

Занятие 9

**Физиология микроорганизмов.
Особенности метаболизма и питания,
питательные среды.**

**Влияние физических и химических
факторов на микроорганизмы.
Стерилизация и дезинфекция.**

Обсуждаемые вопросы:

- 1. Физиология микроорганизмов.
- 2. Химический состав микроорганизмов.
- 3. Метаболизм бактерий: анаболизм и катаболизм.
- 4. Питание бактерий, типы питания: источники углерода (аутотрофы и гетеротрофы), энергии (фототрофы, хемотрофы), электронов (литотрофы и органотрофы), азота (аминоаутотрофы и аминегетеротрофы), факторы роста, сапрофиты, паразиты.
- 5. Механизмы питания: пассивный (простая и облегченная диффузия), активный транспорт.
- 6. Питательные среды: классификация по составу (натуральные, синтетические), консистенции (жидкие, полужидкие, плотные), назначению (универсальные, специальные, селективные, дифференциально-диагностические).
- 7. Влияние физических факторов на микроорганизмы: температура, высушивание, лучевая энергия (световые, ультрафиолетовые, радиоактивные лучи), ультразвук, давление.
- 8. Влияние химических факторов на микроорганизмы, дезинфекция.
- 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. Методы стерилизации: физические, химические и механические.
- 11. Понятие об асептике и антисептике (механическая, физическая, химическая, биологическая).

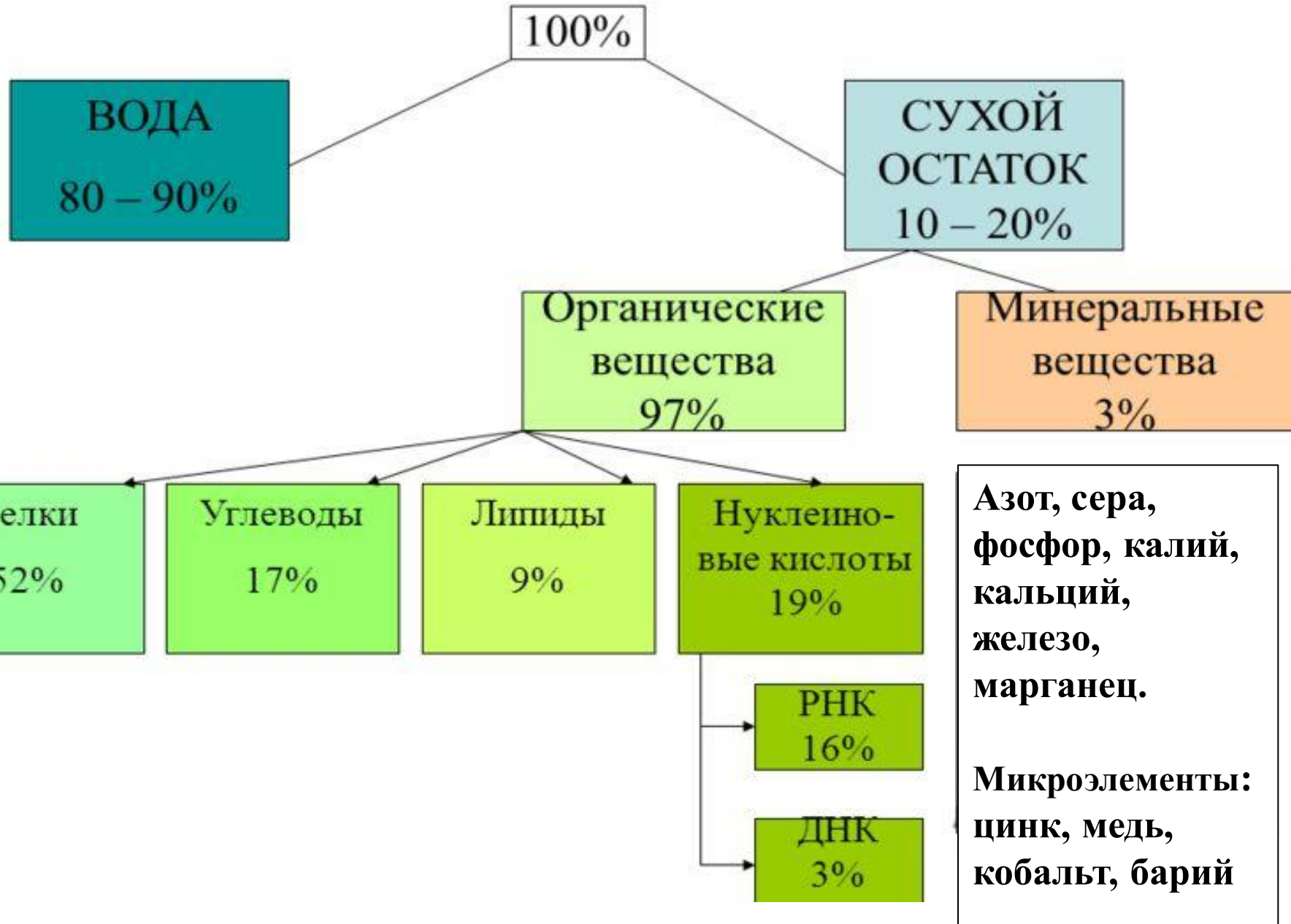
Цель занятия:

- ознакомить студентов с физиологией, метаболизмом, питанием микроорганизмов; дать информацию о типах, механизмах питания и питательных средах. Разъяснить влияние различных факторов на микроорганизмы, объяснить стерилизацию, методы стерилизации, дезинфекцию, методы дезинфекции, основные группы дезинфицирующих веществ.

