Лекция № 4. Физиология и принципы культивирования микроорганизмов.

Метаболизм микроорганизмов.

Для роста и размножения микроорганизмы нуждаются в веществах, используемых для построения структурных компонентов клетки и получения энергии. **Метаболизм** (т.е. обмен веществ и энергии) имеет две составляющих- **анаболизм** и **катаболизм**. Анаболизм- синтез компонентов клетки (*конструктивный обмен*). Катаболизм- энергетический обмен, связан с окислительно- восстановительными реакциями, расщеплением глюкозы и других органических соединений, синтезом АТФ. Питательные вещества могут поступать в клетку в растворимом виде (это характерно для прокариот)- *осмотрофы*, или в виде отдельных частиц- *фаготрофы*.

Основным регулятором поступления веществ в бактериальную клетку является цитоплазматическая мембрана. Существует четыре основных механизма поступления веществ: -*пассивная диффузия*- по градиенту концентрации, энергонезатратная, не имеющая субстратной специфичности;

- *облегченная диффузия*- по градиенту концентрации, субстратспецифичная, энергонезатратная, осуществляется при участии специализированных белков *пермеаз*;

- *активный транспорт*- против градиента концентрации, субстратспецифичен (специальные связывающие белки в комплексе с пермеазами), энергозатратный (за счет АТФ), вещества поступают в клетку в химически неизмененном виде;

- *транслокация (перенос групп)*- против градиента концентрации, с помощью фосфотрансферазной системы, энергозатратна, вещества (преимущественно сахара) поступают в клетку в форфорилированном виде.

Основные химические элементы- органогены, необходимые для синтеза органичеких соединений- углерод, азот, водород, кислород.

В зависимости от источника потребляемого *углерода* микробы подразделяют на *аутотрофы* (используют CO2) и *гетеротрофы* (используют готовые органические соединения). В зависимости от *источника энергии* микроорганизмы делят на *фототрофы* (энергию получают за счет фотосинтеза- например, цианобактерии) и *хемотрофы* (энергия добывается за счет химических, окислительно-восстановительных реакций). Если при этом донорами электронов являются неорганические соединения, то это *литотрофы*, если органические- *органотрофы*. Если бактериальная клетка в состоянии синтезировать все необходимые для жизнедеятельности вещества, то это *прототрофы*. Если бактерии нуждаются в дополнительных веществах (факторах роста), то это *ауксотрофы.* Основными факторами роста для труднокультивируемых бактерий являются пуриновые и пиримидиновые основания , витамины, некоторые (обычно незаменимые) аминокислоты, кровяные факторы (гемин) и др.

Дыхание микроорганизмов.

Путем дыхания микроорганизмы добывают энергию. Дыхание- биологический процесс переноса электронов через дыхательную цепь от доноров к акцепторам с образованием АТФ. В зависимости от того, что является конечным акцептором электронов, выделяют *аэробное и анаэробное дыхание.* При аэробном дыхании конечным акцептором электронов является молекулярный кислород (O_2), при анаэробном- связанный кислород ($-NO_3$, $=SO_4$, $=SO_3$).

Примеры.

		O_2
Аэробное дыхание	донор водорода	H_2O
Анаэробное дыхание		
нитратное окисление		NO_3
(факультативные анаэробы)	донор водорода	N_2
сульфатное окисление		SO_4
(облигатные анаэробы)	донор водорода	H_2S

По типу дыхания выделяют четыре группы микроорганизмов.

1.*Облигатные* (строгие) *аэробы*. Им необходим молекулярный (атмосферный) кислород для дыхания.

2.*Микроаэрофилы* нуждаются в уменьшенной концентрации (низком парциальном давлении) свободного кислорода. Для создания этих условий в газовую смесь для культивирования обычно добавляют CO_2, например до 10- процентной концентрации.

3.*Факультативные анаэробы* могут потреблять глюкозу и размножаться в аэробных и анаэробных условиях. Среди них имеются микроорганизмы, толерантные к относительно высоким (близких к атмосферным) концентрациям молекулярного кислорода - т.е. аэротолерантные, а также микроорганизмы которые способны в определенных условиях переключаться с анаэробного на аэробное дыхание.

4.*Строгие анаэробы* размножаются только в анаэробных условиях т.е. при очень низких концентрациях молекулярного кислорода, который в больших концентрациях для них губителен. Биохимически анаэробное дыхание протекает по типу бродильных процессов, молекулярный кислород при этом не используется.

Аэробное дыхание энергетически более эффективно (синтезируется большее количество АТФ).

В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления (H_2O_2- перекись водорода, $-O_2$ - свободные кислородные радикалы), от которых защищают специфические ферменты, прежде всего каталаза, пероксидаза, *пероксиддисмутаза*. У анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и *система регуляции окислительно- восстановительного потенциала (rH_2).*

Основные методы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов.

