

MIKROBIOLOGIE

Mgr. Šárka Bidmanová, Ph.D.

Loschmidtovy laboratoře, Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

77580@mail.muni.cz

MIKROBIOLOGIE

1. Úvod do studia mikrobiologie
2. Archea
3. Bakterie
4. Fyziologie růstu bakteriální populace
5. Výživa a metabolismus bakterií
6. Metabolismus bakterií I
7. Metabolismus bakterií II
8. Genetika bakterií
9. Nejvýznamnější zástupci bakterií a jejich význam
10. *Sinice*
11. Kvasinky
12. Vlákňité houby
13. Viry a priony

MIKROBIOLOGIE

Opakování – sinice

- Sinice jsou autotrofní organismy s eukaryotickou buňkou.
 - Správně
 - Špatně
- Buněčná stěna sinic je tvořena z dvojvrstvy fosfolipidů.
 - Správně
 - Špatně
- Thylakoidy sinic jsou drobná tělíška zajišťující fixaci oxidu uhličitého.
 - Správně
 - Špatně
- Sinice se mohou rozmnožovat pohlavně konjugací.
 - Správně
 - Špatně
- Sinice produkují toxiny jako produkty sekundárního metabolismu.
 - Správně
 - Špatně

MIKROBIOLOGIE

1. Úvod do studia mikrobiologie
2. Archea
3. Bakterie
4. Fyziologie růstu bakteriální populace
5. Výživa a metabolismus bakterií
6. Metabolismus bakterií I
7. Metabolismus bakterií II
8. Genetika bakterií
9. Nejvýznamnější zástupci bakterií a jejich význam
10. Sinice
11. Kvasinky
12. Vlákňité houby
13. Viry a priony

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky

- Jednobuněčné mikroorganismy nebo tvoří vlákna
- Eukaryotická buňka – 3-15 μm
- Tvar nejčastěji elipsoidní, vejčitý až kulovitý
- Patří mezi houby
- Heterotrofní výživa
- Většina kvasinek fakultativně anaerobní
- Zásobní látky – glykogen a trehalosa
- Pohlavní i nepohlavní rozmnožování

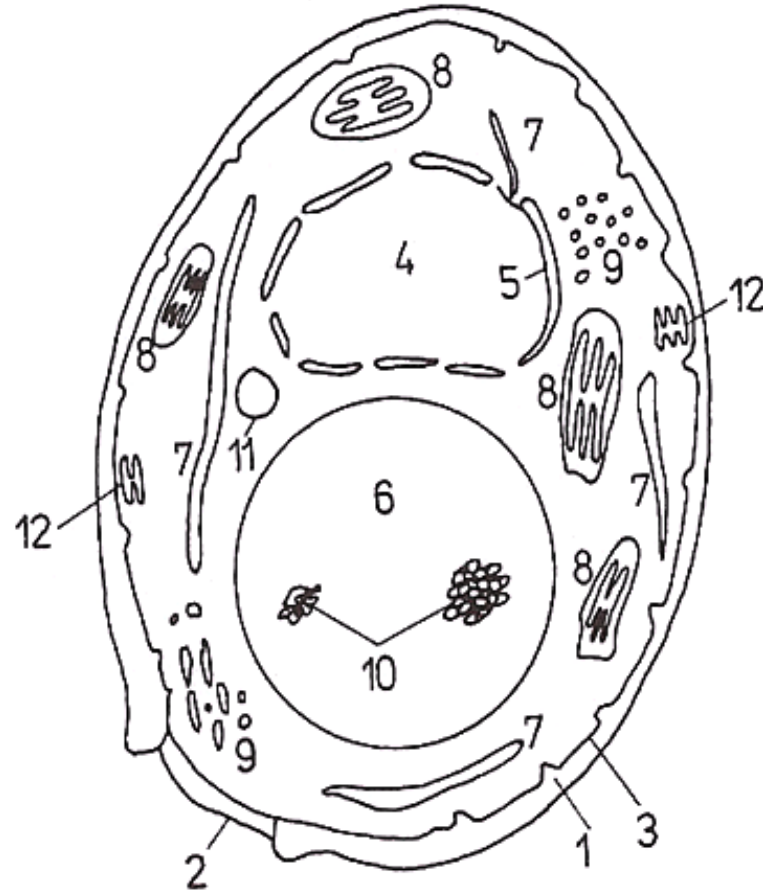
Kvasinky – chemické složení buněčné hmoty