Физиология микроорганизмов

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

Химический состав бактериальной клетки



Метаболизм представляет собой совокупность противоположных процессов – катаболизма и анаболизма.

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

МЕТАБОЛИЗМ

АНАБОЛИЗМ (синтез, пластический обмен)

ПИТАТЕЛЬНЫЕ
ВЕЩЕСТВА



АДФ

Фосфат

АТФ

Низкомолекулярные
соединения

CO_2 H_2O

КАТАБОЛИЗМ (распад, энергетический обмен)

Энергетический метаболизм (биологическое окисление)

- В зависимости от использования кислорода существует два типа биологического окисления:
- **Бродильный метаболизм (брожение)**
- **Окислительный метаболизм (дыхание)**

Типы питания микроорганизмов

- Микроорганизмы ***различаются по типам питания*** в зависимости от усвояемых источников **углерода и азота.**
- В зависимости от источника углерода бактерии подразделяют на ***аутотрофы*** и ***гетеротрофы.***

АУТОТРОФЫ

- **Аутоотрофы** (от греч. *autos* - сам, *trophe* – питание) способны синтезировать все необходимые соединения из простых веществ. Используют в качестве источника углерода углекислый газ и или другие карбонаты.
- К ним относятся большинство бактерий обитающих в почве (нитрифицирующие, серобактерии и пр.)
- Организмы для которых источником энергии является свет называются **фототрофами**.
- **Хемотротрофы** в качестве источника энергии используют органические соединения

ГЕТЕРОТРОФЫ

- **Гетеротрофы** (от греч. *heteros* - другой, *trophe* - питание) используют в качестве источника углерода органические соединения.
- Источником углерода для них являются гексозы, многоатомные спирты и аминокислоты
- Организмы для которых источником энергии является свет называются **фотогетеротрофами**.
Хемогетеротрофы в качестве источника энергии используют органические соединения

Типы питания микроорганизмов

категория	источник энергии	источник углерода	представитель
фотоавтотрофы	Свет	CO ₂	Цианобактерии, лишайники
фотогетеротрофы	Свет	Органические вещества	Фотосинтезирующие бактерии
хемоавтотрофы	Органические вещества	CO ₂	Серобактерии, железобактерии
хемогетеротрофы	Органические вещества	Органические вещества	Простейшие, грибы, большинство бактерий

Механизмы питания микроорганизмов

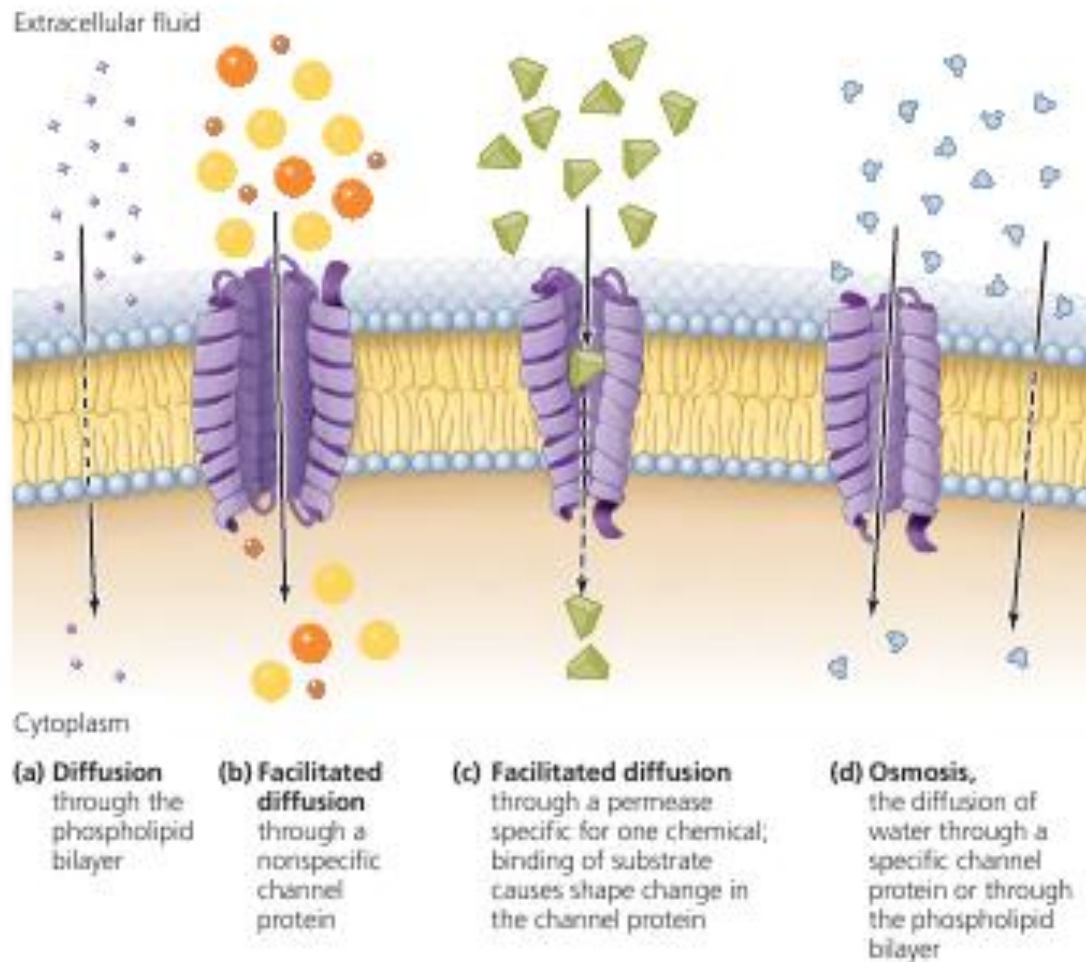
Поступление питательных веществ внутрь микробной клетки осуществляется:

- **Пассивным переносом:**
 - Простая диффузия (перенос веществ из области высокой концентрации в область низкой)
 - Облегченная диффузия (с помощью белков переносчиков – *пермеаз и транслоказ*)
- **Активным переносом:**

Активный транспорт

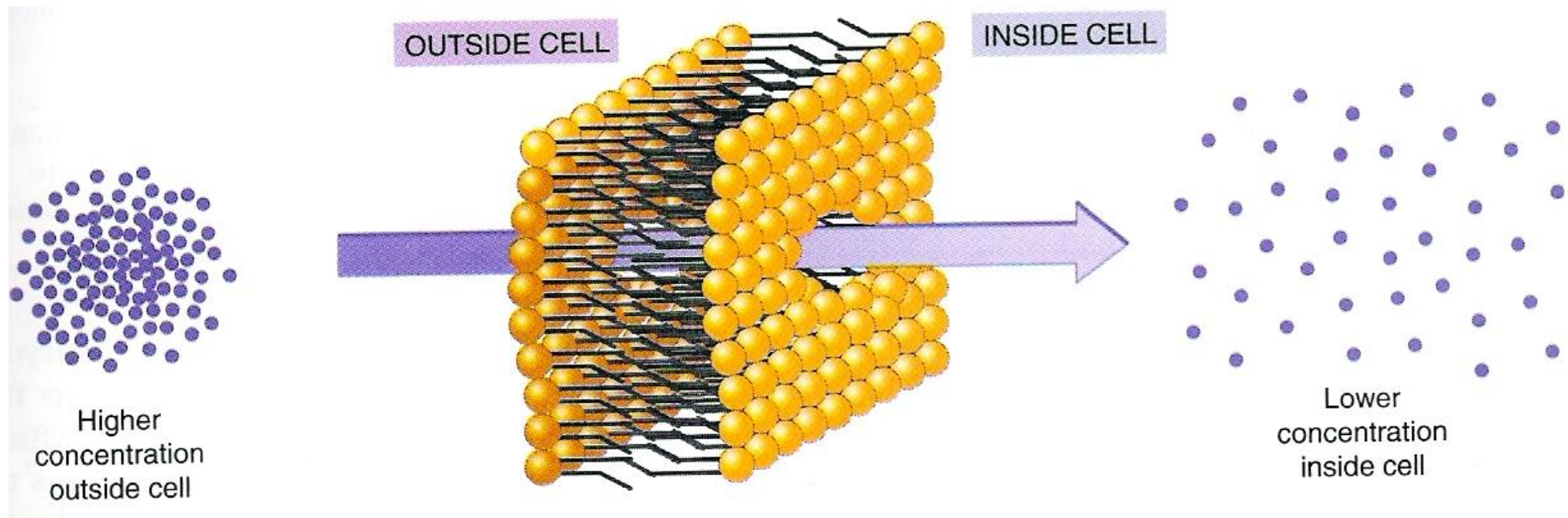
 - *Ионный транспорт (унипорт, симпорт, антипорт)*
 - *АТФ-зависимый перенос*
- Транслокация радикалов (фосфотрансферный путь)

