***Лекция* 4**

**Физиология микроорганизмов. Метаболизм, питание, дыхание и размножение микроорганизмов. Принципы культивации микроорганизмов.**

Физиология бактерий изучает жизнедеятельность, метаболизм бактерий, вопросы питания, получения энергии роста и размножения 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 изучения патогенеза вызываемых ими инфекционных болезней, для постановки микробиологической диагностики, проведения лечения и профилактики инфекционных заболеваний, регуляции взаимоотношения человека с окружающей средой, а также для использования бактерий в биотехнологических процессах с целью получения биологически активных веществ.

**Питание бактерий.**

**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. Высушивание микроорганизмов в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) прекращает размножение микробов и способствует длительному их сохранению.

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 (ЦПМ) и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки являются антигенами и токсинами бактерий. В состав белков бактерий входят отсутствующие у человека Д-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 ЦПМ и ее производных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат запасными веществами, входят в состав эн­дотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены. В бактериальных жирах преобладают длинноцепочечные (С14-С18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Сложные липиды представлены фосфатидилинозитом, фосфатидил глицерином и фосфатидилэтаноламином. У некоторых бактерий в клетке находятся воски, эфиры миколовой кислоты. Микоплазмы – единственные представители царства Procaryotae, имеющие в составе ЦПМ стеролы. Остальные бактерии в составе ЦПМ и ее производных не имеют стеролов. Нуклеиновые кислоты. В бактериальной клетке присутствуют все типы РНК: иPHК, тРНК, рРНК. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды необходимы для синтеза нуклеиновых кислот, они 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 (аланин, гуанин) и пиримидинами (тимин, цитозин). Каждый нуклеотид имеет дезоксирибозный З’-конец и фосфатный 5’-конец. Нуклеотиды соединяются в полинуклеотидную цепочку посредством фосфодиэфирных связей между 5’-концом одного нуклеотида и З’-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 З’-конец другой цепи. Процентное содержание количества гуанинцитозин (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 минеральные вещества: N, S, Р, Са, К, Mg, Fe, Мп, а также микроэлементы: Zn, Сu, Со, Ва.

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, Мп. Ионы К и Mg необходимы для активации рибосом. Са2+ является составной частью клеточной стенки грамположительных бактерий. У многих бактерий имеются сидерохромы, которые обеспечивают транспортировку ионов Fe внутрь клетки в виде растворимых комплексных соединений.

Классификация бактерий по типам питания и способам получения энергии. Основной целью метаболизма бактерий является рост, т. е. координированное увеличение всех компонентов клетки. Для роста требуется постоянный приток атомов углерода, поскольку основными компонентами бактериальной клетки являются органические соединения, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды, остов которых построен из атомов углерода.

В зависимости от **источника усвояемого углерода** бактерии подразделяют по типам на:

* аутотрофы (от греч. autos – сам, trophe – питание), которые используют для построения своих клеток неорганический углерод, в виде СО2
* гетеротрофы (от греч. fieteros – другой) используют органический углерод, легко усвояемыми источниками которого являются гексозы, многоатомные спирты, аминокислоты.

Белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты являются крупными полимерными молекулами, которые синтезируются из мономеров в реакциях поликонденсации, протекающих с поглощением энергии. Для восполнения своей биомассы бактериям также требуется источник энергии, которая 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** (Н2, NH3, H2S, Fe2 и др.) и *органотрофы*, которые используют в качестве **доноров** **электронов** **органические** соединения.

Бактерии, изучаемые медицинской микробиологией, являются **гетерохемоорганотрофами**. Отличительной особенностью этой группы является то, что источник углерода у них является источником энергии. Степень гетеротрофности у различных бактерий неодинакова. Среди бактерий выделяют сапрофиты (от греч. sapros – гнилой, phyton – растение), которые питаются мертвым органическим материалом и независимы от других организмов, и паразиты (от греч. parasitos – нахлебник) – гетеротрофные микрорганизмы, зависимые в получении пита­тельных веществ от макроорганизма.Среди паразитов различают облигатных и факультативных.

**Облигатные** паразиты полностью лишены возможности жить вне клеток. К ним относятся представители родов Rickettsia, Coxiella, Ehrlichia, 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.