1.Физический- откачивание воздуха, введение специальной газовой безкислородной смеси (чаще- N_2- 85%, CO_2- 10%, H_2- 5%).

2.Химический- применяют химические поглотители кислорода.

3.Биологический- совместное культивирование строгих аэробов и анаэробов (аэробы поглощают кислород и создают условия для размножения анаэробов).

4.Смешанный- используют несколько разных подходов.

Необходимо отметить, что создание оптимальных условий для строгих анаэробов- очень сложная задача. Очень непросто обеспечить постоянное поддержание безкислородных условий культивирования, необходимы специальные среды без содержания растворенного кислорода, поддержание необходимого окислительно- восстановительного потенциала питательных сред, взятие и доставка, посев материала в анаэробных условиях.

Существует ряд приемов, обеспечивающих более подходящие условия для анаэробов- предварительное кипячение питательных сред, посев в глубокий столбик агара, заливка сред вазелиновым маслом для сокращения доступа кислорода, использование герметически закрывающихся флаконов и пробирок, шприцев и лабораторной посуды с инертным газом, использование плотно закрывающихся эксикаторов с горящей свечой. Используются специальные приборы для создания анаэробных условий- анаэростаты. Однако в настоящее время наиболее простым и эффективным оборудованием для создания анаэробных и микроаэрофильных условий является система “Газпак” со специальными газорегенерирующими пакетами, действующими по принципу вытеснения атмосферного воздуха газовыми смесями в герметически закрытых емкостях.

Основные принципы культивирования микроорганизмов на питательных средах.

1.Использование всех необходимых для соответствующих микробов питательных компонентов.

2.Оптимальные температура, pH, rH_2, концентрация ионов, степень насыщения кислородом, газовый состав и давление.

Микроорганизмы культивируют на питательных средах при оптимальной температуре в термостатах, обеспечивающих условия инкубации.

По температурному оптимуму роста выделяют три основные группы микроорганизмов.

1.Психрофилы- растут при температурах ниже +20 градусов Цельсия.

2.Мезофилы- растут в диапозоне температур от 20 до 45 градусов (часто оптимум- при 37 градусах С).

3.Термофилы- растут при температурах выше плюс 45 градусов.

Краткая характеристика питательных сред.

По консистенции выделяют жидкие, плотные (1,5- 3% агара) и полужидкие (0,3- 0,7 % агара) среды.

Агар- полисахарид сложного состава из морских водорослей, основной отвердитель для плотных (твердых) сред. В качестве универсального источника углерода и азота применяют *пептоны*- продукты ферментации белков пепсином, различные *гидролизаты*- мясной, рыбный, казеиновый, дрожжевой и др.

По назначению среды разделяют на ряд групп:

- универсальные (простые), пригодные для различных нетребовательных микроорганизмов (мясо- пептонный бульон- МПБ, мясо- пептонный агар- МПА);

- специальные- среды для микроорганизмов, не растущих на универсальных средах (среда Мак- Коя на туляремию, среда Левенштейна- Иенсена для возбудителя туберкулеза);

- дифференциально- диагностические- для дифференциации микроорганизмов по ферментативной активности и культуральным свойствам (среды Эндо, Плоскирева, Левина, Гисса);

- селективные (элективные)- для выделения определенных видов микроорганизмов и подавления роста сопутствующих- пептонная вода, селенитовая среда, среда Мюллера.

По происхождению среды делят на естественные, полусинтетические и синтетические.

Рост и размножение микроорганизмов.

Бактериальные клетки размножаются в результате деления. Основные стадии размножения микробов в жидкой среде в стационарных условиях:

- лаг- фаза (начальная стадия адаптации с медленным темпом прирости биомассы бактерий);

- экспоненциальная (геометрического роста) фаза с резким ростом численности популяции микроорганизмов (2 в степеии n);

- стационарная фаза (фаза равновесия размножения и гибели микробных клеток);

- стадия гибели - уменьшение численности популяции в связи с уменьшением и отсутствием условий для размножения микроорганизмов (дефицит питательных веществ, изменение pH, rH_2, концентрации ионов и других условий культивирования).

Данная динамика характерна для *периодических культур* с постепенным истощением запаса питательных веществ и накоплением метаболитов.

Если в питательной среде создают условия для поддержания микробной популяции в экспоненциальной фазе- это *хемостатные (непрерывные) культуры*.

Характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах: сплошной рост, образование колоний, осадок, пленка, помутнение.

Чистая культура- популяция одного вида микроорганизмов.

Основные принципы получения чистых культур: механическое разобщение, рассев, серийные разведения, использование элективных сред, особых условий культивирования (с учетом устойчивости некоторых микробов к определенным температурам, кислотам, щелочам, парциальному давлению кислорода, pH и мн.др).