

Růst a množení mikroorganismů

Růst a množení

- Růst – mikrobiální buňka se nachází ve vhodném fyzikálně - chemickém prostředí, přijímá živiny a syntetizuje “sama sebe“, zvětšuje svoji hmotnost i objem
- Množení – po dosažení daného objemu a hmotnosti se buňka rozdělí ve dvě dceřinné buňky

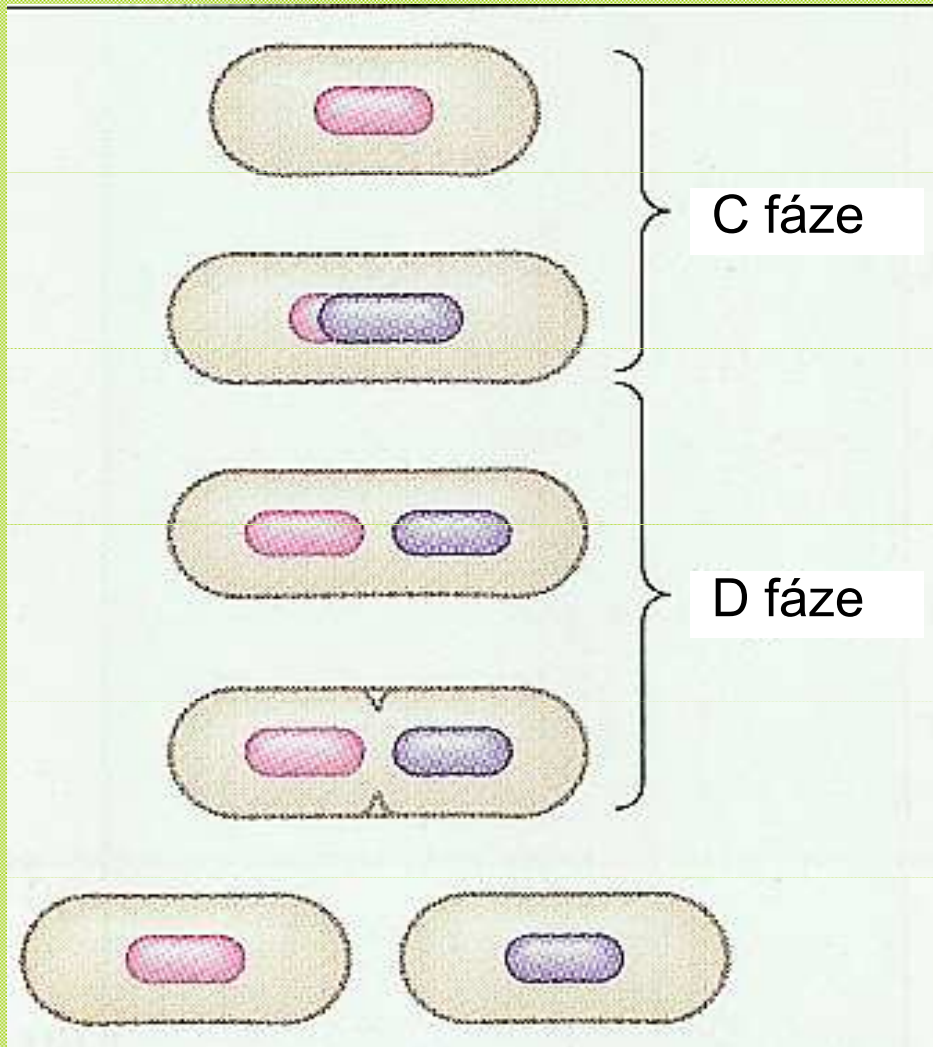
Růst a množení

- Růst jednotlivé buňky – **vyvážený** – hmotnost, objem, obsah DNA, peptidoglykanu atd. roste za časovou jednotku rovnoměrně. Jestliže nejsou splněny podmínky, jde o růst **nevyvážený**.
- Růst populace – pokud jednotlivé buňky populace vykazují růst vyvážený, nachází se populace v **ustáleném stavu** (ve stavu dynamické rovnováhy)

Další aspekty růstu

- Růst nelimitovaný – všechny živiny jsou v nadbytku po celou dobu kultivace (20' - 48h – 1000x Země)
- Růst v tekutém prostředí (ve formě homogenní suspenze) nebo na/v zpevněném prostředí (ve formě kolonií)
- Růst v přirozeném prostředí a v prostředí *in vitro*
- Růst v prostředí homogenním (fermentor) a nehomogenním (půda, voda)
- Růst v prostředí chemicky definovaném
- Růst v otevřeném (kontinuální kultivace) a uzavřeném (zkumavka) systému
- Růst čisté a směsné kultury

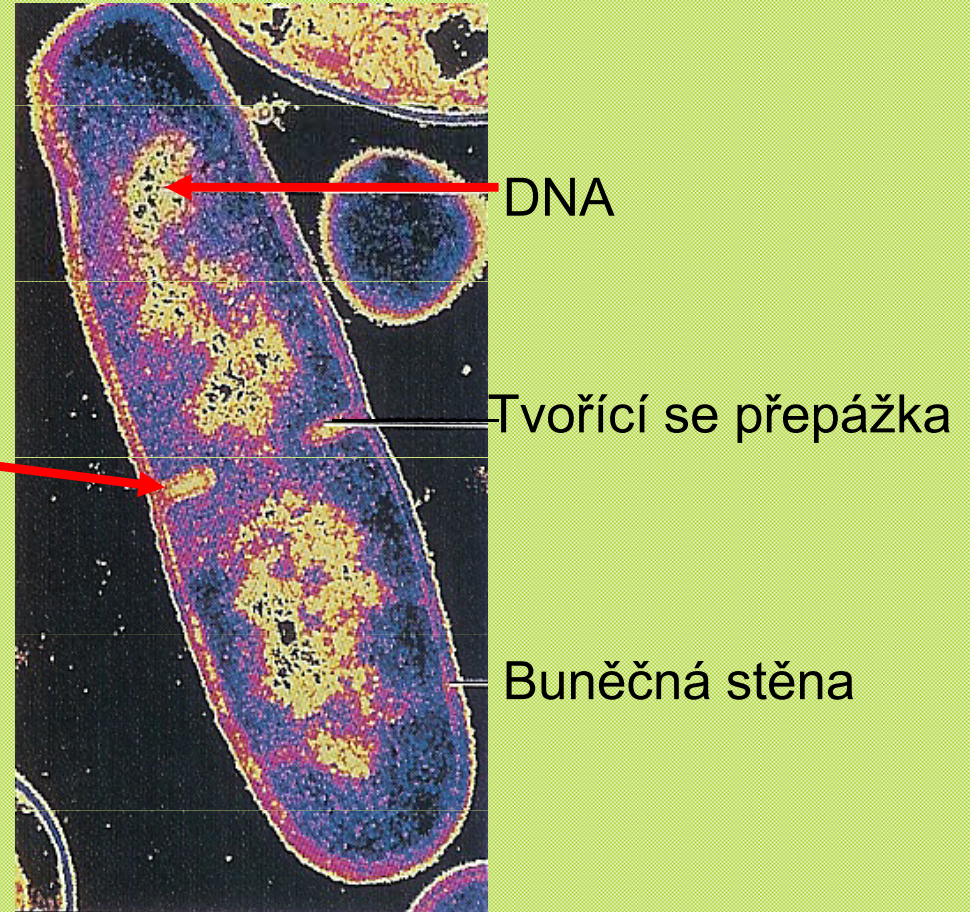
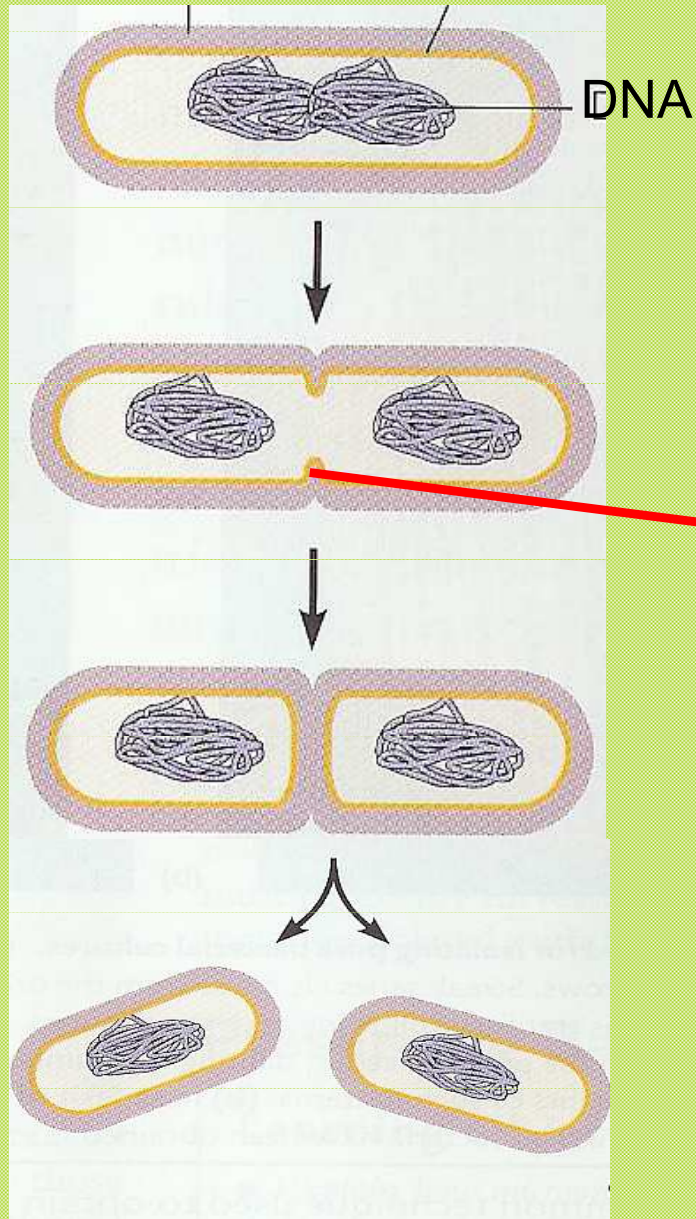
Životní cyklus u bakterií