Культивирование бактерий в системах in vitro осуществляется на **питательных средах**. Искусственные питательные среды должны отвечать следующим требованиям:

* Каждая питательная среда должна содержать воду, так как все процессы жизнедеятельности бактерий протекают в воде.
* Для культивирования гетероорганотрофных бактерий в среде должен содержаться органический источник углерода и энергии. Эту функцию выполняют различные органические соединения: углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды. Наибольшим энергетическим потенциалом обладает глюкоза, так как она непосредственно подвергается расщеплению с образованием АТФ и ингредиентов для биосинтетических путей. Часто используется в этих целях пептон – продукт неполного гидролиза белков, состоящий из поли, олиго- и дипептидов. Пептон также поставляет аминокислоты для построения бактериальных белков.
* Для синтеза белков, нуклеотидов, АТФ, коферментов бактериям требуются источники азота, серы, фосфаты и другие минераль­ные вещества, в том числе микроэлементы. Источником азота может служить пептон; кроме того, большинство бактерий способны использовать соли аммония в качестве источника азота. Серу и фосфор бактерии способны утилизировать в виде неорганических солей: сульфатов и фосфатов.
* Для нормального функционирования ферментов бактериям требуются ионы Ca2+, Mg2+, Мп2+ ,Fe2+, которые добавляют в питательную среду в виде солей, чаще всего фосфатов.
* Решающее значение для роста многих микроорганизмов имеет pH среды. Поддерживание определенного pH имеет значение для предотвращения гибели микроорганизмов от собственных продуктов обмена. С этой целью питательную среду забуферивают, чаще всего используя фосфатный буфер. При сильном выделении бактериями кислот, как продуктов обмена, добавляют к питательной среде карбонат кальция СаС12.
* Среда должна обладать определенным осмотическим давлением. Большинство бактерий способны расти на изотонических средах с концентрацией NaCl в 0,87 %. Некоторые бактерии не способны расти на средах при концентрации соли в них ниже 1 %. Такие бактерии называются галофильными. Так как устойчивость к осмотическому давлению определяется наличием у бактерий клеточной стенки, бактерии, лишенные клеточной стенки, микоплазмы, L-формы могут расти на питательных средах, содержащих гипертонический раствор, обычно сахарозы.
* При необходимости к питательной среде добавляют факторы роста, ингибиторы роста определенных бактерий, субстраты для действия ферментов, индикаторы.
* Питательные среды должны быть стерильными.

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

Агар – полисахарид, получаемый из водорослей. Он плавится при температуре 100‘С, но при охлаждении остывает при температуре 45-50'С. Агар добавляют в концентрации 0,5 % – для полужидких сред и 1,5–2 % – для создания плотных сред.

В зависимости от **состава** и **цели** применения различают **простые**, **сложные**, **элективные**, **минимальные**, **дифференциально**-**диагностические** и **комбинированные** среды.

По составу питательные среды могут быть **простыми** и **сложными**. К простым средам относятся пептонная вода, питательный бульон, мясопептонный агар. На основе этих простых сред готовят сложные, например сахарный и сывороточный бульоны, кровяной агар.

В зависимости от назначения среды подразделяются на **элективные**, **обогащенные**, **дифференциально-диагностические.**

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. Они состоят из простой питательной среды с добавлением субстрата, на который должен подействовать фермент, и индикатора, меняющего свой цвет в результате ферментативного превращения субстрата. Примером таких сред являются 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 таких сред служат среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые при выделении патогенных кишечных бактерий. Обе эти среды ингибируют рост кишечной палочки.

**Ферменты бактерий.** В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов, которые принадлежат к 6 классам: **оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лигазы, лиазы, изомеразы**. Ферменты, образуемые бактериальной клеткой, могут локализоваться как внутри клетки – **эндоферменты**, так и выделяться в окружающую среду – **экзоферменты**.

**Экзоферменты** играют большую роль в обеспечении бактериальной клетки доступными для проникновения внутрь источниками углерода и энергии. Большинство гидролаз является экзоферментами, которые, выделяясь в окружающую среду, расщепляют крупные молекулы пептидов, полисахаридов, липидов до мономеров и димеров, способных проникнуть внутрь клетки.

