

DYNAMIKA BAKTERIÁLNÍHO RŮSTU

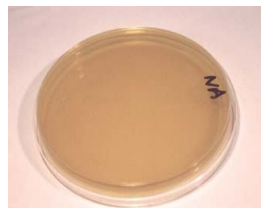
Úvod

- Bakterie mohou přežívat za velice rozdílných podmínek prostředí
- Jednotlivé druhy však rostou za limitovaných podmínek prostředí

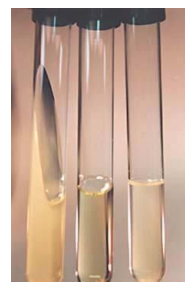
Bakteriální kolonie

- V přírodě existují bakterie jako směsné populace různých druhů a rodů, které se adaptovaly na dané prostředí
- Čistá kultura
 - Obsahuje bakterie pouze jednoho druhu
- Kolonie
 - Populace buněk vytvořená z jednotlivé bakteriální buňky imobilizovaná na pevném povrchu

Kultivační média



Agarová plotna



Šikmý agar, tekuté médium, hluboký agar

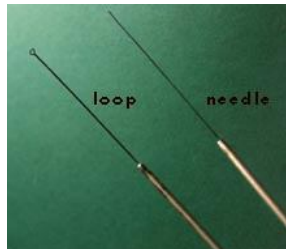
Metody čisté kultury

- Metoda křížového roztěru
 - Na agar v Petriho misce se postupně roztírají bakterie pomocí bakteriální kličky
- Agar
 - Polysacharid mořské řasy
 - Stabilní při vysokých teplotách
 - Zkapalňuje nad 95°C, tuhne při 50°C
 - Většina bakterií ho nedegraduje

Metody čisté kultury

- Metoda ředění
 - Na agar v Petriho misce se pipetuje ředěná suspenze bakterií, která se roztírá pomocí hokejky
- Metoda nalévání
 - Ředěná suspenze bakterií se smíchá s teplým agarem a nalije se do sterilní Petriho misky nebo se suspenze bakterií nanese na Petriho misku a zaleje se teplým agarem

Aseptický přenos



Učebnice Madigan a kol., obr. 5.4, str. 113

Aseptický přenos

Metoda křížového roztěru



Růst bakterií

- Bakterie se množí podvojným dělením

Učebnice Madigan a kol., obr. 6.1, str. 142

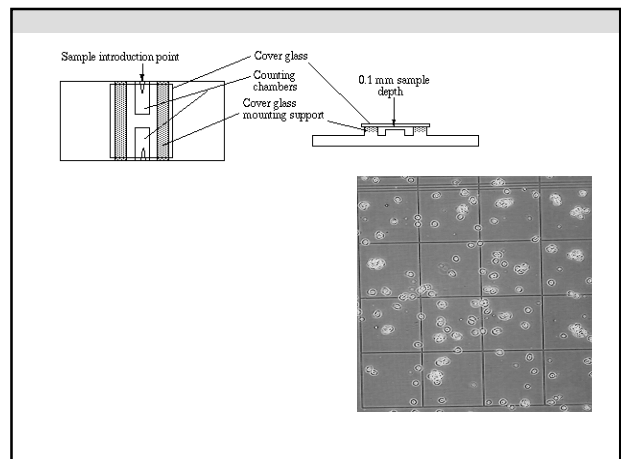
Měření růstu bakterií

- Růst bakterií se měří jako nárůst počtu buněk
 - U mnohobuněčných organismů se růst měří jako zvětšování jednotlivého organismu
- Generační doba
 - Doba potřebná k rozdělení jedné buňky na dvě (u většiny bakterií v rozmezí 0,5 až 6 h)
- Bakterie se množí exponenciálně
 - Počet buněk se zpočátku zvyšuje pomalu, stále se zrychluje

Metody měření bakteriálního růstu

- Rozptyl světla (OD_{600})
 - Měří živé i mrtvé buňky
 - 10^6 bakterií nevytváří žádný zákal
 - Nepřímá metoda
- Počítání kolonií na agarové plotně
 - Pouze živé buňky
 - Velice citlivá, ale pomalá metoda
 - Postupné ředění
- Počítání buněk pod mikroskopem
 - Počítací komůrka (destička s rýhami a mřížkou)
 - Živé i mrtvé buňky
 - Alespoň 10^7 buněk

Učebnice Madigan a kol., obr. 6.15, str. 154, obr. 6.16, str. 155



Fáze bakteriálního růstu

Učebnice Madigan a kol., obr. 6.10, str. 150

Růstová křivka

Popis fází růstové křivky

- **Lag fáze**
 - Počet buněk se téměř nezvyšuje, buňky se adaptují na nové prostředí
 - Buňky se prodlužují, syntetizují makromolekuly
- **Exponenciální fáze**
 - Počet buněk se exponenciálně zvyšuje
 - Podmínky pro růst jsou optimální
- **Stacionární fáze**
 - Vyčerpání živin
 - Akumulace odpadních produktů a sekundárních metabolitů
 - Rychlost růstu je stejná jako rychlost odumírání buněk
 - Bakteriální populace se nezvětšuje
- **Fáze odumírání**
 - Exponenciální pokles počtu živých buněk