- Voda – 62-83%, méně než u bakterií
- Sušina
 - Bílkoviny – 50%
 - Glykogen – 30%
 - Nukleové kyseliny – 10%
 - Strukturní polysacharidy – 5%
 - Vitamíny B₁, B₂, B₆
 - Provitamin D a A
 - Popel – 8% - oxid fosforečný, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – stavba buňky

1. Buněčná stěna
2. Zárodečná jizva
3. Cytoplasmatická membrána
4. Jádro
5. Jaderná membrána
6. Vakuola
7. Endoplasmatické retikulum
8. Mitochondrie
9. Glykogen
10. Polyfosfátová granula
11. Lipidy
12. Golgiho aparát



Kvasinky – stavba buňky

- Buněčná stěna
 - Pevná a odolná struktura
 - Specifické chemické složení
 - Tvorba jizev (trvalé struktury po pučení)
 - Chemické složení – polysacharidy – glukany a mannany, méně chitinu; proteiny, lipidy, anorganický fosfát
 - Sféroblasty – kulovité útvary, odstranění buněčné stěny pomocí enzymů
- Pouzdro
 - U rodů *Cryptococcus*, *Pichia*
 - Chemické složení – polysacharidy z manosy, kyseliny glukuronové, xylosy, galaktosy...
 - Opouzdřené buňky – slizovité kolonie

Kvasinky – stavba buňky

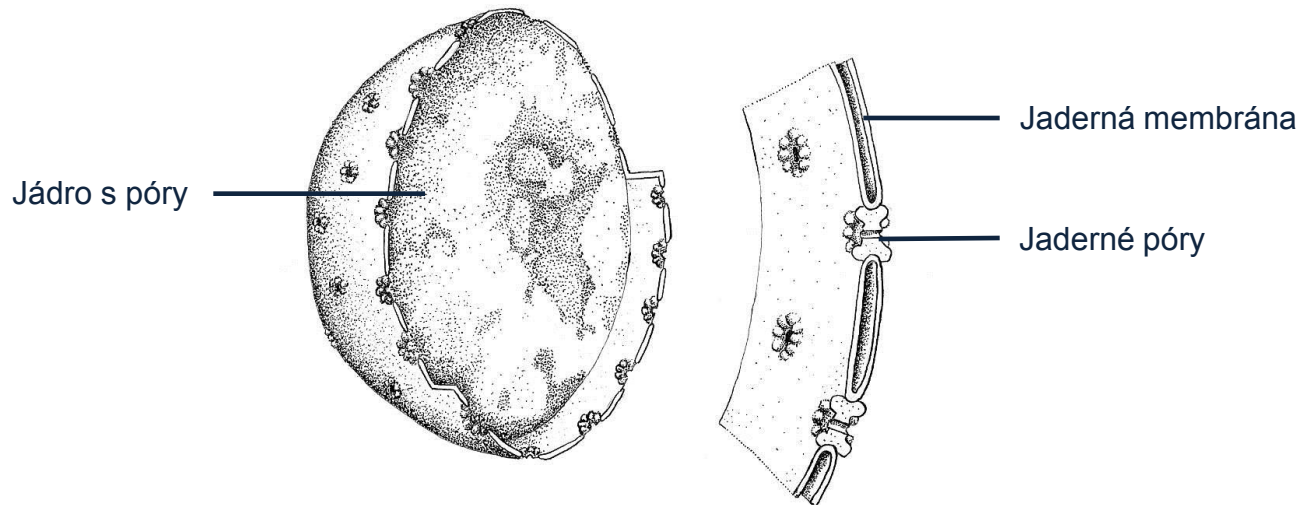
- Cytoplasmatická membrána
 - Fosfolipidová dvojvrstva s proteiny
 - Zodpovědná za transport látek a osmoregulaci
 - Místo syntézy některých komponent buněčné stěny
 - Velmi časté invaginace membrány
 - Periplasma – mezi cytoplasmatickou membránou a buněčnou stěnou, obsahuje sekretované hydrolytické enzymy