- **C fáze** – zvětšování objemu buňky (Syntéza materiálu buňky včetně syntézy buněčné stěny –vkládáním stavebních jednotek na specifická místa). Začátek replikace bakteriálního chromozomu (na iniciaci se podílí produkt dnaA genu)
- **D fáze** – dokončení replikace DNA, vytváření septa (přepážka tvořená cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou). Dokončení rozdělení buňky ve dvě buňky dceřinné
- Životní cyklus trvá od 20 do 60 minut
- Doba trvání jednotlivých fází je téměř konstantní asi 41 min. – C, 20 min. – D
- Takže v populaci s dobou zdvojení 20 min., musí se zdvojit všechny parametry (včetně DNA), tzn. že replikace DNA začne po 20 min. bez ohledu na to, zda předtím zahájené replikace skončily či nikoliv

Dělení buněk

Buněčná stěna Cytoplazmatická membrána

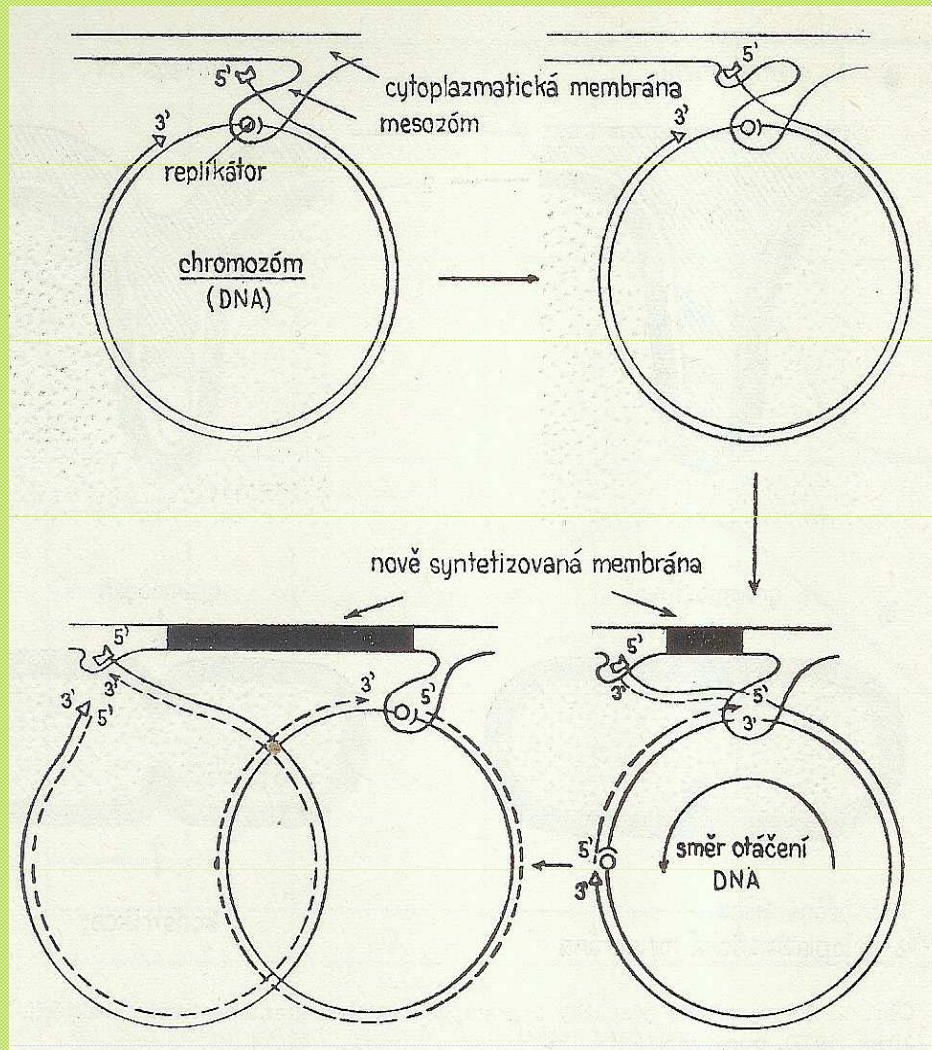


DNA

Tvořící se přepážka

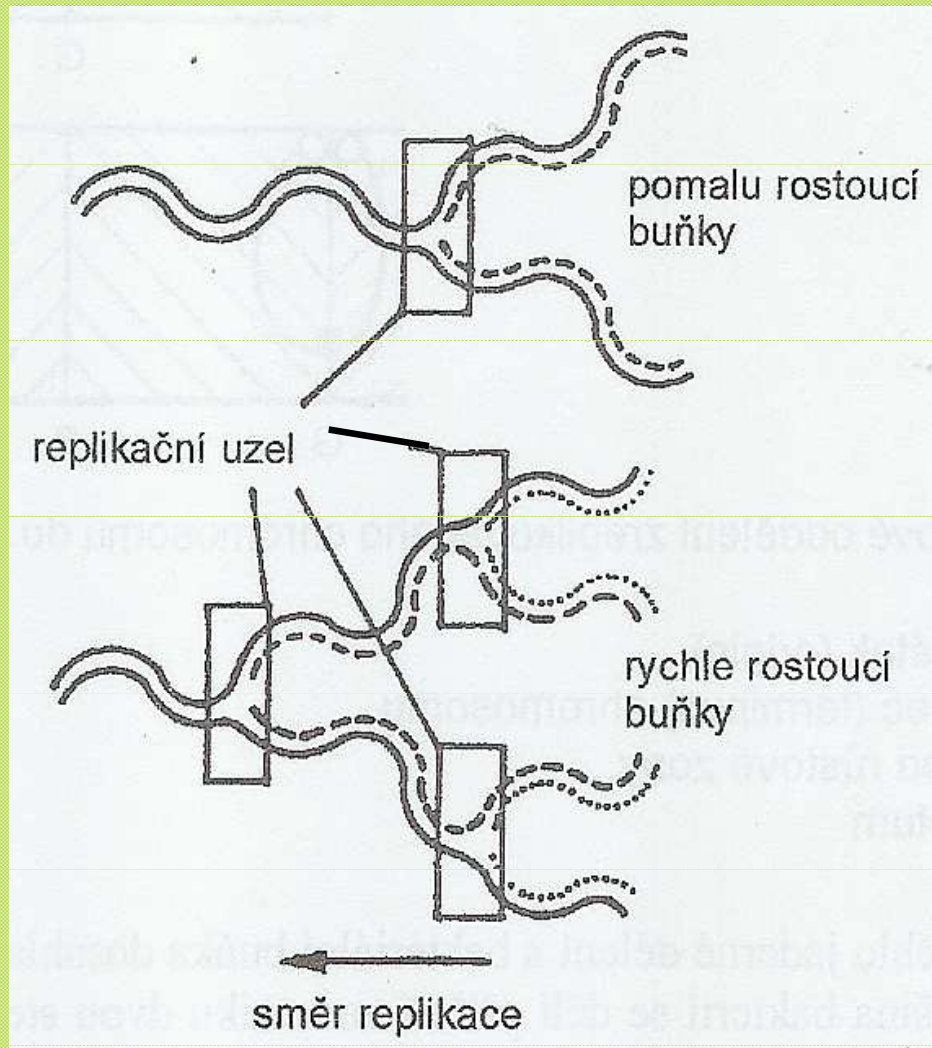
Buněčná stěna

Replikace bakteriálního chromozomu



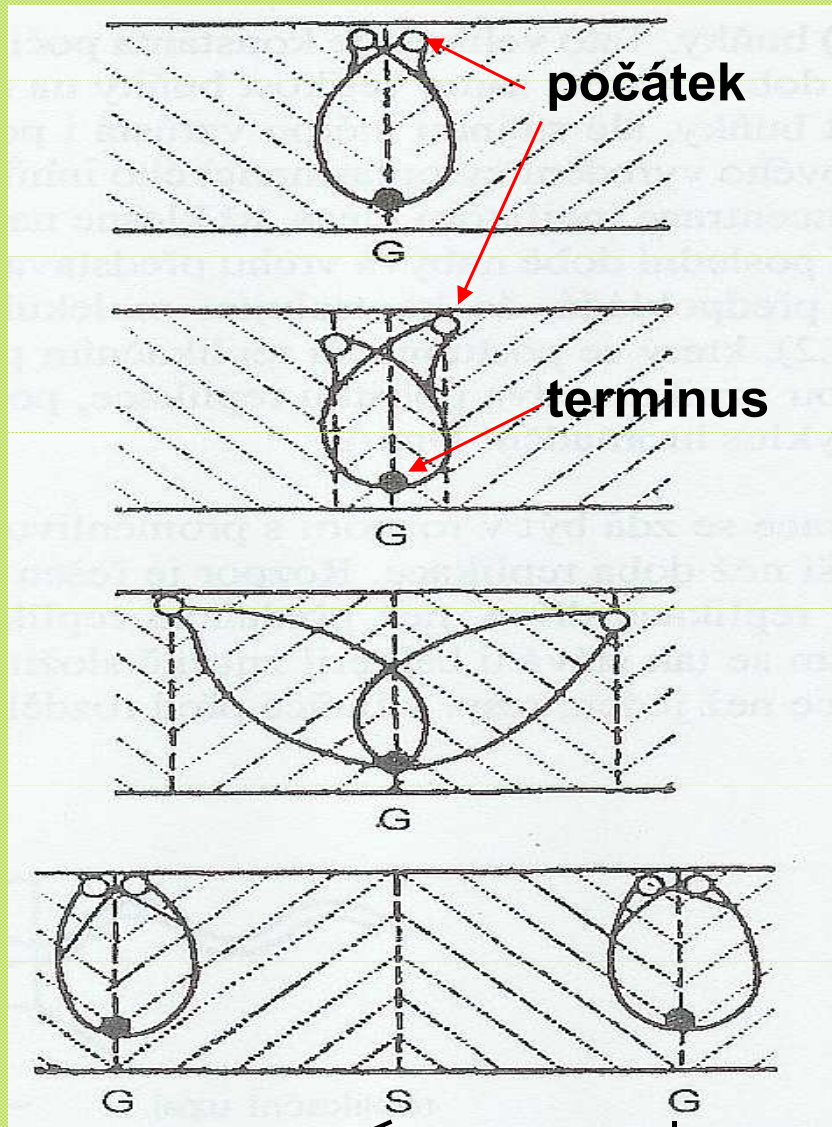
- Připojení chromozomu na specifické místo – **replikátor** – na cytoplazmatické membráně (na mezozómu)
- Vlastní replikace chromozomu od místa **origin** postupuje obousměrně. Rychlost inserce je 1700 nukleotidů za sekundu v replikační vidličce