Пассивный перенос веществ

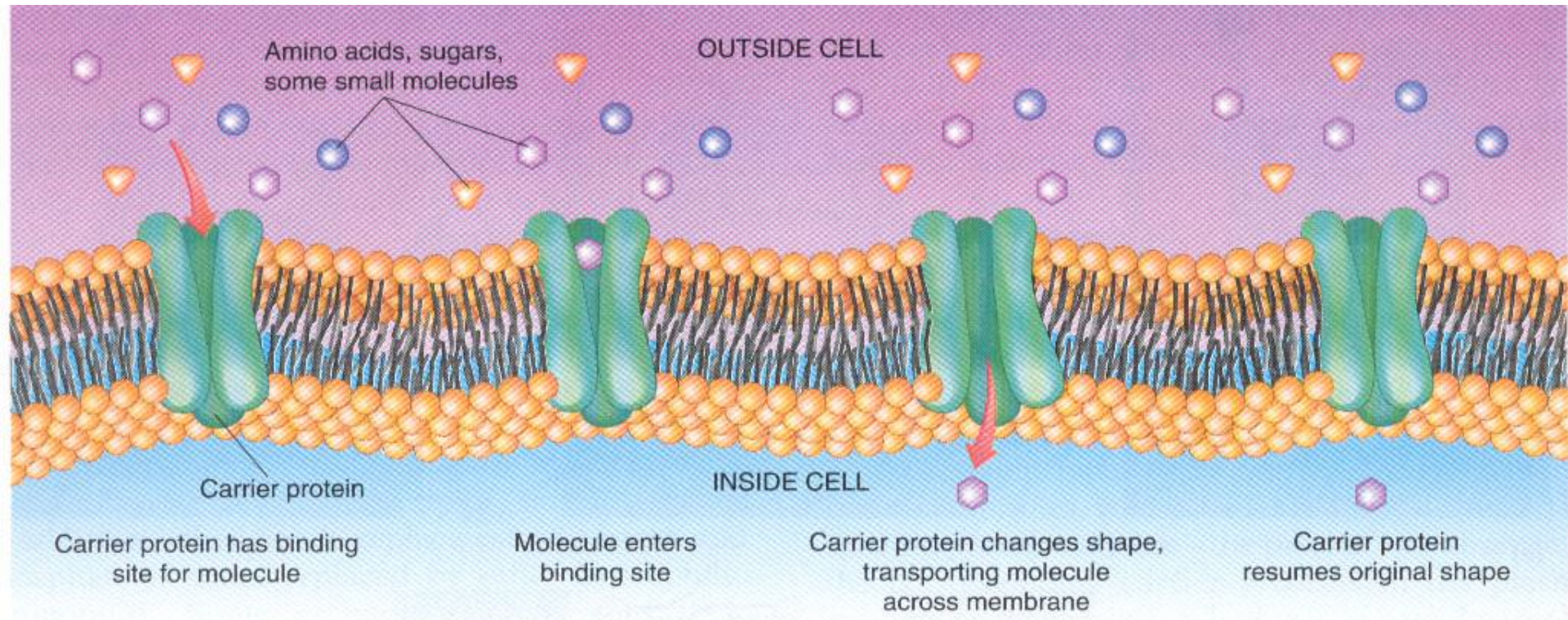


◀ **Figure 3.18** Passive processes of movement across a cytoplasmic membrane. Passive processes always involve movement down an electrochemical gradient. (a) Diffusion. (b) Facilitated diffusion through a nonspecific channel protein. (c) Facilitated diffusion through a specific channel protein. (d) Osmosis through a nonspecific channel protein or through a phospholipid bilayer.