Некоторые экзоферменты, например гиалуронидаза, коллагеназа и другие, являются ферментами агрессии. Некоторые ферменты локализо­ваны в периплазматическом пространстве бактериальной клетки. Они участвуют в про­цессах переноса веществ в бактериальную клетку. Определение спектра ферментативной активности используются при установлении таксономического положения бактерий. Наличие экзоферментов можно определить при помощи дифференциально-диагностических сред, поэтому для идентификации бактерий разработаны специальные тест-системы, состоящие из набора дифференциально-диагностических сред.

**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 ЦПМ.

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 диффузию** и **облегченную диффузию**. Простая диффузия – неспецифическое проникновение веществ в клетку, при этом решающее значение имеет величина молекул и липофильность. Скорость переноса незначительна. Таким путем в клетку проникают O2, CO2 и H2O. **Облегченная** диффузия протекает с участием белка-переносчика, который обладает специфичностью. Такой тип диффузии характерен в основном для эукариот (н-р, дрожжевых грибов), в клетки прокариот путем облегченной диффузии может проникать глицерин. 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 происходит затрата энергии. Имеется два типа активного транспорта. При одном типе активного транспорта небольшие молекулы (аминокислоты, некоторые сахара) «накачиваются» в клетку и создают концентрацию, которая может в 100-1000 раз превышать концентрацию этого вещества снаружи клетки. Второй механизм, 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, составной частью которой является белок-переносчик, находящийся в активной фосфорилированной форме. Фосфорилированный белок связывает свободный сахар на наружной поверхности мембраны и транспортирует его в цитоплазму, где сахар освобождается в виде фосфата.

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.

**Конструктивный метаболизм (анаболизм).** Основные органические компоненты бактериальной клетки, как уже было отмечено, синтезируются в реакциях полимеризации, из строительных блоков: аминокислот, фосфатов сахаров, пуриновых и пиримидиновых оснований, органических кислот. Поставщиками этих строительных блоков являются промежуточные продукты основных путей энергетического метаболизма. Среди бактерий выделяется группа, называющаяся прототрофами. которые способны синтезировать все компоненты клетки из одного источника углерода и энергии. Если бактерии теряют способность к синтезу какого-нибудь фермента, участвующего в биосинтетических процессах, то для их роста и размножения требуется наличие недостающего вещества, которое называется фактором роста, а такие бактерии – ауксотрофами.

Факторами роста являются аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, которые входят в состав простетических групп коферментов.

**Энергетический метаболизм (катаболизм).** Энергия в бактериальной клетке накапливается в форме молекул АТФ. У **хемоорганотрофных** бактерий реакции, связанные с получением энергии в форме АТФ, – это реакции окисления-восстановления, сопряженные с реакциями фосфорилирования. Окисленный в этих реакциях углерод выделяется клеткой в виде СО2. Для удаления отщепившегося в этих реакциях водорода, который находится в форме восстановленного НАД, различные бактерии используют различные возможности в зависимости от конечного акцептора водорода (или электронов). 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, он также определяет конечные продукты этих реакций, которые используются при идентификации бактерий, а также условия культивирования бактерий.

При использовании в качестве источника углерода и энергии глюкозы или других гексоз начальные этапы окисления глюкозы являются общими, как при оксидативном, так и при бродильном метаболизмах. 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).

**Пути расщепления глюкозы.** Расщепление глюкозы до пировиноградной кислоты, одному из важнейших промежуточных продуктов обмена веществ, у бактерий происходит 3 путями:

* через образование фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ-путем, или гл и колитическим распадом, или, по имени изучавших его исследователей, путем Эмбдена-Мейергофа-Парнаса);
* через пентозофосфатный путь (ПФ-путъ); через путь Энтнера–Дудорова, или КДФГ-путь (путь 2-кето-3-дезокси-6-фос- фоглюконовая кислоты).

Глюкоза в бактериальной клетке сначала фосфорил ируется при участии АТФ и фермента гексокиназы до метаболически активной формы глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), которая служит исходным соединением для любого из трех указанных выше путей.

Микроорганизмы заметно различаются между собой по использованию того или иного из путей. Ферменты ФДФ-пути, как правило, являются обязательными компонентами клетки, хотя у многих бактерий этот путь действует лишь в обратном направлении; необратимые реакции при этом катализируются ферментами. ПФ-путь также имеет универсальное значение, так как он служит поставщиком ингредиентов для биосинтеза.