Kvasinky – stavba buňky

- Cytoplasma
 - Kyselý koloidní roztok
 - Chemické složení - ionty, menší organické molekuly a rozpustné makromolekuly (enzymy, glykogen)
 - Funkce – tvar buňky, přesuny živin v buňce, biochemické pochody
 - Cytoplasmatické enzymy – glykolysa, syntéza mastných kyselin a proteinů
 - Cytoskelet – tvořen mikrotubuly a mikrofilamenty, podílí se na mitoze, meioze, tvorbě septa, pohybu organel
 - Cytoplasma obsahuje volné ribosomy (80S), tukové částice (zásobní funkce) a proteasomy (degradace proteinů a transport)

Kvasinky – stavba buňky

- Jádro
 - Přibližně ve středu buňky
 - Ohraničeno dvojitou jadernou membránou s velkými póry
 - Nukleoplasma – genomová DNA, histony a další proteiny tvořící chromatin
 - Funkce jádra – genetická, metabolická, regulační
 - Obsahuje jadérko – z RNA a proteinů, není ohraničeno membránou, funkce – syntéza prekurzorů rRNA – vznik ribosomů cytoplasmy

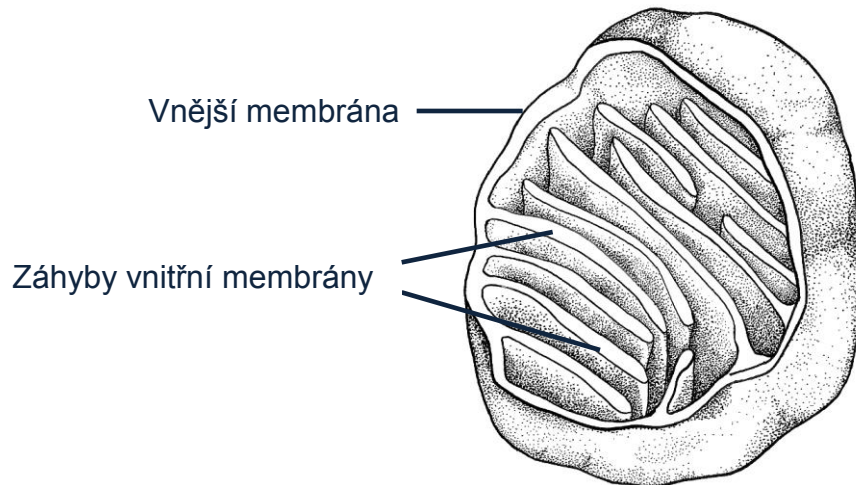


Kvasinky – stavba buňky

- Jádro
 - Mimochromosomální elementy v jádře:
 - **2 μ m DNA** – kruhovitá plasmidová DNA, replikace pouze jednou v S fázi buněčného cyklu
 - **Dvouřetězcová RNA a lineární DNA** – geny pro produkci toxinů, u některých kmenů kvasinek
 - **Ty elementy** – retrotransposony, transpozice přes RNA intermediát

Kvasinky – stavba buňky

- Mitochondrie
 - Semiautonomní organely – vlastní ribosomy a DNA, syntéza mnoha mitochondriálních proteinů – v cytoplasmě, řízena jadernými geny
 - Obal ze dvou membrán
 - Vlastní energetický metabolismus
 - Symbiotický původ při evoluci buňky



Kvasinky – stavba buňky

- Mitochondrie
 - Rozmanitý tvar – kulovité, válcovité...
 - Struktura mitochondrií:
 - Vnější membrána – enzymy pro metabolismus lipidů
 - Vnitřní membrána – enzymy dýchacího řetězce, ATP syntasa
 - Matrix – enzymy Krebsova cyklu, mitochondriální DNA (kruhovitá dvouřetězcová mtDNA), mitochondriální ribosomy a tRNA
 - mtDNA – geny pro rRNA, tRNA a enzymy dýchacího řetězce
 - Funkce mitochondrií – tvorba ATP, syntéza karboxylových kyselin a lipidů, adaptace na stresové podmínky

Kvasinky – stavba buňky

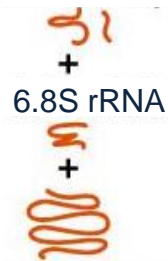
- Vakuola
 - Sférický útvar ohraničený jednoduchou membránou
 - U starších buněk – jedna velká vakuola
 - Rozpad vakuoly před dělením buňky, fúze po dělení
 - Obsahuje hydrolytické enzymy – rozklad proteinů
 - Zásobárna polyfosfátů, volných aminokyselin a některých kovových iontů
 - Zajištění homeostázy a osmoregulace
- Peroxisomy
 - Obsahují enzymy – katalasa, alkohol oxidasa
 - Místo degradace karboxylových kyselin