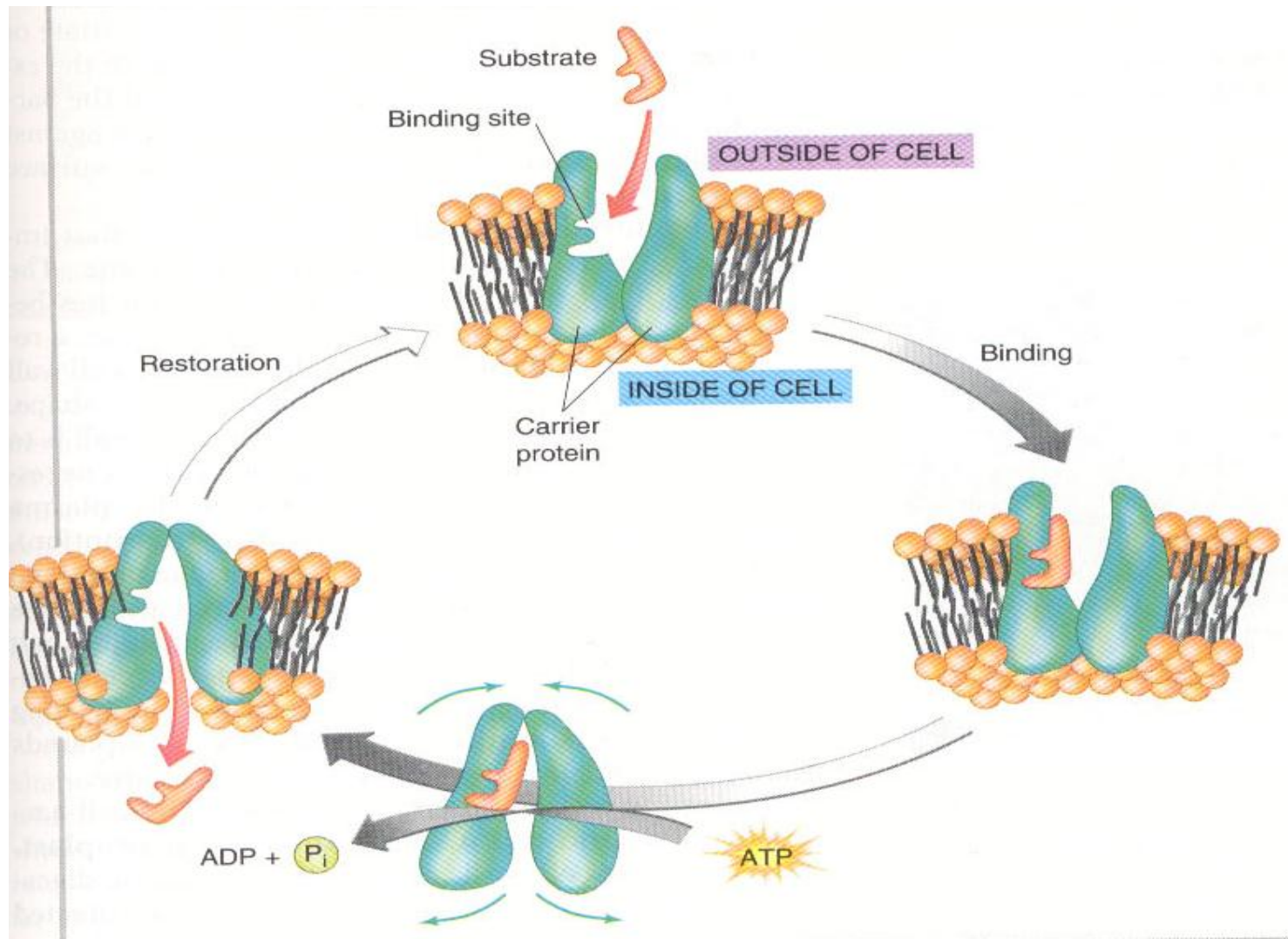
Механизм простой диффузии



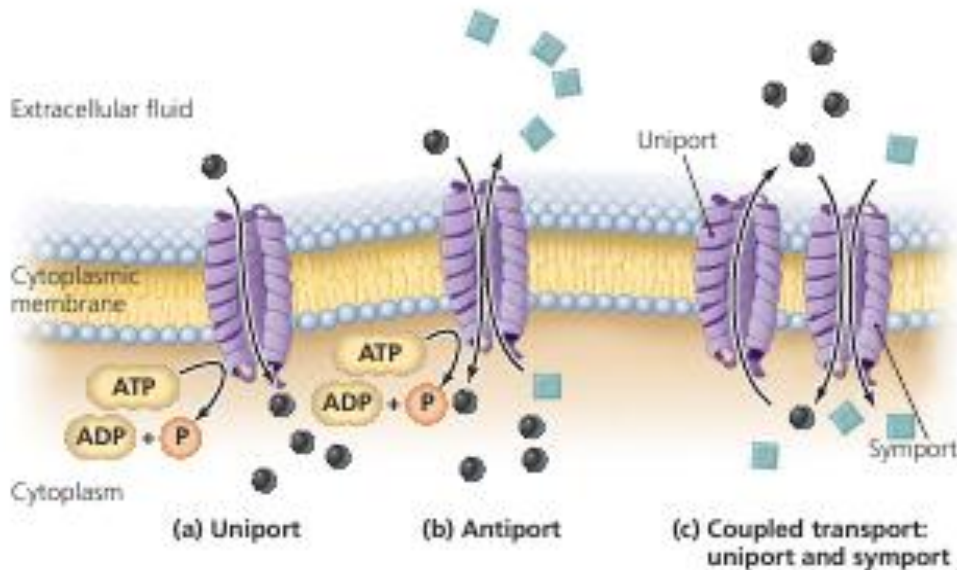
Механизм облегченной диффузии



Механизм активной диффузии



Виды активного транспорта



◀ **Figure 3.21** Mechanisms of active transport. (a) Via a uniport. (b) Via an antiport. (c) Via a uniport coupled with a symport. In this example, the membrane uses ATP energy to pump one substance out through a uniport. As this substance flows back into the cell, it brings another substance with it through the symport. What is the usual source of energy for active transport?

Figure 3.21 ATP is the usual source of energy for active transport processes.

Юнипорт – транспорт веществ независимо от других веществ

Антипорт- перенос вещества сопряжен с противоположно направленным транспортом другого

Симпорт - перенос вещества сопряжен с однонаправленным транспортом другого

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

- Культивирование микроорганизмов в условиях *in vitro* осуществляется на **питательных средах**. Для того чтобы микроорганизмы росли и развивались, питательные среды должны отвечать следующим требованиям:
- Оптимальный состав. В их состав должны входить все необходимые компоненты, которые нужны для развития микробов
- Изотоничность
- Оптимальный pH среды
- Стерильность (необходима для того, чтобы избегать конкурентной борьбы между микробами)
- Определенный окислительно-восстановительный потенциал
- Стандартизированный состав
- Соответствующая вязкость и прозрачность (для лучшего изучения характера микробных колоний)
- Проста в приготовлении и экономически выгодна

Классификация питательных сред

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



Классификация питательных сред

- В зависимости от консистенции питательные среды могут быть **жидкими, полужидкими и плотными.**
- К жидким питательным средам относятся мясо-пептонный бульон (МПБ), пептонная вода и др.
- Для создания полужидких и плотных питательных сред к ним добавляют агар или желатин.



Классификация питательных сред

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



Классификация питательных сред

- В зависимости от цели применения различают :
- **Основные (универсальные) питательные среды** применяют для культивирования большинства неприхотливых микроорганизмов. К этим средам можно отнести МПА, МПБ, пептонную воду.
- **Специальные питательные среды** позволяют культивировать микроорганизмы, не размножающиеся на обычных питательных средах. Н-р, для культивирования менингококков и пневмококков не растущих на обычных средах, применяют кровяные и сывороточные среды.
- К специальным средам относятся **среды обогащения**. Эти среды содержат компоненты (факторы роста) , стимулирующие рост соответствующих микроорганизмов, н-р, среда содержащая селенит натрия стимулирует рост сальмонелл

Питательные среды



Мясо-пептонный агар



Кровяной агар

Классификация питательных сред

- **Элективные питательные среды** используют для культивирования определенного вида микроорганизмов. Н-р, щелочной агар служит для выделения холерного вибриона, в таких условиях ингибируется рост других бактерий; среда с высоким содержанием соли (ЖСА) стимулирует рост стафилококков
- Жидкие элективные среды также можно использовать в качестве сред *обогащения* и *накопления*. При применении таких сред облегчается процесс получения культуры надлежащих микробов из патологического материала. Н-р, для выделения шигелл из испражнений больного дизентерией целесообразно в начале провести инокуляцию материала на селенитовый бульон.

Классификация питательных сред

- **Дифференциально-диагностические среды** позволяют дифференцировать различные микроорганизмы, н-р, на основании их ферментативной активности, и облегчают их идентификацию. К таким средам относятся среда Эндо, Гисса, Клиглера и др.



Комбинированные питательные среды
сочетают в себе селективную среду, и дифференциальную среду. Примером таких сред является среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые для выделения патогенных кишечных бактерий. Обе среды ингибируют рост кишечной палочки