Пируват, образовавшийся при расщеплении глюкозы, превращается при участии кофакторов в «активированную» уксусную кислоту или ацетилкоэнзим А. Последний окисляется в СО, с отщеплением водорода в цикле трикарбоновых кислот.

**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 (Н+)) является молекулярный кислород. В этом случае пируват полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот до СО2. Цикл трикарбоновых кислот выполняет функции как поставщика предшественников для биосинтетических процессов, так и атомов водорода, который в форме восстановленного НАД переносится на молекулярный кислород через серию переносчиков, обладающих сложной структурно оформленной мультиферментной системой – дыхательной цепью. Дыхательная цепь у бактерий локализована в ЦПМ и во внутриклеточных мембранных структурах.

Переносчики, осуществляющие транспорт водорода (электронов) на молекулярный кис­лород, относятся к 4 классам **дегидрогеназ**, коферментами которых являются **НАД, флавопротеииы, хиноны** и **цитохромы**. Протоны (электроны) передвигаются от одного носителя к другому в направлении увеличивающегося окислительно-восстановительного потенциала. Типичная цепь выглядит следующим образом:

**ЦТК→НАД (H 2) флавопротеид–>хинон –> цитохромы: в–>с–>а–02**

Среди бактериальных цитохромов различают цито хромы в, с, а и а3. Конечным этапом переноса электронов (протонов) по дыхательной цепи является восстановление цитохромов а + а3 (цитохромоксидазы). Цитохромоксидаза является конечной оксидазой, передающей электроны на кислород.

У бактерий встречаются вариации в составе дыхательной цепи; так, у многих бактерий вместо убихинонов имеются нафтохиноны, состав цитохромов может зависеть от условий роста бактерий. У некоторых бактерий цитохромы отсутствуют, и при контакте с кислородом происходит непосредственный перенос водорода на кислород с помощью флавопротеидов, конечным продуктом при этом оказывается перекись водорода – Н202.

Помимо углеводов прокариоты способны использовать другие органические соединения, в частности белки, в качестве источника энергии, окисляя их полностью до СО2 и H2O.

Аминокислоты и белки также могут выступать в качестве энергетических ресурсов. Белки вначале вне клетки расщепляются протеолитическими ферментами на пептиды, которые поглощаются клеткой и расщепляются внутриклеточными пептидазами до аминокислот. Аминокислоты могут использоваться в конструктивном метаболизме, а могут у аммонифицирующих бактерий служить основным материалом в энергетических процессах при окислительном дезаминировании, в результате которого происходит выделение аммиака и превращение аминокислоты в кетокислоту, которая через цикл трикарбоновых кислот вступает в конструктивный метаболизм:

**2R - СHNН2 - СООН + О2 →2R--СО COOH + 2NH3**

Процесс аммонификации известен как «гниение», при этом происходит накопление продуктов, обладающих неприятным специфическим запахом образующихся при этом первичных аминов.

Гнилостные бактерии осуществляют минерализацию белка, разлагая его до СО2, NH3 H2S. К гнилостным бактериям относятся Proteus, Pseudomon**as, Bacillus cereus.**

**Бродильный (ферментативный) метаболизм.** Ферментация, или брожение, – процесс получения энергии, при котором отщепленный от субстрата водород переносится на органические соединения.

Кислород в процессе брожения участия не принимает. Восстановленные органические соединения выделяются в питательную среду и накапливаются в ней. Ферментироваться могут углеводы, аминокислоты (за исключением ароматических), пурины, пиримидины, многоатомные спирты. Не способны сбраживаться ароматические углеводороды, стероиды, каротиноиды, жирные кислоты. Эти вещества разлагаются и окисляются только в присутствии кислорода, в анаэробных условиях они стабильны. Продуктами брожения являются кислоты, газы, спирты.

Исходя из природы конечных продуктов, различают несколько типов ферментации углеводов.

**Спиртовое брожение.** Встречается, в основном, у дрожжей. Конечными продуктами являются этанол и СО2. Сбраживание глюкозы происходит по ФДФ-пути в анаэробных условиях. При доступе кислорода процесс брожения ослабевает, на смену ему приходит дыхание. Подавление спиртового брожения кислородом называется эффектом Пастера.Спиртовое брожение используется в пищевой промышленности: хлебопекарной, виноделии.

**Молочнокислое брожение.** Различают два типа молочнокислого брожения: **гомоферментативное** и **гетероферментативное**.