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – stavba buňky

- Ribosomy (80S)
 - Dvě podjednotky (40S a 60S), neohraničeny membránou
 - Chemické složení – rRNA a proteiny
 - Volné (cytoplasma) nebo vázané (endoplasmatické retikulum)
 - Funkce – syntéza proteinů
 - Polysom (polyribosom) – několik ribosomů připojených na mRNA

5S rRNA, 5.8S rRNA

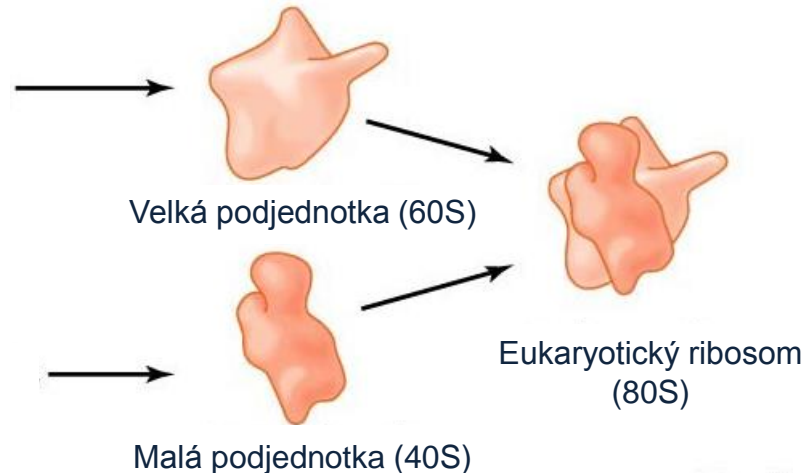


+ 49 polypeptidů

28S rRNA

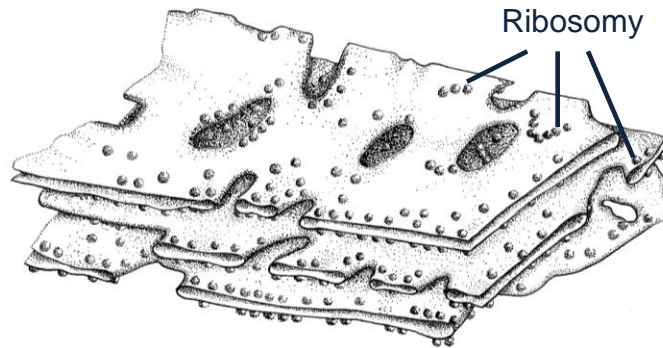


18S rRNA + > 33 polypeptidů



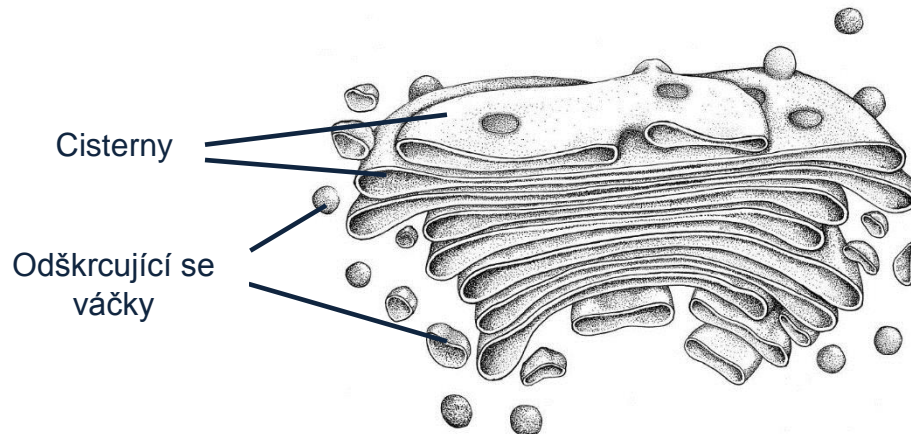
Kvasinky – stavba buňky

- Endoplasmatické retikulum
 - Systém plochých váčků a kanálků
 - Vznik z cytoplasmatické membrány
 - Propojeno s jadernou membránou, ribosomy vázány na vnější membránu
 - Funkce – přeprava látek transportními váčky, např. do Golgiho aparátu