Классификация питательных сред

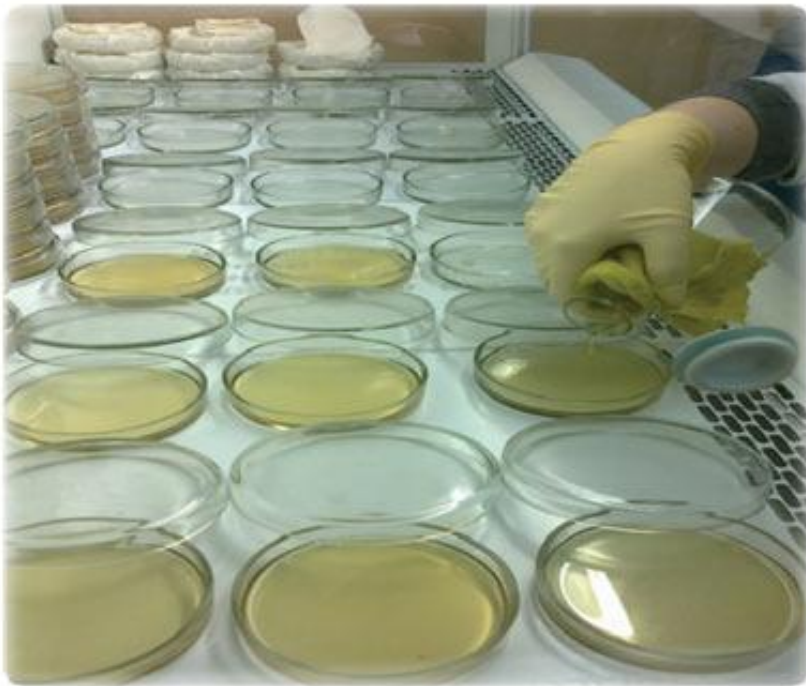
- **Консервирующие транспортные среды** (глицериновая смесь, фосфатный буфер, тиогликолевая среда для анаэробов и др.) применяются для первичной инокуляции и транспортировки патологического материала. Эти среды предупреждают отмирание патогенных микробов и подавляют рост сапрофитов.



Приготовление питательных сред



Приготовление питательных сред



Приготовление питательных сред



Влияние факторов окружающей среды на микроорганизмы

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

Влияние физических факторов на микроорганизмы

- **Температура.** По отношению к температуре все микроорганизмы делятся на три группы:
- ***Психрофильные*** (от греч. *psychros*- холод, *phileo*- люблю) ***микроорганизмы***
 - минимальная t — 0°C , оптимальная— $6-20^{\circ}\text{C}$, максимальная— 30°C
- ***Мезофильные*** (от греч. *mesos*- средний) ***микроорганизмы***
 - минимальная t — 10°C , оптимальная— $34-37^{\circ}\text{C}$, максимальная— 45°C
- ***Термофильные*** (от греч. *termos* - тепло, жар) или теплолюбивые микроорганизмы развиваются при температуре выше 55°C
 - минимальная t — 30°C , оптимальная— $50-60^{\circ}\text{C}$, максимальная— $70-75^{\circ}\text{C}$

Влияние физических факторов на микроорганизмы

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

Влияние физических факторов на микроорганизмы

- **Лучевая энергия.** В природе микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию **солнечной радиации**. Прямые солнечные лучи вызывают гибель многих микроорганизмов в течение нескольких часов.
- Губительное действие солнечного света обусловлено активностью **ультрафиолетовых лучей (УФ-лучи)** с длиной волны 254-300 нм. Они инактивируют ферменты клетки и повреждают ДНК. Патогенные бактерии более чувствительны к действию УФ-лучей, чем сапрофиты.
- Другие виды лучистой энергии - **рентгеновские лучи, α -, β -, γ -лучи** оказывают губительное действие на микроорганизмы только в больших дозах, порядка 440-280 Дж/кг. Гибель микробов обусловлена разрушением ядерных структур и клеточной ДНК. Малые дозы излучений стимулируют рост микробных клеток.
- Бактерицидное действие **ионизирующего излучения** используется для консервирования некоторых пищевых продуктов, **стерилизации** биологических препаратов (сывороток, вакцин и др.)

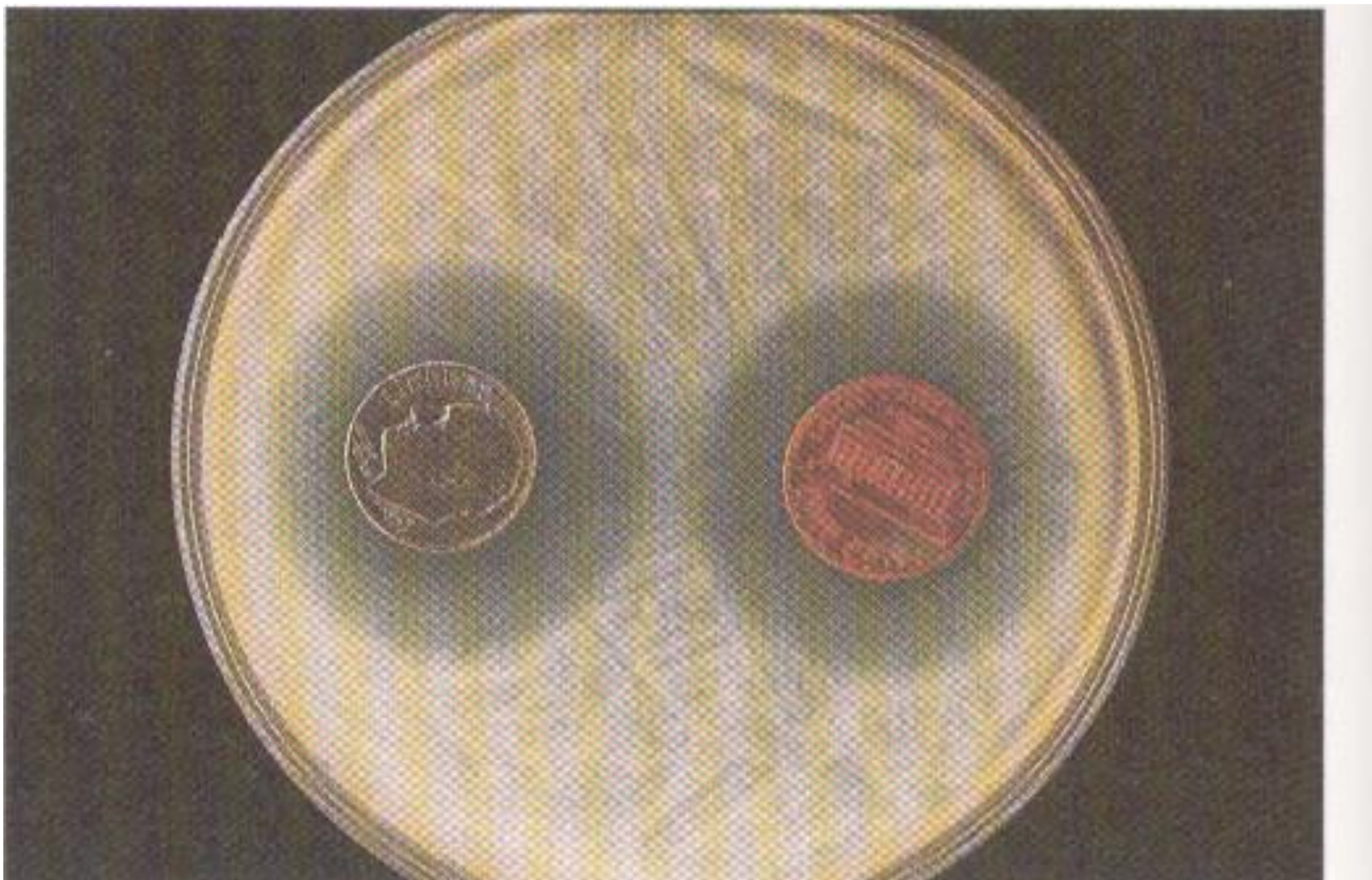
Влияние физических факторов на микроорганизмы