Růst bakteriální kolonie

- Zvětšování kolonie na agaru je důsledkem množení buněk na okraji kolonie
- V jedné kolonii se buňky nacházejí v různých růstových fázích

Faktory ovlivňující bakteriální růst

- Přírodní faktory
- Nutriční faktory

Přírodní faktory

- Teplota
- Množství kyslíku
- pH
- Osmotický tlak

Teplota

- **Psychofilní** organismy (-5 až +20°C)
 - Psychrotolerantní organismy (optimum při 20-40°C, schopen růstu při 0°C)
- **Mesofilní** organismy (20 až 50°C)
- **Termofilní** organismy (50 až 80°C)
- **Hypertermofilní** organismy (nad 80°C)
- Termotolerance je dána strukturou proteinů
 - Kovalentní disulfidové vazby a vodíkové a jiné slabé vazby zabraňují denaturaci proteinů
 - Podíl α -helixů a β -struktur
- Rozdíly ve struktuře membránových lipidů
 - Podíl nenasycených a nasycených mastných kyselin

Kyslík

- **Obligátně (přísně) aerobní** mikroorganismy
 - K množení potřebují kyslík
 - *Pseudomonas*, *Bacillus*
 - **Obligátně (přísně) anaerobní** mikroorganismy
 - Nemohou se množit v přítomnosti kyslíku
 - *Clostridium*
 - **Fakultativně anaerobní** mikroorganismy
 - Mohou se množit i za nepřítomnosti kyslíku
 - Rostou obvykle rychleji za přítomnosti kyslíku
 - *Saccharomyces*, *Escherichia coli*
 - **Mikroaerofilní** mikroorganismy
 - Vyžadují malé množství kyslíku (2 – 10%)
 - *Helicobacter pylori*
 - **Aerotolerantní** mikroorganismy
 - Indiferentní ke kyslíku
 - *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus*
- Učebnice Madigan a kol., obr. 6.27, str. 169
Thioglykolátové médium

Enzymatické rozdíly mezi aeroby a anaeroby

- Aerobní mikroorganismy mají metabolické dráhy, které vyžadují kyslík pro tvorbu energie
- Aerobní bakterie mají prostředky k detoxifikaci toxických forem kyslíku (peroxidu, superoxidu)
- Detoxifikační enzymy
 - Katalasa ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)
 - Superoxid dismutasa ($\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)
- U některých obligátních anaerobů je superoxid odstraněn pomocí superoxid reduktasy
 - Tvorba peroxidu bez tvorby kyslíku

pH

- **Neutrofilní** organismy
 - Většina bakterií roste nejlépe při neutrálním pH
 - Většina přírodních prostředí pH 5-9
- **Acidofilní** organismy
 - Některé bakterie mohou růst v extrémně kyselém prostředí
 - *Helicobacter pylori*
 - *Thiobacillus*
 - Houby preferují kyslejší prostředí
- **Alkalifilní** organismy
 - Několik druhů roste při vysokém pH
- pH uvnitř buňky většiny mikroorganismů je přibližně neutrální

Osmotický tlak

- Tlak nutný k zabránění volnému toku vody přes semipermeabilní membránu (např. cytoplasmatickou)
- Je určen koncentrací látek rozpuštěných v růstovém médiu
 - Souvisí s dostupností tzv. volné vody
- Za normálních podmínek je uvnitř buňky mírně vyšší osmotický tlak než vně
 - Voda vtéká do buňky
- Buňky jsou do určité míry schopny kompenzovat vysoký externí osmotický tlak
 - Zvyšování vnitřní koncentrace rozpuštěných látek
 - Permeasy
 - Syntéza aminokyselin, cukrů, alkoholů
- Využití inhibičního účinku solí při uchovávání (konzervaci) potravin

Osmotický tlak

- **Halofilní** organismus
 - 1-15% NaCl
- **Halotolerantní** organismus
 - Optimální růst bez rozpuštěných látek
 - Tolerují určité koncentrace
 - *Staphylococcus aureus*
- **Extrémně halofilní** organismus
 - Vyžadují 15-30% NaCl
- **Osmofilní** organismus
 - Schopen růstu při vysokých koncentracích cukrů
- **Xerofilní** organismus
 - Schopen růstu v podmínkách nedostatku vody