Kvasinky – stavba buňky

- Golgiho aparát
 - Tvořen plochými cisternami (diktyosomy), z obou konců se uvolňují váčky
 - Polární uspořádání – na jedné straně – vznik nových cisteren, na opačné rozpad na váčky
 - Nikdy nenese ribosomy
 - Počet diktyosomů závislý na aktivitě buňky
 - Funkce – postsyntetická úprava proteinů syntetizovaných v endoplasmatickém retikulu



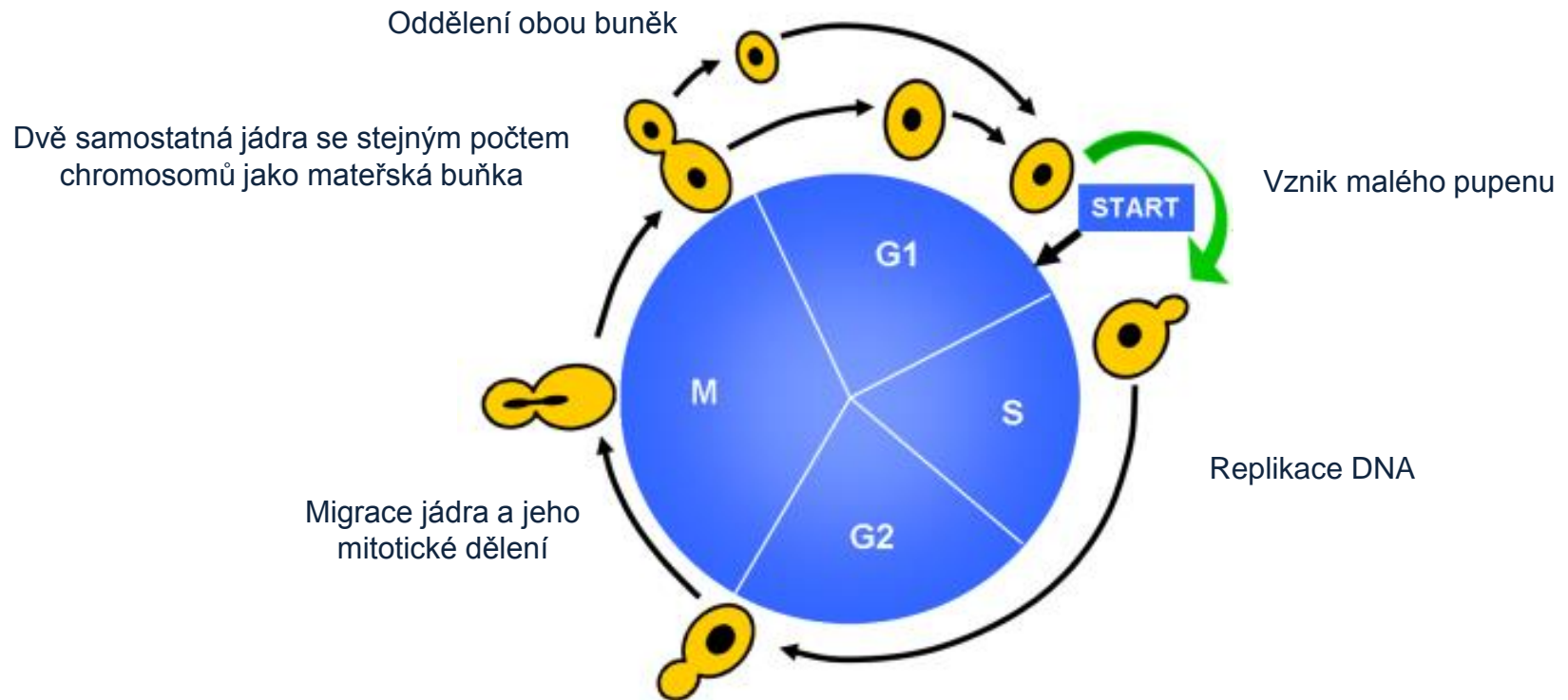
Kvasinky – stavba buňky

- Sekreční systém
 - **Endoplasmatické retikulum** – místo syntézy a modifikace proteinů, syntéza na polysomech na povrchu endoplasmatického retikula
 - Translokace prekurzorových proteinů do nitra endoplasmatického retikula
 - Skládání prekurzorů – chaperony, glykosylace
 - Transport proteinů pomocí váčků do Golgiho aparátu
 - **Golgiho aparát** – další úpravy proteinů
 - Zpětný transport do endoplasmatického retikula
 - Transport sekrečními váčky na místo určení – vakuola, cytoplasmatická membrána, oblast pučení, periplasma