- **Ультразвук** это звуковые волны частотой выше 20 000 Герц . Одним из основных эффектов влияния ультразвука на микроорганизмы является *эффект кавитации* (от лат. *cavatum* - полость).
- **Ультразвук** вызывает значительное поражение микробной клетки. Под действием ультразвука газы, находящиеся в жидкой среде цитоплазмы, активируются, внутри клетки возникает высокое давление (до 10000 атм.) и образуются кавитационные полости. Это приводит к разрыву клеточной оболочки и гибели клетки.
- Ультразвук используют для стерилизации пищевых продуктов (молока, фруктовых соков), питьевой воды.
- **Высокое давление** . Высокое атмосферное давление не губительно для большинства микроорганизмов. В природе встречаются даже бактерии, живущие в морях и океанах на глубине 1000-10000 м под давлением от 100 до 900 атм. Некоторые виды бактерий выдерживают давление до 3000-5000 атм, а бактериальные споры - даже 20000 атм.
- Примечательно, что воздействие *насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного* приводит к гибели как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов. Этот способ **стерилизации паром под давлением** производят в автоклаве

Дезинфектанты и антисептики

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

Антимикробная активность солей тяжелых металлов (серебро и медь)



Влияние химических факторов на микроорганизмы

- **Дезинфекция** (обеззараживание) это уничтожение патогенных микроорганизмов в различных объектах окружающей среды. Химические вещества, используемые для уничтожения микроорганизмов называются *дезинфицирующими*.
- Вещества, характеризующиеся выраженным антимикробным эффектом, но не обладающие токсичностью для макроорганизма, называются *антисептическими средствами* и применяются для гибели или подавления роста микробов, контактирующих с поверхностью кожи, слизистых оболочек и ран.
- **Антисептика** - комплекс мер, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране, целом организме или на объектах внешней среды, с применением различных обеззараживающих химических веществ.
- Антисептика включает комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов в патологическом очаге, ране или другом объекте.
- **Асептика** —комплекс профилактических мероприятий, препятствующих микробному загрязнению различных объектов (раны, операционного поля, кожи и слизистых и т. д.).

Асептика и антисептика



Асептика

- Стерилизацию белья и перевязочных материалов проводят в автоклавах, для контроля стерилизации в пробирку набирают бензоловую кислоту и пирамидон или резорцин, и если в конце стерилизации эти вещества расплавляются и превращаются в массу, это означает что стерилизация проведена должным образом.
- Стерилизацию хирургических инструментов проводят в специальных стерилизаторах, но прежде их промывают механическим способом, затем помещают в емкость с кипящей водой, добавляют 1-2% раствор соды, кипятят 20-30 мин
- С целью профилактики воздушно-капельных инфекций, лица входящие в операционную должны надевать маски и бахиллы. Разговоры строго запрещены. Целесообразно применение бактерицидных ламп

Антисептика

- **Антисептика** — это система мер, способствующая уменьшению и уничтожению микробов в ране. Различают механическую, физическую, химическую, биологическую антисептику.
- **Механическая антисептика** — первичная хирургическая обработка инфицированной раны, т. е. удаление омертвевших и нежизнеспособных тканей с краев и со дна раны.
- **Физическая антисептика** — проводится с помощью гигроскопичных ватных тампонов, высушивающих тампонов, присыпок, дренажа и пр. с целью предотвращения размножения микробов и накопления токсических веществ в ране

Антисептика

- **Химическая антисептика** – использование химических веществ, создающих неблагоприятные условия для микробов, останавливающие рост, развитие или вызывающие их гибель. Наиболее часто используемые:
- Нитрат серебра 1:500-1:3000 для промывания, 1% раствор бриллиантового зеленого - для обработки ран, 1% йод, йодиол - для промывания ран, операционного поля, для мытья рук, 2-5% раствор карболовой кислоты - для мытья перчаток и инструментов, формалин (40 %), фурациллин (1:5000), хлорамин (0,5-2%) и др.
- **Биологическая антисептика** – использование инъекций (в/в, в/м, в различные полости), ингаляций, а также путем введения антибиотиков на поверхность или внутрь раны