При гомоферментативном типе расщепление глюкозы проходит по ФДФ-пути. Водород от восстановленного НАД передается на пируват при помощи лактатдегидрогеназы, при этом образуется молочная кислота. Гомоферментативное молочнокислое брожение происходит у **S. pyogenes, Е. faecalis, S. salivarius** у некоторых видов рода **Lactobacillus: L. dulgaricus, L. lactis.**

**Гетероферментативное** молочнокислое брожение присутствует у бактерий, у которых отсутствуют ферменты ФДФ-пути: **альдолаза и триозофосфатизомераза**. Расщепление глюкозы происходит по ПФ-пути. с образованием фосфоглицеринового альдегида, который превращается далее в пируват по ФДФ-пути и в последующем восстанавливается в лактат. Дополнительными продуктами этого типа брожения являются также этанол, уксусная кислота. **Гетероферментативное** молочнокислое брожение встречается у различных представителей бактерий родов **Lactobacillus** и **Bifidobacterium**.

Продукты молочнокислого брожения играют большую роль в формировании колонизационной резистентности бактериями рода **Lactobacillus** и **Bifidobacterium**, составляющих облигатную флору кишечника.

Молочнокислые бактерии широко используются в молочной промышленности для получения молочнокислых продуктов, а также в создании пробиотиков.

**Муравьинокислое (смешанное) брожение**. Встречается у представителей семейств Enterobacteriaceae и Vibrionaceae. Глюкоза расщепляется по ФДФ-пути, глюконат расщепляется по КДФГ-пути. В зависимости от продуктов брожения, выделяющихся в анаэробных условиях, различают два типа процессов:

В одном случае происходит расщепление пирувата с образованием **ацетилкофермента А** и **муравьиной кислоты**, которая, в свою очередь, может расщепляться на двуокись углерода и молекулярный водород. Другими продуктами брожения, образующимися через цепь реакций, являются **этанол**, **янтарная** и **молочная** кислоты. Сильное кислотообразование можно выявить реакцией с индикатором метил-рот, который меняет окраску в сильно кислой среде.

При другом типе брожения образуется целый ряд кислот, однако главным продуктом брожения являются **ацетоин** и **2,3-бутандиол**. Эти вещества при взаимодействии **α-нафтол** в щелочной среде вызывают образование окраски бурого цвета, что выявляется реакцией Фогеса–Проскауэра, используемой при идентификации бактерий.

**Маслянокислое брожение.** Масляная кислота, бутанол, ацетон, изопропанол и ряд других органических кислот, в частности уксусная, капроновая, валерьяновая, пальмитиновая, являются продуктами сбраживания углеводов сахаролитическими строгими анаэробами. Спектр этих кислот, определяемый при помощи газожидкостной хроматографии, используется как экспрессметод при идентификации анаэробов.

**Ферментация белков.** Если для бактерий с бродильным метаболизмом источником энергии служат белки, то такие бактерии называются пептолитическими. Пептолитическими являются некоторые клостридии, в частности **С. histolyticum, С. botulinum**. Пептолитические бактерии гидролизуют белки и сбраживают аминокислоты. Многие аминокислоты сбраживаются совместно с другими, при этом одна выполняет функцию донора, а другая функцию – акцептора водорода. Аминокислота-донор дезаминируется в кетокислоту, которая в результате окислительного декарбоксилирования превращается в жирную кислоту.

**Анаэробное дыхание.** Некоторые бактерии обладают способностью использовать в анаэробных условиях нитрат как конечный акцептор водорода. Восстановление нитрата может происходить двумя путями:

* **Аммонификацией**, при которой нитрат превращается в аммиак:
* **Денитрификацией**, при которой происходит восстановление нитрата до молекулярного азота или закиси азота. Этот процесс связан с деятельностью фермента нитратредуктазы:

NO3→N02 →NO – NH2OH→NН3→N2O→N2

**Отношение бактерий к кислороду.** Кислород, широко распространенный в природе, находится в свободном и связанном состоянии. В клетках он находится в связанном состоянии в составе воды и органических соединений. В атмосфере он присутствует в свободном состоянии в виде молекулярной формы, объемная доля которого 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 присутствии кислорода. Используют кислород для получения энергии путем кислородного дыхания

Энергию 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. Это связано с тем, что 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 (**С. botulimm, С. tetani**), бактероиды.

