотические периоды. Выявить наличие бактерий, находящихся в некультивируемой форме, можно с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или применением красителей, меняющих окраску в окисленной и восстановленной форме. Возврат способности к размножению и росту находящихся в покоящейся форме клеток могут

вызвать естественные факторы: простейшие, обитатели почв и водоемов, фитогормоны, выделяемые корневыми волосками растений.

Культивирование облигатных внутриклеточных бактерий, относящихся к родам *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Coxiella* и *Chlamydia*, осуществляют на культурах клеток или в организме животных и членистоногих, а также в куриных эмбрионах (за исключением эрлихий). Куриные эмбрионы используют также для культивирования бактерий, обладающих высоким уровнем гетеротрофности, н-р родов *Borrelia*, *Legionella*.

Особенности физиологии грибов и простейших

Грибы по типу питания — гетеротрофы, по отношению к кислороду — аэробы и факультативные анаэробы. Растут в широких диапазонах температур (оптимальная температура 25–30°C), имеют половой и бесполой способы размножения. Поэтому грибы широко распространены в окружающей среде, особенно в почве. Грибы вместе с сине-зелеными водорослями образуют симбиоз в виде лишайника. В этом симбиозе грибы поглощают воду и растворимые в ней вещества, а сине-зеленые водоросли поставляют грибам органические соединения. Другой вид взаимоотношений — микориза — симбиоз грибов и корней высших растений.

Грибы культивируют в течение нескольких суток на сусле-агаре или жидком сусле, среде Сабуро, Чапека и др. Для этой цели можно также использовать лабораторных животных.

Некоторые грибы обладают диморфизмом, т.е. способностью принимать нитчатые и дрожжевые формы в зависимости от условий роста. Дрожжеподобные формы часто образуются *in vivo*, т.е. при инфицировании человека грибами.

Простейшие имеют органы движения (жгутики, реснички, псевдоподии), питания (пищеварительные вакуоли) и выделения (сократительные вакуоли). По типу питания они могут быть гетеротрофами или аутотрофами. Размножаются бесполым и половым путями. Некоторые простейшие имеют сложный жизненный цикл, сопровождающийся сменой форм развития, полового и бесполого размножения, образуют цисты.

Многие простейшие (дизентерийная амеба, лямблии, трихомонады, лейшмании, балантидии) могут расти на питательных средах, содержащих нативные белки и аминокислоты. Для их культивирования используются также культуры клеток (тканей), куриные эмбрионы и лабораторные животные.