- Ukončení replikace je nutné pro vytvoření **transverzálního septa**
- **Překryvná replikace** – nová replikace chromozomu začíná před dokončením předchozí replikace

Replikace bakteriálního chromozomu

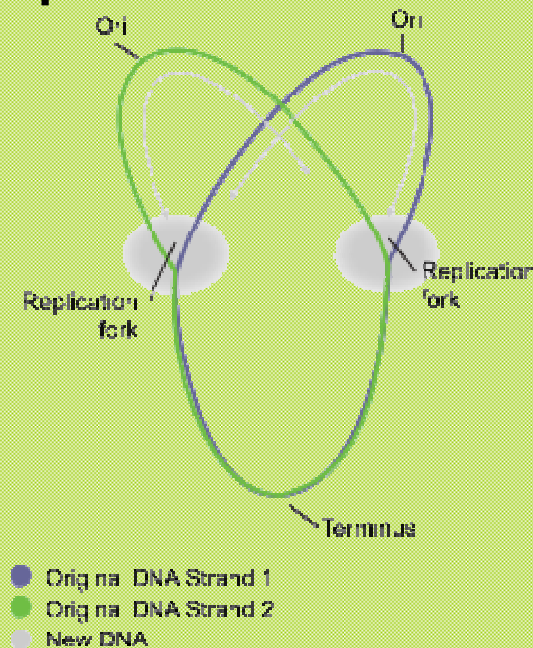


- Pokud buňky rostou za “normálních” podmínek počátek replikace chromozomu je dán parametry buňky (velikost, hmotnost,...)
- Při růstu v suboptimálních podmínkách může docházet k překryvné replikaci, takže mateřská buňka může obsahovat chromozom prappravnučky

Replikace bakteriálního chromozomu

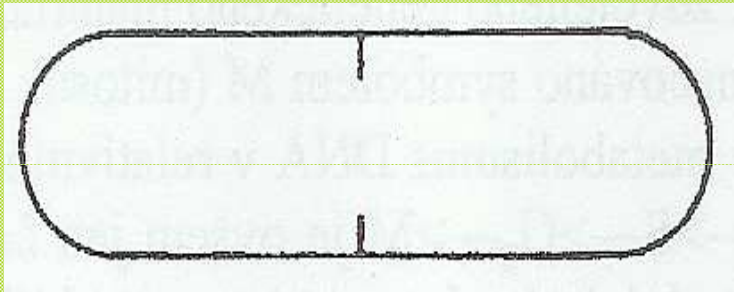


- Prostorové oddělení chromozomů
- *u eukaryot – vřeténkem
- *u prokaryot intenzivním lokálním růstem mezi místy připojení chromozomů k cytoplazmatické membráně

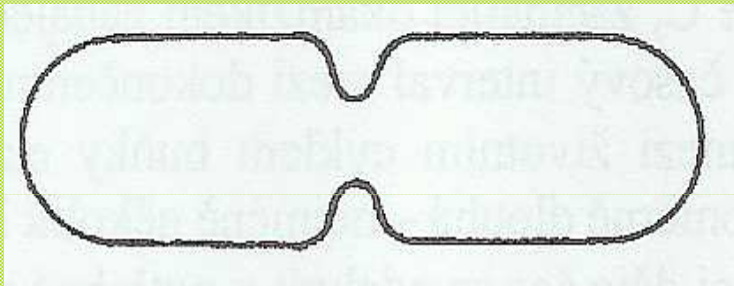


Tvorba septa – dělení buňky

Bez konstriktce u většiny G+

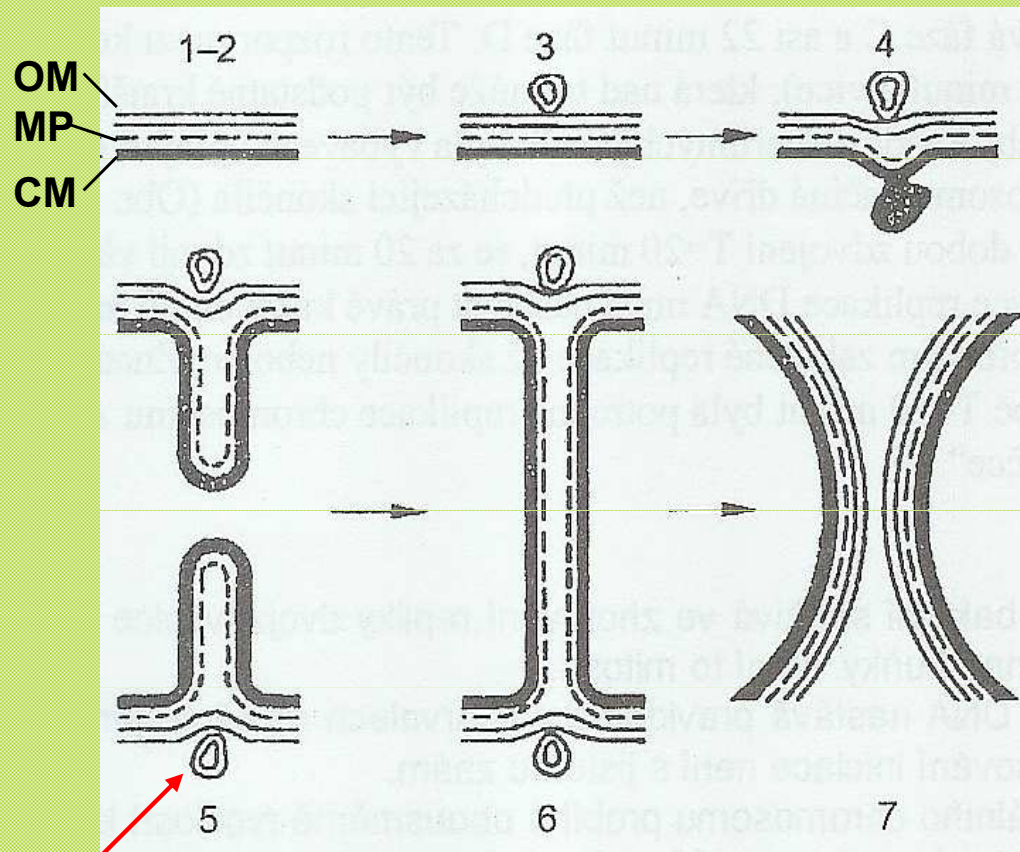


S konstrikcí u většiny G-



- Proces tvorby septa je zahájen invaginací cytoplazmatické membrány
- Růst stěny, tvorba přepážky je umožněna působením enzymů hydrolyzujících vazby peptidoglykanu – **autolyzinů**. Tak vznikne prostor pro vložení nových stavebních částí do peptidoglykanu.
- Peptidoglykan roste do délky s buňkou (G+) nebo dostředným růstem (G-)