Аэротолерантные микроорганизмы не используют кислород для получения энергии, но могут существовать в его атмосфере.

К этой группе относятся молочнокислые бактерии, получающие энергию гетероферментативным молочнокислым брожением.

**Факультативные анаэробы.** Способны расти и размножаться как в присутствии кислорода, так и в его отсутствии. Они обладают смешанным типом метаболизма. Процесс получения энергии у них может происходить **кислородным** дыханием в присутствии кислорода, а в его отсутствии переключаться на **брожение**. Для этой группы бактерий характерно наличие **анаэробного нитратного дыхания**.

Различное физиологическое 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 Н2О2 и закислый радикал кислорода O2- – соединение, имеющее 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 О2- препятствует фермент *супероксиддисмутаза*, расщепляющая закисный радикал на **перекись водорода** и **молекулярный кислород**:

**202 + 2Н+→ Н2 02 + О2-**

Перекись водорода у этих бактерий разлага­ется ферментом **каталазой** на воду и молекулярный кислород:

**2 H202 → 2Н2 О + О2**

**Аэротолерантные** микроорганизмы не имеют **супероксиддисмутазы**, и ее функцию восполняет высокая концентрация ионов **марганца**, который, окисляясь под действием О2-, убирает тем самым супероксидный ион. Перекись водорода у этих микроорганизмов разрушается ферментом **пероксидазой** в катализируемых ею реакциях окисления органических веществ:

**Н2 А + H202→A + 2H2O.**

**Строгие анаэробы** не имеют ни каталазу, ни пероксидазу. Однако супероксиддисмутаза встречается у многих строгих анаэробов. И наличие этого фермента коррелирует с их устойчивостью к кислороду. Некоторые строгие анаэробы (роды **Bacteroides. Fusobacterium**) не выносят присутствия даже незначительного количества молекулярного кислорода, тогда как некоторые представители рода **Clostridium** могут находиться в атмосфере кислорода. Для культивирования строгих анаэробов создаются условия, позволяющие удалять атмосферный кислород: использование специальных приборов, анаэростатов и анаэробных боксов, добавление в питательные среды редуцирующих кислород веществ, например тиогликолята натрия, использование поглотителей кислорода.

**Рост и способы размножения бактерий.** Под ростом бактериальной клетки понимают согласованное увеличение количества всех компонентов клетки. Рост клетки не беспределен. После достижения критических размеров клетка подвергается делению. Большинство бактерий делится поперечным делением надвое. У большинства грамположительных бактерий деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, идущей от периферии к центру. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки.

Деление бактериальной клетки начинается спустя некоторое время завершения цикла репликации хромосомы, которая у бактерий протекает по полуконсервативному механизму. Это означает, что каждая из двух нитей ДНK хромосомы служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи ДНК. В процессе репликации бактериальной хромосомы участвует более 20 ферментов. Так как нативная бактериальная ДНК двуспиральная, перед репликацией цепи родительской молекулы матричной цепи ДНК должны быть разделены. В этом процессе участвуют ферменты **хеликаза**, которая в **энергопоглощаемой** реакции **расплетает** двойную **спираль**, и **топоизомераза** (гираза), которая **предотвращает** образование **вторичных** завитков. SSB-белок связывается с одноцепочечной ДНК, предотвращая повторное скручивание в двойную спираль. В результате образуется репликативная вилка. Синтез новых цепей ДНК осуществляется ферментом **ДНК-полимеразой**.

Особенностью функционирования ДНК-полимеразы является ее способность **присоединять** комплементарные матрице нуклеотиды к свободному **3'-концу** растущей цепи. Поэтому для осуществления реакции полимеризации нуклеотидов на матрице родительской цепи полимеразе требуется затравка, **праймер** (primer – запал, англ.). Праймер представляет собой короткую нуклеотидную цепочку РНК, комплементарную матричной цепи, со свободным З’-концом. Достраивание осуществляется присоединением к свободной гидроксильной группе З’-конца затравки нового нуклеотида. Расплетенные цепи ДНК всегда содержат на 5’-конце несколько рибонуклеотидов, т. е. синтез ДНК начинается с синтеза РНК. РНК-затравку для синтеза ДНК образует специальный фермент ДНК-праймаза, способная инициировать синтез РНК по одноцепочечной ДНК матрицы. После того как цепь ДНК начала синтезироваться, РНК-затравка удаляется, а удаляющиеся бреши застраиваются **ДНК-полимеразой** с высокой точностью. Так как цепи ДНК в дуплексе антипараллельны, то направление расплетания двойной цепи совпадает лишь с направлением синтеза ДНК на одной матрице, которая называется ведущей и на которой протекает непрерывный синтез ДНК. На комплементарной цепи ДНК синтезируется короткими фрагментами **Оказаки**, которые впоследствии сшиваются в одну ковалентно связанную непрерывную цепь ДНК **ДНК-лигазами**.