СТЕРИЛИЗАЦИЯ

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

Стерилизация физическими методами

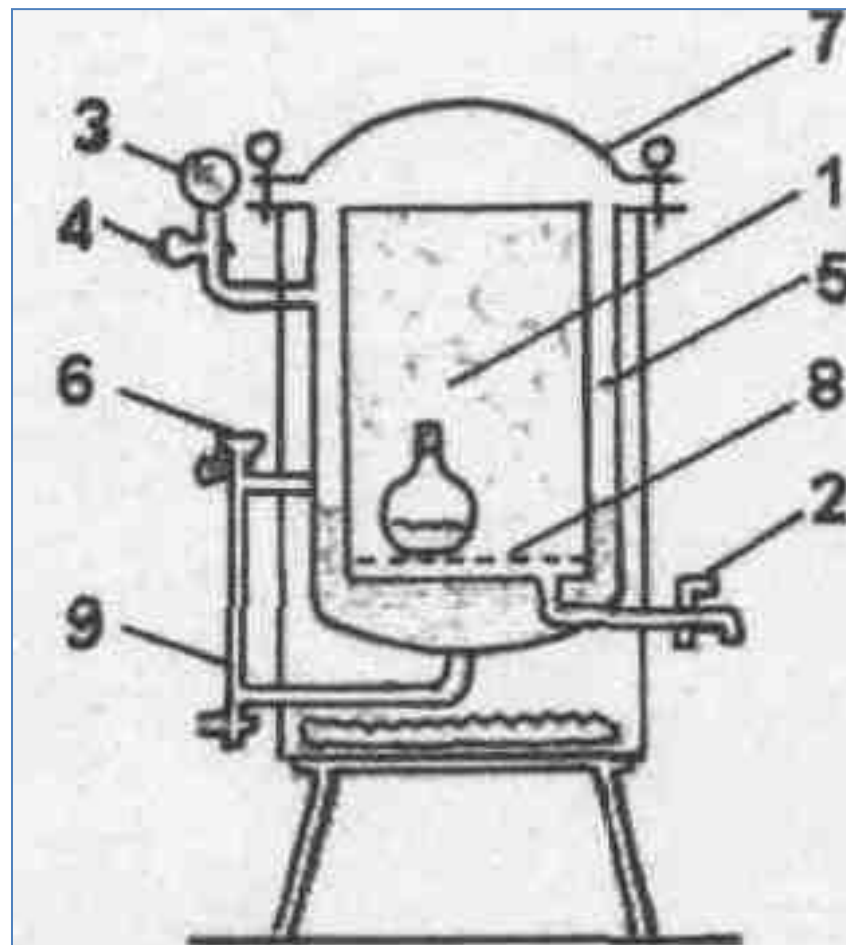
(тепловая стерилизация)

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

ВОЗДУШНЫЙ СТЕРИЛИЗАТОР



Принцип работы автоклава



Физическая стерилизация

(лучевая стерилизация)

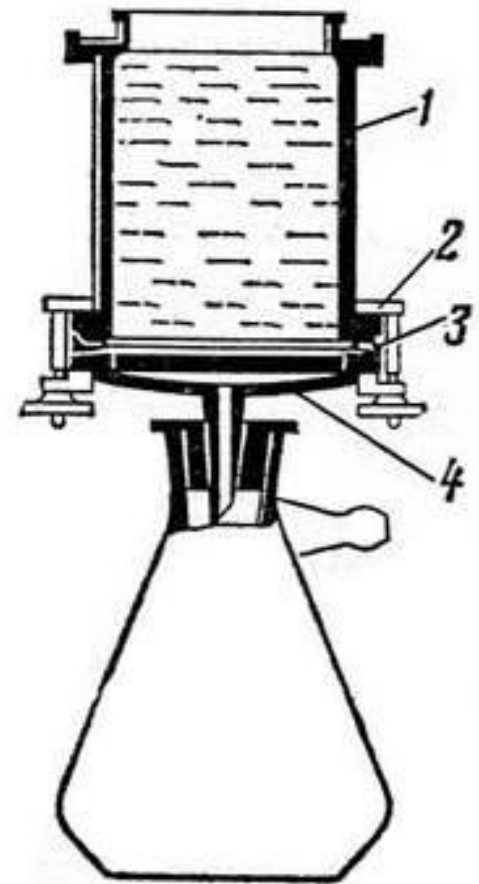
- Используется для стерилизации термолабильных материалов.
- Применение **УФ-излучения** для стерилизации ограничено его низкой проникаемостью и высокой поглотительной активностью воды и стекла
- **Рентгеновское и гамма излучение.** Работа с ними требует строго соблюдения правил безопасности. Применяют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

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами (бактерицидные лампы)



Механическая стерилизация

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



Химическая стерилизация

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

Контроль за качеством стерилизации

- Химический контроль — используются вещества с известной температурой плавления (сера - 119°C , бензойная кислота — $120\text{-}122^{\circ}\text{C}$, бензонафтол - 110°C , манноза и карбамид- $132\text{-}133^{\circ}\text{C}$) и индикаторные бумажки температурного режима. Оценка контроля осуществляется на основании изменений происходящих с указанными веществами, которые помещают в автоклав вместе со стерилизуемым материалом.
- Биологический контроль — проводится с применением биотестов (бумажные полоски с нанесенными на поверхность споровыми бактериями устойчивыми к температуре). Оценка контроля осуществляется на основании гибели споровых бактерий на поверхности бумажек, которые помещают в автоклав вместе со стерилизуемым материалом.