Tvorba septa u *Escherichia coli*



Mimobuněčné měchýřky

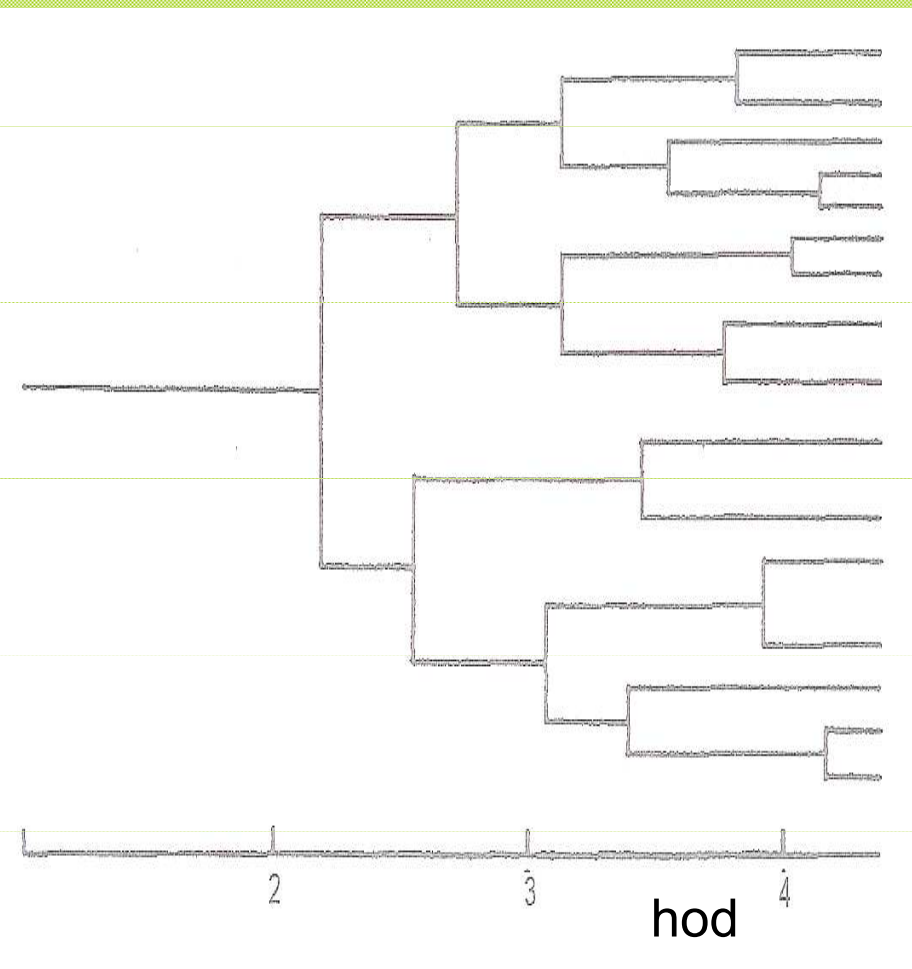
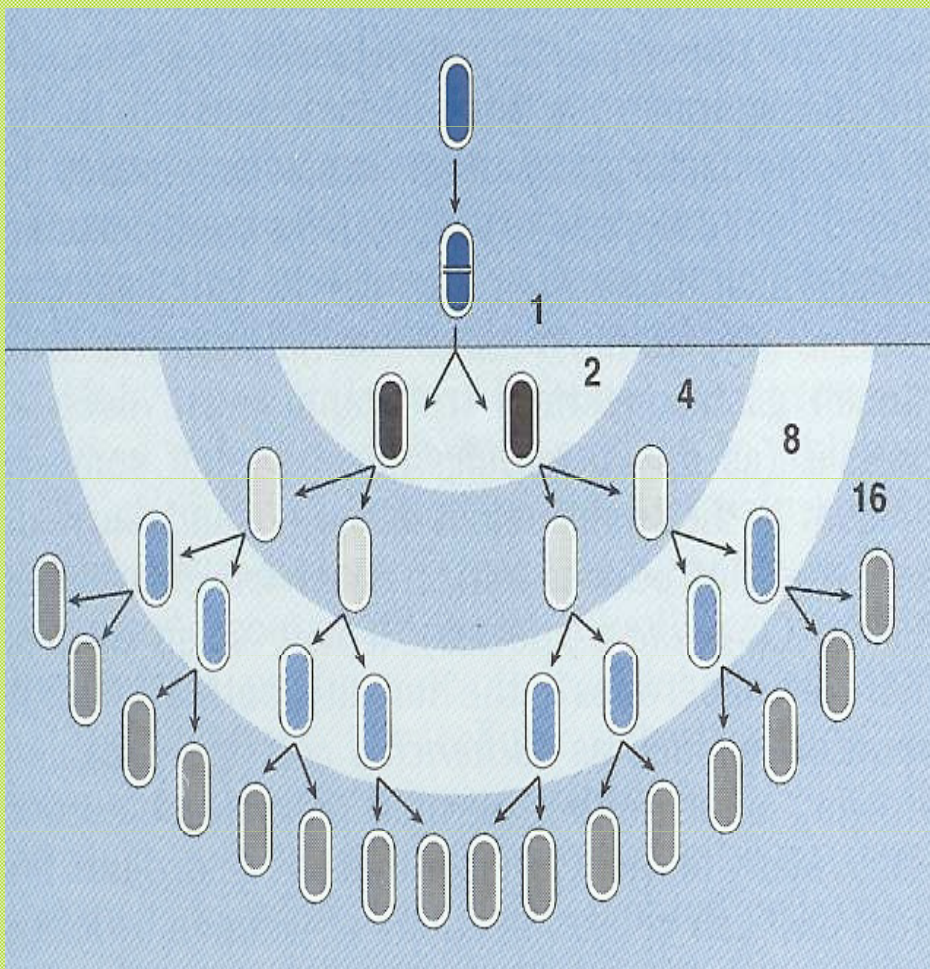
OM – vnější membrána

MP - peptidoglykan

CM – cytoplazmatická membrána

- U G- se tvorby přepážky nezúčastňuje vnější membrána, takže materiál je v nadbytku a vytvářejí se **mimobuněčné měchýřky**
- Poměr enzymů syntetizujících a hydrolyzujících peptidoglykan je striktně regulován. Vychýlení poměru by znamenalo zastavení růstu nebo autolýzu
- Fyzické oddělení dceřinných buněk je uskutečňováno aktivitou **autolyzinů**
- Po rozdělení mohou být některé buňky u některých druhů pasivně spojeny extracelulárním tmelem nebo společnou pochvou (streptokoky, stafylokoky, neiserie, bakterie vytvářející společnou pochvu, ...)

Dělení buněk



Vznik heterogenní populace

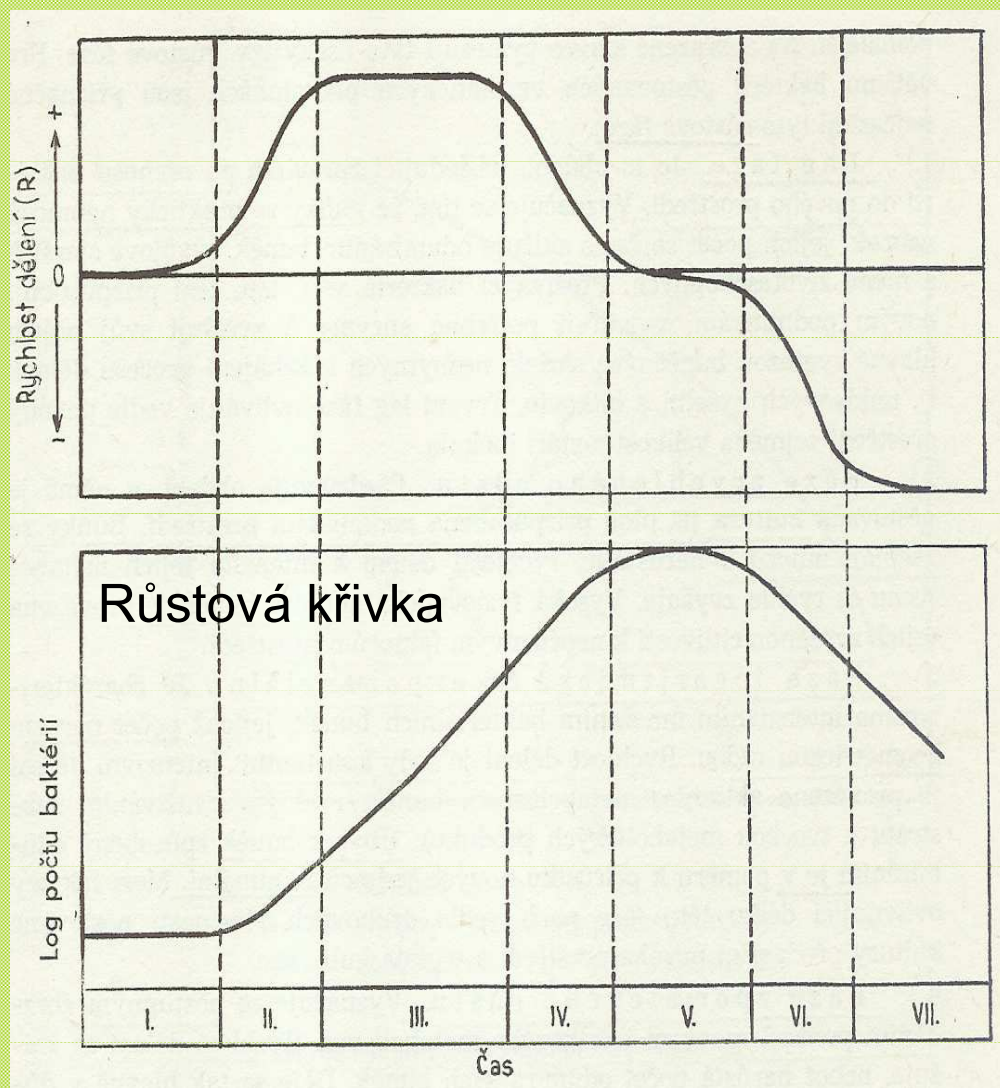
Dělení buněk

- Buňky vzniklé dělením buňky rostoucí vyváženě, **nejsou** fyziologicky přesně identické a rovnocenné
- V populaci se nacházejí buňky v odlišných fázích životního cyklu (od buněk nejmenších - těsně po rozdělení až po největší - těsně před rozdělením)
- Jednotlivá buňka mezi děleními roste “rovnoměrně“ a její velikost je funkcí času