Процесс репликации ДНК бактерии продолжается до тех пор, пока не удвоится вся ДНК. Репликация начинается в одной избранной области, называемой **origin** (origin – начало, англ.), имеющей определенную последовательность нуклеотидов. На origin может возникать одна или две репликативные вилки. Правильное распределение вновь синтезированных нитей ДНК по дочерним клеткам достигается у бактерий за счет **прикрепления ДНК** к мембране. Размножение бактерий бинарным делением приводит к росту числа бактериальных клеток в **геометрической** прогрессии.

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 бактериальную культуру.

**Статическая (периодическая) культура** бактерий ведет себя как многоклеточный организм, с генетическим ограничением роста. Если построить график, по оси абсцисс которого отложить время, а по оси ординат – число клеток, то получим кривую, описывающую зависимость числа образующихся клеток от времени размножения, которая называется кривой роста. На кривой можно различить несколько фаз, сменяющих друг друга в определенной последовательности:

* Начальная – **лаг-фаза** (англ. lag – отставать). Охватывает промежуток времени между инокуляцией (посевом бактерий) и началом размножения. Ее продолжительность составляет в среднем 2-5 ч и зависит от состава питательной среды, от возраста засеваемой культуры. Во время лаг-фазы происходит адаптация бактериальных клеток к новым условиям культивирования, идет синтез индуцибельных ферментов
* **Экспоненциальная** (логарифмическая) фаза. Характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Эта скорость зависит от вида бактерий и питательной среды. Время 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/
* **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 скорости роста 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
* 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.

Постоянное нахождение бактериальной популяции в логарифмической фазе роста наблюдается в непрерывной культуре, что достигается постепенным дозированием поступления питательных веществ, контролем плотности бактериальной суспензии и удалением метаболитов. Непрерывные бактериальные культуры используются в биотехнологических процессах.

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. Особенностью размножения бактерий роста **Leptospira** на жидких средах является отсутствие видимых проявлений роста.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток – **колонии**, которые принято считать потомком одной клетки. Колонии различаются **формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окраской**. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями в **S-форме** (smooth – гладкий, англ.). Колонии с **матовой** шероховатой поверхностью называют **R-формами** (rough – шероховатый, англ.).

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, растворяются органическими растворителями. Они встречаются у представителей рода **Mycobacterium, Micrococcus, Actinomyces, Sarcina**

* **пирроловые** – к ним относится спирторастворимый пигмент **продигиозин**, встречающийся у **Serratia** **marcescens**
* **фенозиновые** – к этой группе относится водорастворимый пигмент **Pseudomonas** **аеruginosa**, **пиоцианин**, который, выделяясь в питательную среду, окрашивает ее;
* **меланины** – нерастворимые пигменты черного и коричневого цветов, встречающиеся у бактерий рода **Porphyromonas**, **Bacteroides**.
* **хиноны** – желтого цвета, продуцируются в основном **микобактериями**

Пигменты предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезвреживают токсичнее 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 царства **Procaryota** имеют иные способы размножения.

Актиномицеты могут размножаться путем **фрагментации** гифов. Представители семейства **Streptomycetaceae** размножаются **спорами**.

**Микоплазмы** являются полиморфными бактериями, что обусловлено особенностями их размножения. Помимо поперечного деления, если оно происходит синхронно с синтезом ДНК, микоплазмы могут размножаться **почкованием**. В этом случае основной морфологической репродуцирующейся единицей являются 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 спирохеnы, например **Treponema pallidum**, способны образовывать в неблагоприятных условиях цисты, которые, распадаясь на зерна, дают потомство новым бактериальным клеткам.