Nutriční faktory

- Množení buněk vyžaduje zdroj energie a základní materiál pro syntézu buněčných součástí
- Organismy se dělí do skupin dle
 - Zdroje energie (foto-, chemo-, litho-)
 - Zdroje uhlíku (heterotrofní, autotrofní)

Dělení organismů dle zdroje energie a uhlíku

- **Fotoautotrofní organismy**
 - Světelná energie, CO_2
- **Fotoheterotrofní organismy**
 - Světelná energie, organická sloučenina
- **Chemoautotrofní organismy**
 - Chemická energie, CO_2
- **Chemoheterotrofní organismy**
 - Chemická energie, organická sloučenina
- **Zdroj chemické energie**
 - Anorganický
 - (Chemo)litolotrofní organismus
 - Organický
 - (Chemo)organotrofní organismus
 - Lithoheterotrofní (mixotrofní) organismy
 - Anorganický zdroj energie, organická sloučenina jako zdroj uhlíku

Minerální látky

- Všechny organismy potřebují zásobu minerálních látek
 - Dusík
 - Síra
 - Fosfor
 - Hořčík
 - Draslík
 - Železo
 - Stopové prvky (Co, Zn, Mo, Mn)
- Součást nukleových kyselin, aminokyselin, proteinů, vitamínů

Růstové faktory

- Malé organické molekuly, odlišné od zdrojů energie, které musí být buňce dodány k tomu, aby rostla
- Mnohé bakterie jsou schopny syntetizovat ATP (zdroj energie) a komplexní molekuly (např. nukleové kyseliny a proteiny)
- Pokud postrádají enzymy nutné pro syntézu malých molekul (aminokyseliny, vitamíny, puriny, pyrimidiny), musí jim být tyto látky dodány

Kultivace bakterií v laboratoři

- **Syntetická** (chemicky definovaná) média
 - Obsahují přesná množství čistých chemikálií
- **Komplexní** (obohacená, nedefinovaná) média
 - Obsahují rozkladné produkty z masa, rostlin, kvasnic, tj. ne přesně definované živiny, které se však přidávají ve známém množství
- Tekutá média (bujóny)
- Pevná média („agary“)

Problémy spojené s kultivací bakterií v laboratoři

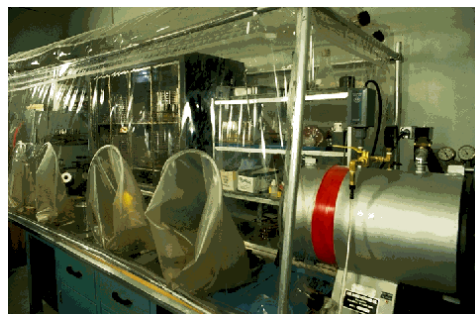
- Neexistuje jedno médium, na kterém by rostly všechny bakterie
- Důvody
 - Mohou být přítomny toxické látky
 - Jsou potřeba neobvyklé růstové faktory
 - Některé bakterie rostou pouze ve směsné kultuře (jedna bakterie poskytuje to co potřebuje druhá)
- Anaerobní organismy vyžadují speciální kultivační metody

Kultivace anaerobů

- Použití anaerobní nádoby (anaerostat)
 - Obsahuje chemikálie produkující vodík a katalyzátor, na kterém vodík reaguje s volným kyslíkem na vodu
- Přídavek chemikálií, které reagují s kyslíkem, do kultivačního média
 - Thioglykolát sodný, cystein, kyselina askorbová
- S některými přísně anaerobními mikroorganismy je veškerá manipulace nutná za anaerobních podmínek
 - Anaerobní komory
 - I krátkodobý kontakt s kyslíkem vede k usmrcení mikroorganismu



Kultivace anaerobů v anaerostatu



Anaerobní komora

Kultivace minoritní složky v mikrobiální populaci

- Obohacovací kultura
 - Složení média (přítomnost zdrojů energie, uhlíku, dusíku) a kultivační podmínky (např. světelné) zvyšují růst bakterie, o kterou se zajímáme
- Selektivní média
 - Médium obsahuje látku, která inhibuje růst nechtěného mikroorganismu
 - Pro izolaci nutričně náročných mikroorganismů z populace méně náročných
- Indikátorová (diferenční) média
 - Pro stanovení přítomnosti organismu bez jeho izolace
 - Využití specifických vlastností mikroorganismu na agarovém médiu

Růst bakterií v přírodě

- V laboratorních podmínkách rostou bakterie obvykle v uzavřeném systému
 - Živiny se neobnovují
 - Odpadní produkty se neodstraňují
- V přírodních podmínkách je typický otevřený systém
- Otevřený systém může být simulován pomocí chemostatu
 - Kontinuální přísun živin a odsun buněk a odpadních produktů
 - Lze ovlivňovat
 - Generační čas (funkce rychlosti přísunu čerstvého média)
 - Hustotu buněk (funkce koncentrace limitující živiny)