Růst populace v podmínkách *in vitro*

- **Statická kultivace** – uzavřený systém – vysoká koncentrace živin na počátku, nízká na konci a vysoká koncentrace metabolitů na konci kultivace
- **Submerzní** – většinou uzavřený systém, změny jsou obdobné jako u statické kultivace. Třepáním, provzdušňováním či mícháním se zvětšuje pravděpodobnost kolize živiny s povrchem buňky. Populace roste rychleji než “statická“
- **Kontinuální** – otevřený systém – koncentrace živin i metabolitů je udržována na stanovené hladině

Množení mikroorganismů v podmínkách statické kultivace - růstová křivka



- I. Lag fáze
- II. Fáze zrychleného růstu
- III. Fáze logaritmická
(exponenciální)
- IV. Fáze zpomaleného růstu
- V. Fáze stacionární
- VI. Fáze poklesu
- VII. Fáze zrychleného
odumírání

Růstová křivka

- **Lag fáze** – buňky se většinou nemnoží, snižuje se počet životaschopných buněk. Buňky se přizpůsobují prostředí a syntetizují potřebné enzymy. Vytvářejí se látky potřebné pro rozdělení buňky.
- **Fáze zrychleného růstu** (fáze fyziologického mládí) – buňky jsou přizpůsobeny prostředí, ke konci rychle metabolizují a dělí se. V této fázi jsou velmi citlivé k nepříznivým faktorům.
- **Fáze logaritmická** (exponenciální) – intenzivní růst, počet buněk narůstá geometrickou řadou, malý počet odumírajících buněk. Rychlé využívání substrátů a velká tvorba metabolitů

Růstová křivka

- **Fáze zpomaleného růstu** – postupné zpomalování růstu a metabolismu. Zvyšuje se počet odumírajících buněk v důsledku snížení koncentrace živin a zvyšování koncentrace metabolitů (většinou toxické povahy).
- **Fáze stacionární** – počet odumírajících a vznikajících buněk se vyrovnává (nulová růstová rychlost). Počet buněk dosahuje maxima (M-koncentrace). Zvýšená produkce látek sekundárního metabolismu.
- **Fáze poklesu a fáze zrychleného odumírání** – narůstající úbytek buněk, rychlost dělení nabývá negativních hodnot. Snížení koncentrace živin pod limitní hodnotu. Postupné odbourávání zásobních látek.

Růstové konstanty

- Stanoví se na základě hodnot získaných v **exponenciální fázi** růstové křivky
- Základním zákonem růstu a množení prokaryotické populace je geometrická řada s kvocientem 2

Růstové konstanty

- Počet buněk v původní populaci je

$$x_0$$

- Počet buněk po prvním dělení (1. generace)

$$x_1 = 2x_0$$

- Počet buněk po druhém dělení (2. generace)

$$x_2 = 2 \cdot 2 \cdot x_0$$

- Počet buněk po třetím dělení (3. generace)

$$x_3 = 2 \cdot 2^2 \cdot x_0$$

- Počet buněk po n-tém dělení (n generace)

$$x_n = 2^n \cdot x_0$$

- V čase t potom

$$t = nT, \quad \text{kde}$$

n – počet zdvojení za dobu $t-t_0$, T doba potřebná k rozdělení buňky

Růstové konstanty

- Dosadíme-li za $n=t/T$ do rovnice

$$x_n = 2^n \cdot x_0$$

- bude se **počet buněk** v závislosti na čase rovnat $x = x_0 2^{t/T}$

- **Počet generací** \underline{n} v čase lze vypočítat i použitím dekadických logaritmů

$$\log x = \log x_0 + n \log 2$$

Růstové konstanty

- Jestliže vztáhneme n na dobu, po kterou populace rostla, zjistíme **průměrnou rychlost dělení (R)**

$$R = \frac{n}{t} = \frac{1}{\log 2} \cdot \frac{\log x - \log x_0}{t - t_0}$$

- Z tohoto vztahu odvodíme **střední generační dobu (τ)**

$$\tau = \frac{1}{R} = \log 2 \cdot \frac{t - t_0}{\log x - \log x_0}$$

Růstové konstanty

- V exponenciální fázi platí, že rychlost růstu mikrobiální populace je v kterémkoliv okamžiku této fáze úměrná počtu buněk

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

- Kde μ je konstanta, tzn. růstová rychlost přepočtená na jednu buňku nebo biomasu a označuje se jako **specifická růstová rychlost**

$$\mu = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x} = \frac{\ln x - \ln x_0}{t} = 2,3 \cdot \frac{\log x - \log x_0}{t - t_0}$$

Růstové konstanty

- Hodnota μ je v exponenciální fázi závislá na koncentraci substrátu (esenciální živiny)

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

kde

μ_m = maximální růstová rychlost

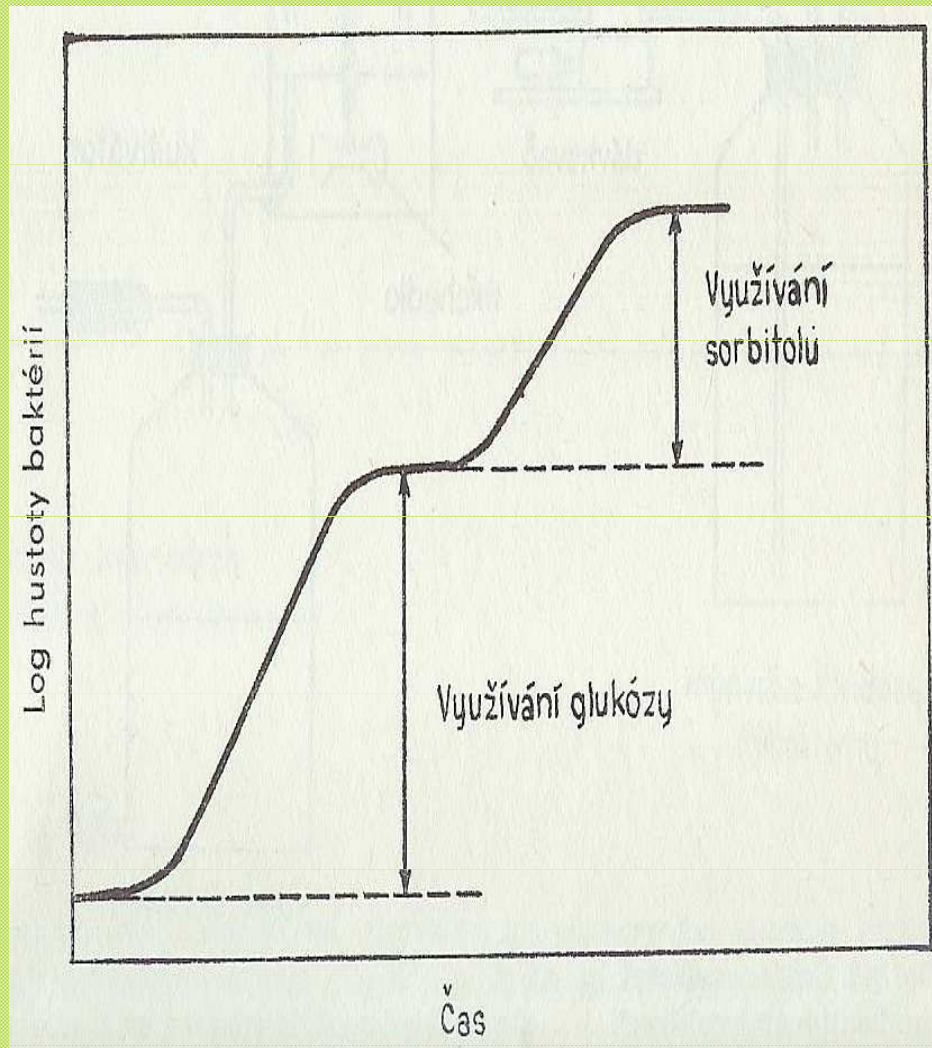
S = koncentrace substrátu

K_s = saturační konstanta (zde je číselně rovna koncentraci substrátu, při níž μ odpovídá poloviční hodnotě μ_m). Skutečné hodnoty jsou velmi nízké a většiny substrátů se pohybují v rozmezí jednotek mg/l.

Specifická růstová rychlost vyjadřuje přírůstek každé jednotky biomasy (neboli přírůstek na individuum) za jednotku času.