**Некультивируемые формы бактерий.** Некоторые неспорообразуюшие бактерии способны переживать неблагоприятные для размножения условия окружающей среды, переходя в некультивируемое 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 (покоящееся) состояние обеспечивает сохранение патогенных бактерий в межэпидемические и межэпизоотические периоды. При переходе в некультивируемую форму бактериальные клетки уменьшаются в размерах, приобретают сферическую форму, меняют вязкость ЦПМ. У них сохраняется транспорт электронов по дыхательной цепи и невысокий уровень метаболической активности. На переход в некультивируемую форму влияют температура, концентрация солей, свет, парциальное давление кислорода, содержание питательных веществ, а также метаболиты водорослей, находящихся в биоценозе с бактериями. 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.

**Условия культивирования бактерий.** Для культивирования бактерий необходимо соблюдать ряд условий.

* Наличие полноценной **питательной** **среды**. Каждая питательная среда независимо от сложности состава и цели применения должна обладать водной основой, органическим источником углерода и энергии, определенным pH. осмотическим давлением.
* **Температура культивирования**. Температура влияет на скорость размножения. К температуре бактерии относятся по-разному:

-**мезофилы** размножаются в диапазоне температур 20-40 ºС. К мезофилам относится большинство болезнетворных для человека бактерий;

-**термофилы** растут в диапазоне температур 40-60 ºС. К термофилам относятся актиномицеты, некоторые спороносные бациллы;

-**психрофилы** размножаются в диапазоне температур 0-20 °С.

* **Атмосфера культивирования.** Для роста и размножения строгих аэробов необходим кислород. Аэробы хорошо растут на поверхности агара на чашках Петри или в тонком верхнем слое жидкой среды. Для обеспечения роста и размножения строгих аэробов в глубинных слоях жидкой среды необходимо диффузное распределение кислорода по всему объему питательной среды. Это достигается непрерывным перемешиванием или встряхиванием питательной среды, т.е. аэрированием. Аэрирование осуществляется на специальных аппаратах – встряхивателях. Для культивирования факультативных анаэробов используют те же методы, так как в присутствии кислорода у них преобладает оксидативный метаболизм над ферментацией, как наиболее энергетически выгодный. **Микроаэрофилы** размножаются при пониженном парциальном давлении кислорода. Этого можно достичь повышением в атмосфере культивирования парциального давления СО2 до концентрации 1-5 % против 0,03 % СО2 в атмосфере воздуха. Для этих же целей используют специальные СО2-инкубаторы, или же посевы помещают в эксикаторы, в которых устанавливают горящую свечу. **Облигатные анаэробы** для своего роста и размножения требуют исключения доступа кислорода воздуха. Это достигается следующими мерами:

-добавлением к питательным средам редуцирующих кислород веществ (тиогликолевой кислоты, аскорбиновой кислоты, цистеина, сульфидов);

-освобождением от кислорода воздуха, путем кипячения жидких питательных сред с последующим плотным закупориванием сосудов резиновыми пробками;

-использование поглотителей кислорода (щелочного пирогаллола и др.), помещая их в герметически закрываемые емкости «газ-паки». Этот метод используется для культивирования аэротолерантных бактерий;

-механическим удалением кислорода воздуха с последующим заполнением емкости инертным газом (в анаэростатах и анаэробных боксах).

Для культивирования хемо- и фотоавтотрофных бактерий создается атмосфера, насыщенная СО2.

* **Время культивирования.** Зависит от времени генерации. Большинство бактерий культивируют для получения видимого роста в течение 18-48 ч. Для культивирования возбудителя коклюша требуется 5 суток, а для культивирования М. tuberculosis – 3-4 недели.
* **Освещение**. Для выращивания фототрофных микроорганизмов необходим свет. Некоторые условно-патогенные микобактерии в зависимости от освещенности образуют пигмент, что используется при их идентификации. Культивирование абсолютных внутриклеточных паразитов, бактерий, относящихся к родам **Rickettsia, Ehrlichia, Coxiella, 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, например: родов Borrelia, **Legionella**.

В промышленных условиях для получения биомассы бактерий или грибов с целью получения антибиотиков, вакцин, диагностических препаратов, пробиотиков культивирование осуществляется в аппаратах (ферментерах) различной вместимости при строгом соблюдении оптимальных параметров роста и размножения культур.