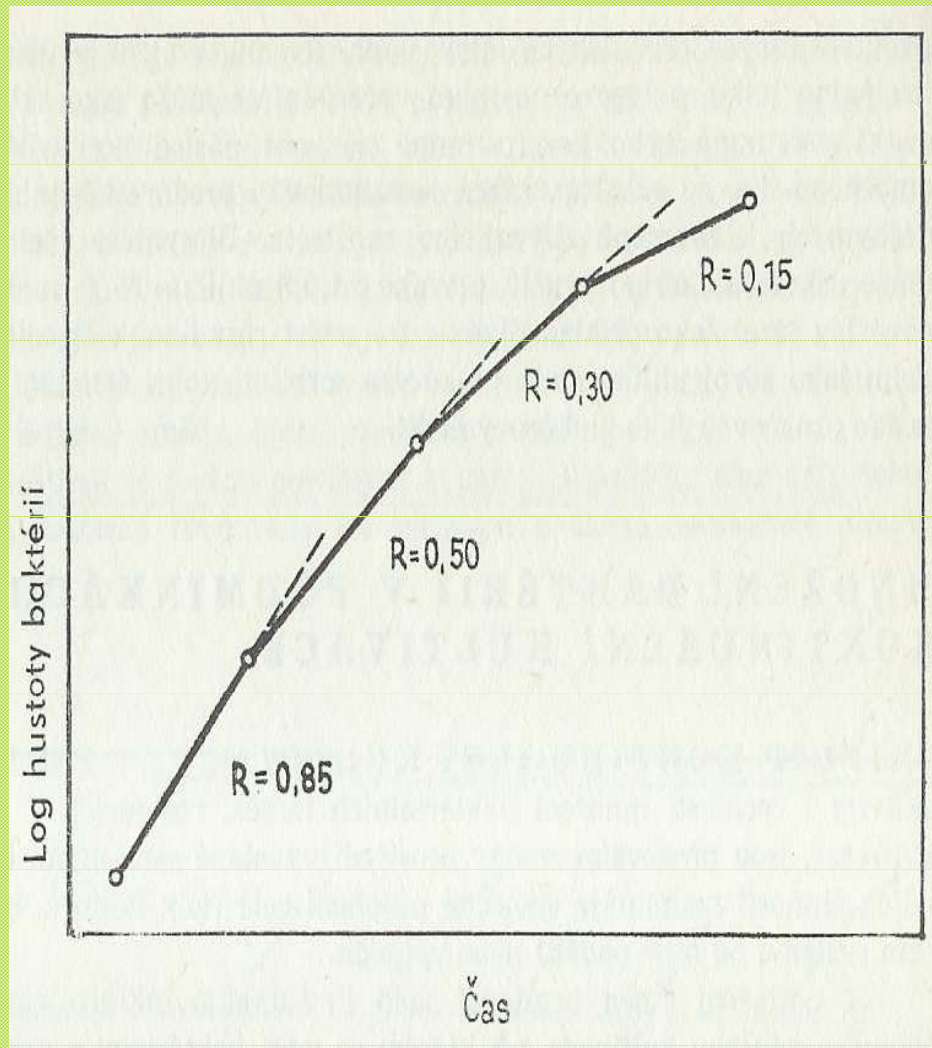
Je tedy rovna poměru celkové rychlosti růstu a koncentrace biomasy (hustoty populace) X

Diauxie



- Tento způsob růstu je typický pro prostředí se dvěma odlišnými zdroji uhlíku a energie v tekutém prostředí
- Nejprve je využíván jeden, přičemž enzymy pro využívání druhého jsou blokovány
- Po vyčerpání 1. substrátu nastupuje využívání druhého
- Růst populace je charakterizován **dvěma lag fázemi a dvěma log fázemi**
- Pořadí využívání substrátů je regulováno

Mnohonásobná logaritmická fáze



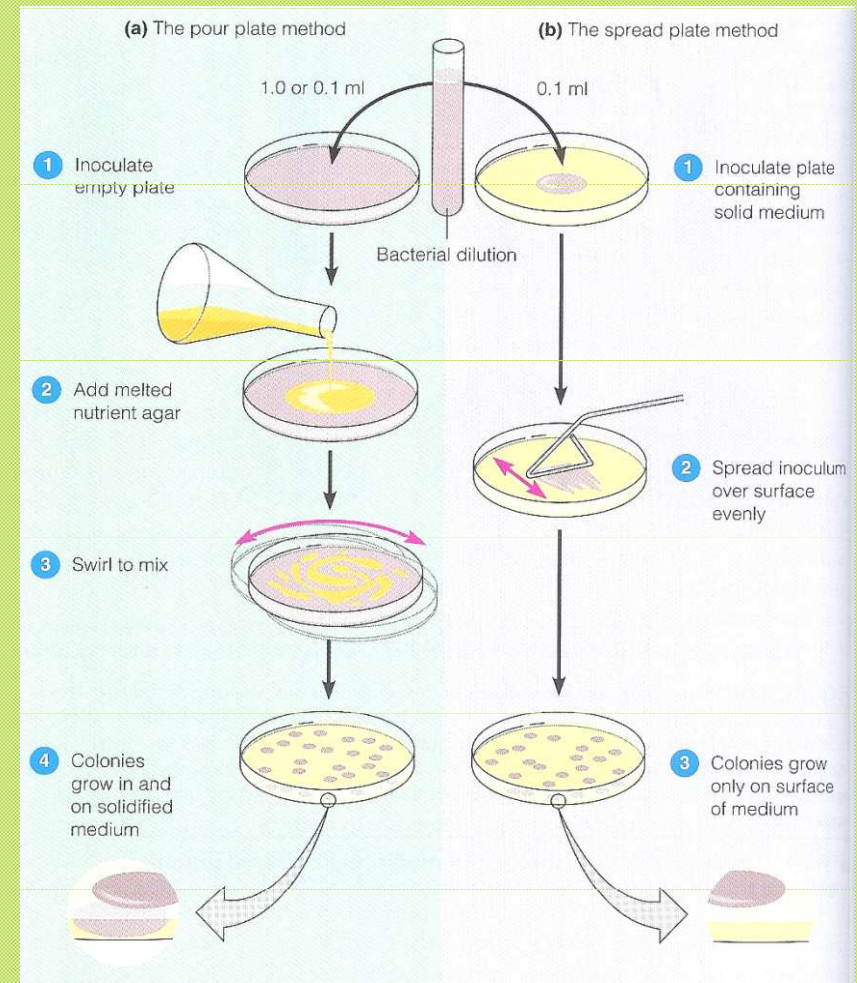
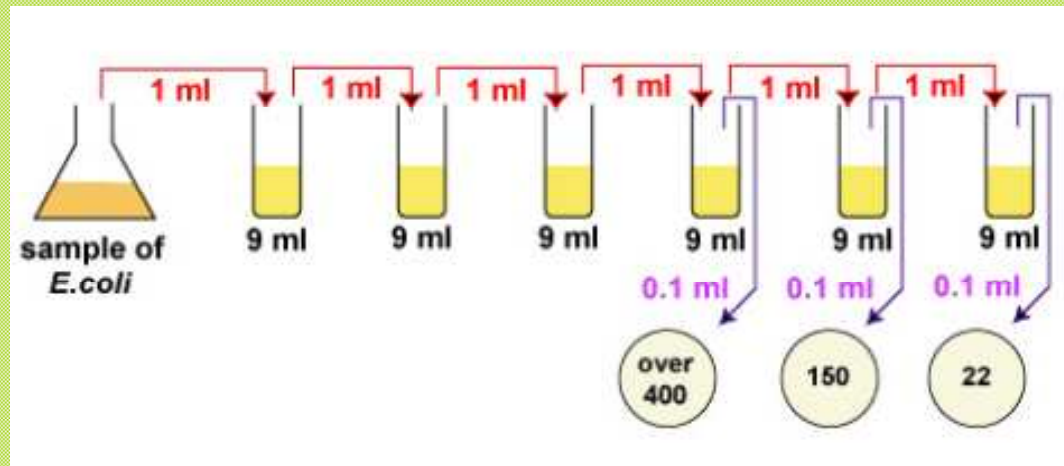
- Způsob růstu populace, při němž na sebe navazuje několik log fází
- Tyto fáze se od sebe liší rozdílnou růstovou rychlostí
- Je to odraz změn prostředí, ke kterým dochází v průběhu kultivace (např. vyčerpáním jedné živiny a využíváním jiné). Možné je také hromadění metabolitů, které později vystupují jako sekundární substrát
- Jako regulační faktor může vystupovat i CO_2 . Při suboptimální koncentraci jsou syntetizovány zásobní látky, které jsou následně využívány po vyčerpání základního media

Metody pro stanovení růstové křivky

- Počítáním živých buněk (plotnová metoda, počítačí komůrka)
- Stanovením optické denzity suspenze
- Stanovením biomasy

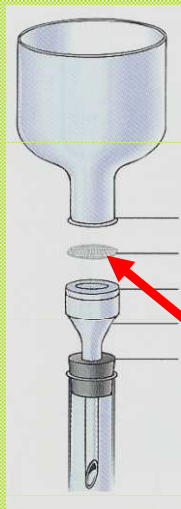
Metody pro stanovení růstové křivky

- Počítáním živých buněk - plotnová metoda

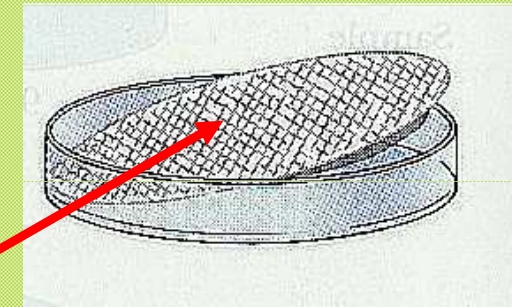
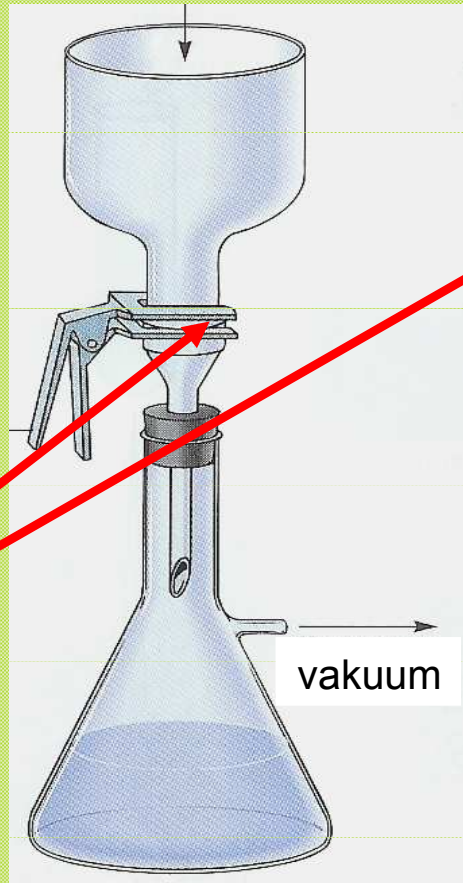
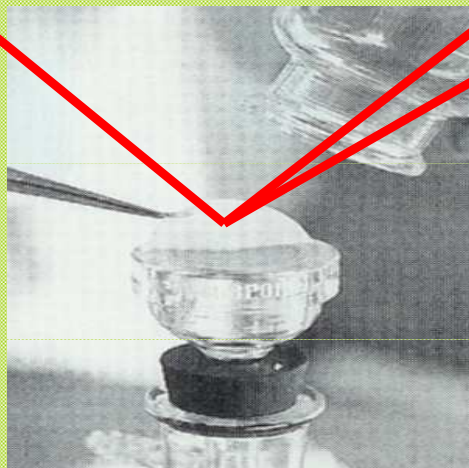


Metody pro stanovení růstové křivky

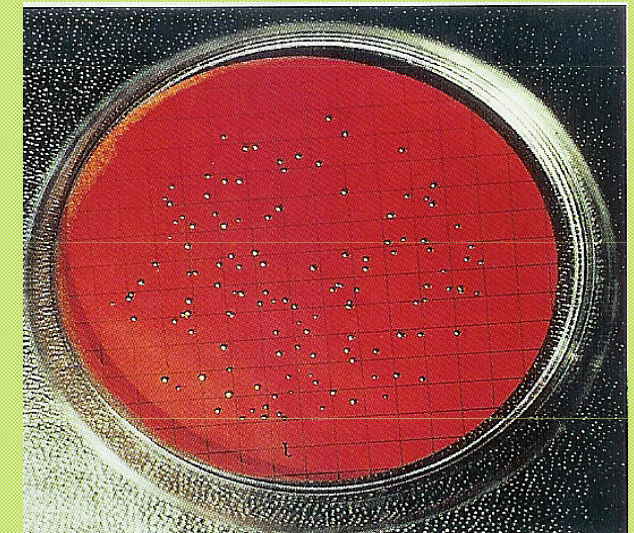
- Počítáním živých buněk – metoda membránových filtrů



nálevka
membránový filtr
základní deska

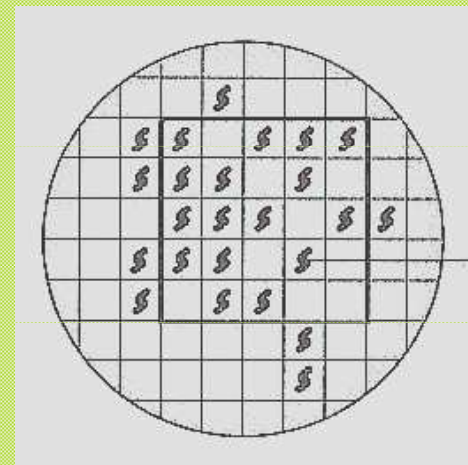
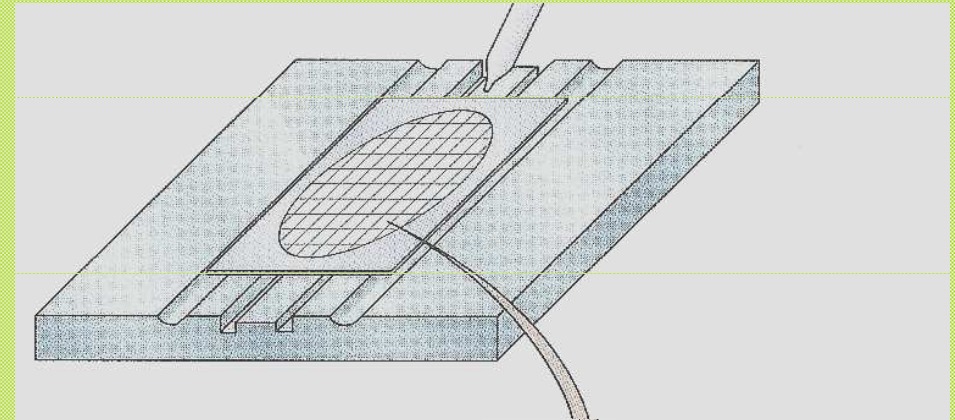


Miska s agarem



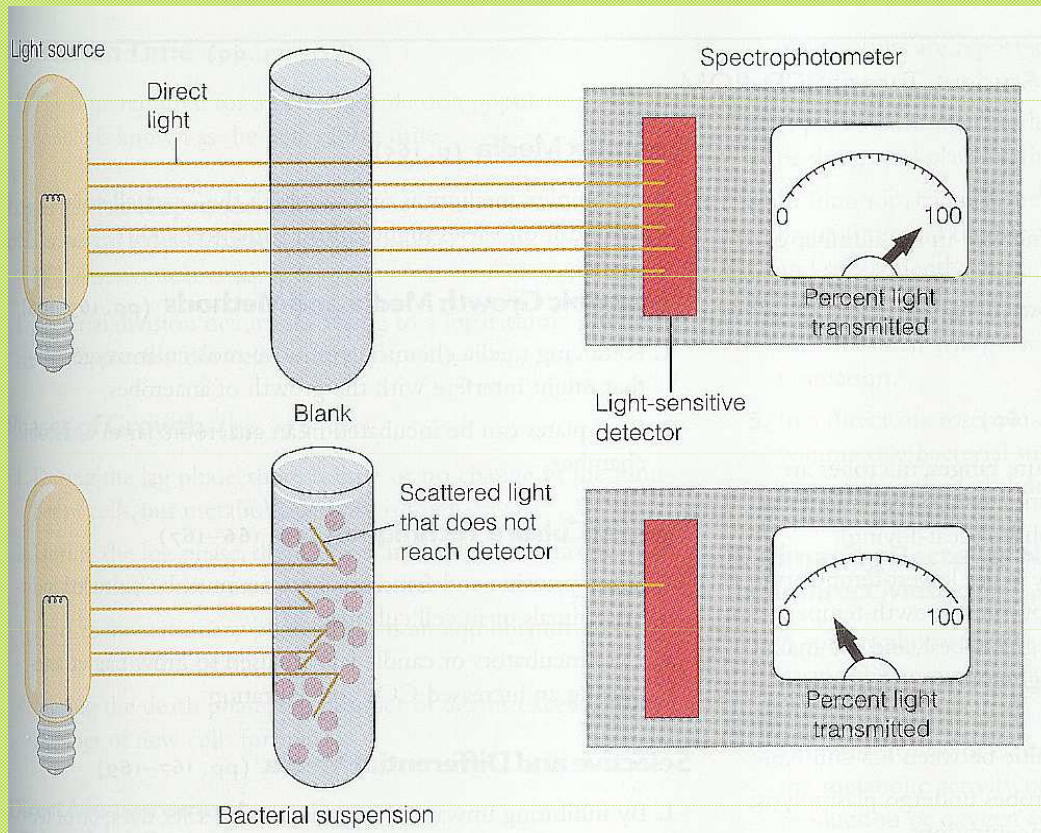
Metody pro stanovení růstové křivky

- Počítáním živých buněk – počítací komůrka

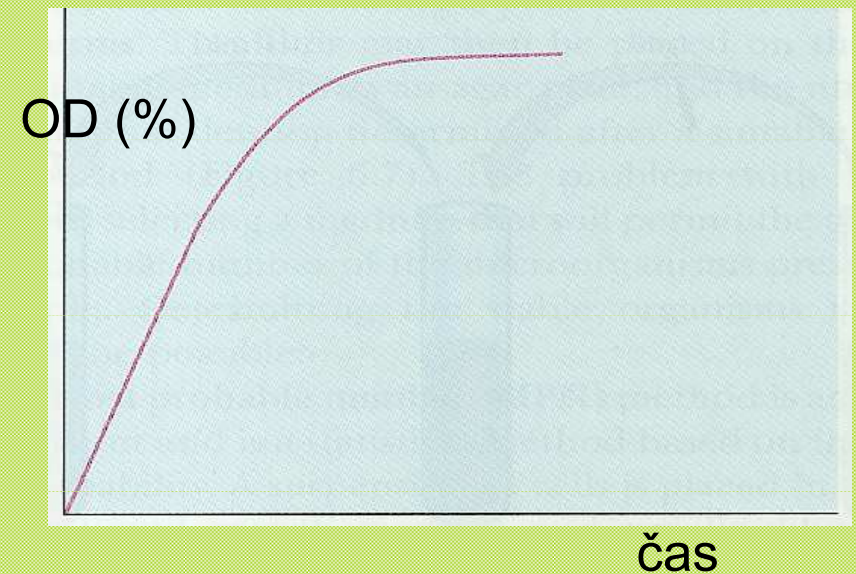


Metody pro stanovení růstové křivky

- Stanovením optické denzity suspenze



Růstová křivka stanovená turbidimetrem



Metody pro stanovení růstové křivky

- Stanovením biomasy
 - *stanovení sušiny
 - *rozpuštěných bílkovin
 - *mokrý biomasy
 - *DNA

Synchronizace dělení

- Při kultivaci za “normálních” podmínek je mikrobiální populace fyziologicky heterogenní. Důsledkem je, že v populaci se nacházejí buňky v různém stádiu životního cyklu.
- Proto hodnota generační doby vypočtená podle vztahu

$$\tau = \frac{1}{R} = \log 2 \cdot \frac{t - t_0}{\log x - \log x_0}$$

je **průměrnou hodnotou pro populaci**

- K získání fyziologicky homogenní populace se používá metody synchronizace, navozující stav, kdy populace se chová “jako” individuální buňka

Synchronizace dělení

- **Metody navození synchronního množení**

- *chladový šok – zastavení buněčného cyklu ve fázi G1- blokována syntéza DNA

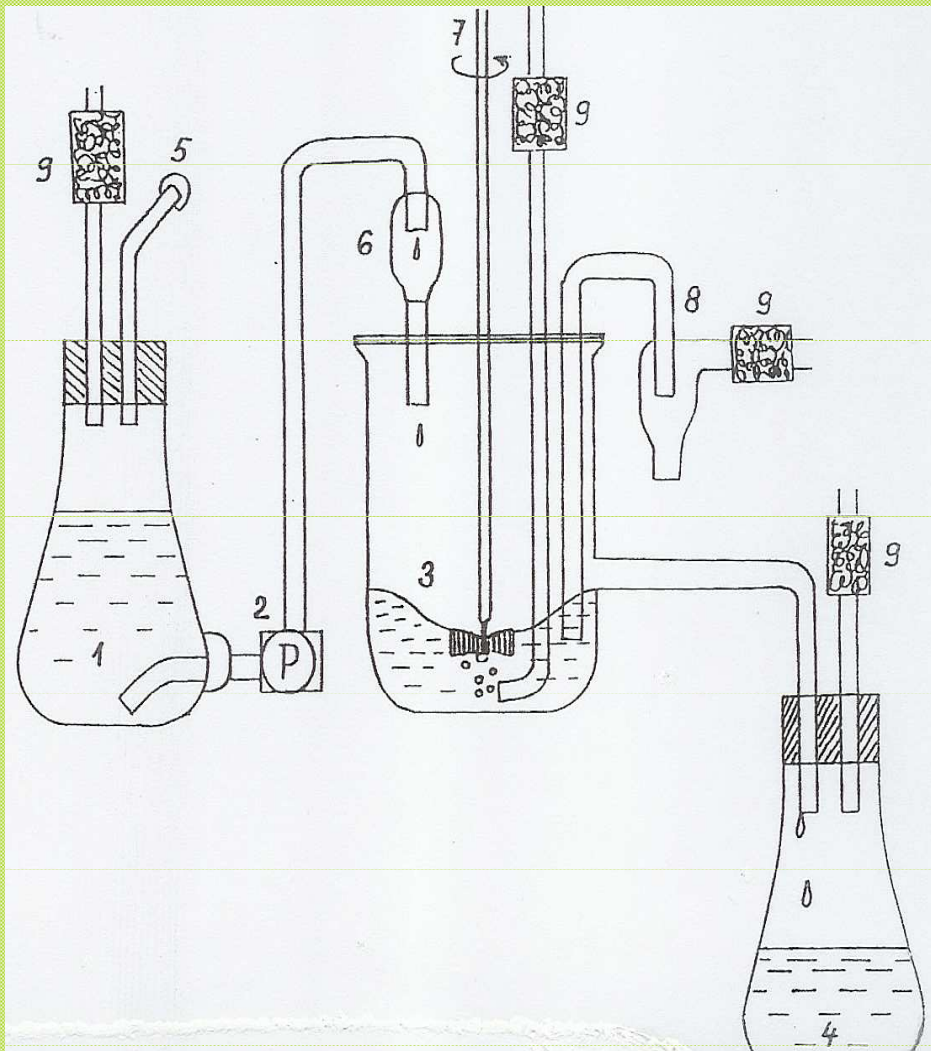
- *zfázování hladověním – využití výživového signálu (ve fázi G1)

- *filtrace membránovými filtry (zachycení buněk o přibližně stejné velikosti)

Růst a množení v podmínkách kontinuální kultivace

- Základem kontinuální kultivace je eliminace vlivu limitujícího faktoru na růst populace
- Do kultivační nádoby je neustále přiváděno čerstvé médium a odváděno přebytečné včetně buněk
- Tím se vytvoří stav dynamické rovnováhy a buňky jsou v ustáleném fyziologickém stavu. V tomto stavu by bylo možné udržovat rostoucí populaci téměř neomezenou dobu
- **Kontinuální kultivace je systém otevřený**

Zařízení pro kontinuální kultivaci



- 1 - rezervoár s živným prostředím
- 2 - peristaltická pumpa
- 3 - kultivační nádoba
- 4 - jímací nádrž
- 5 - otvor pro dávkování
- 6 - přítok živného média
- 7 - míchadlo
- 8 - zařízení pro odběr vzorků
- 9 - filtry

Růst a množení v podmínkách kontinuální kultivace

- **Turbidostat** – všechny živiny jsou v nadbytku. Růst je regulován rychlostí přítoku živného média
- **Chemostat** – živné médium přitéká konstantní rychlostí. Růst je regulován koncentrací esenciální živiny

Růst a množení v podmínkách kontinuální kultivace - turbidostat

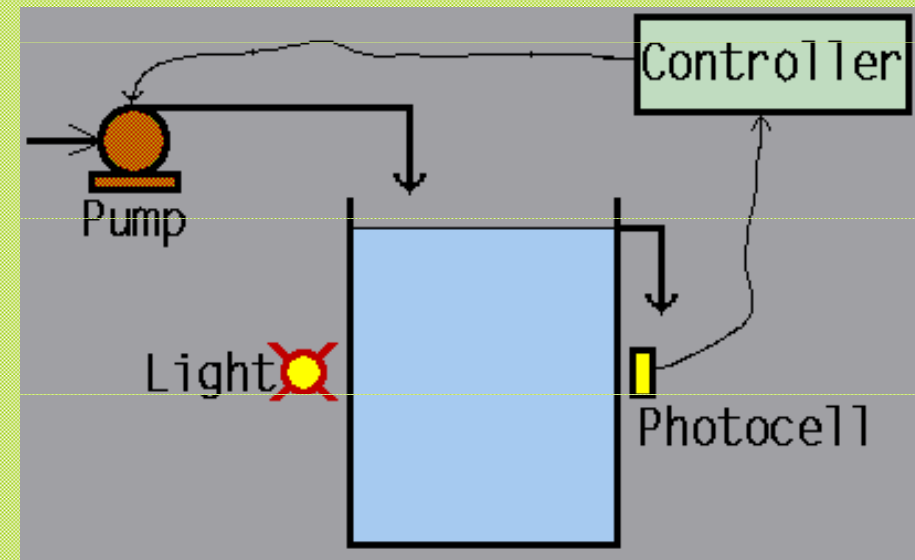
- Při kontinuální kultivaci buněk přibývá podle rovnice

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1})$$

- Buněk ubývá podle vztahu

$$\frac{-dx}{dt} = \frac{w}{V} x = Dx \quad (\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1})$$

Kde x – koncentrace buněk, V – objem kultury (l), w – rychlost přítoku media (l/h)



Růst a množení v podmínkách kontinuální kultivace - turbidostat

- Zředovací rychlost (D) je dána vztahem

$$\frac{w}{V} = D$$

- Doba zdržení – je reciproká hodnota D

$$\frac{1}{D} = \frac{V}{w}(h)$$

a udává průměrnou dobu, po kterou se partikule v systému udrží

- Jestliže $\mu > D$ buněk bude přibývat
 $\mu < D$ buněk bude ubývat
 $\mu = D$ počet buněk bude téměř konstantní

Růst a množení v podmínkách kontinuální kultivace - **chemostat**

- Specifická růstová rychlost (μ) není při kultivaci v chemostatu konstantou, ale proměnlivou veličinou, která je závislá na koncentraci limitující živiny

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s}$$

- Rychlost růstu je dána vztahem

$$\frac{dx}{dt} = \left(\mu_{\max} \frac{s}{K_s + s} - D \right) x$$