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – buněčný cyklus

- Nejvíce prostudován u *Saccharomyces cerevisiae*
- Pod kontrolou genů CDC (cell division cycle) – regulační funkce



MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – výživa

- Heterotrofní organismy
- Zdroj uhlíku a energie
 - Především monosacharidy – glukosa, fruktosa, manosa, xylosa
 - Disacharidy – sacharosa, maltosa, laktosa, trehalosa
 - Využívání polysacharidů (škrob, celulosa) – produkce extracelulárních enzymů
- Zdroj dusíku
 - Amonné ionty a aminokyseliny

Kvasinky – metabolismus

- Respirativní typy kvasinek
 - Většina kvasinek
 - Zpracování zdrojů uhlíku a energie aerobní respirací – glykolýza a Krebsův cyklus
- Fermentativní typy kvasinek
 - *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*
 - Převažuje fermentace i v aerobních podmínkách

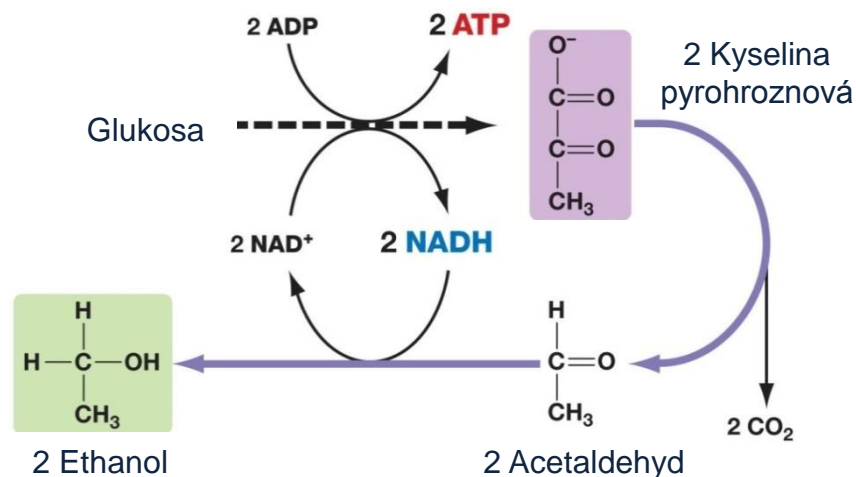
Kvasinky – metabolismus

- Fermentace – ethanolové kvašení



- Energetická bilance – 2 ATP

- Využití – výroba ethanolu a alkoholických nápojů – vína, piva, likéry



- Regulace metabolismu – katabolická represe

- Inhibice aerobního metabolismu vysokými koncentracemi glukosy a preference ethanolového kvašení

Kvasinky – genetika

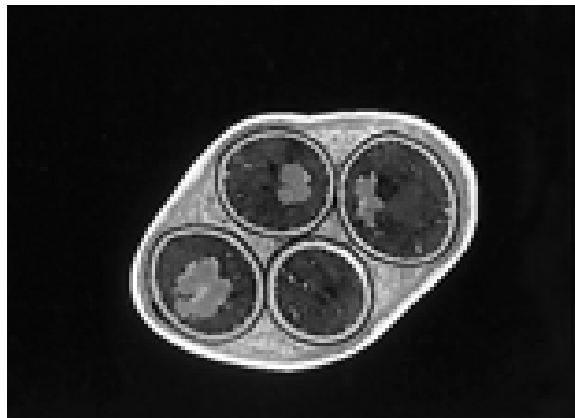
- Smrtící faktor
 - Glykoprotein produkovaný některými kvasinkami, např. *Saccharomyces*
 - Letální pro kvasinky stejného nebo odlišného rodu
 - Blokuje syntézu DNA, RNA, polysacharidů a proteinů
 - Citlivé buňky po expozici smrtícímu faktoru uvolňují do prostředí ATP
 - Smrtící kvasinky K⁺R⁺ (tvorba smrtícího faktoru a rezistence k němu)
 - Citlivé kvasinky K⁻R⁻
 - Neutrální kvasinky K⁻R⁺

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – rozmnožování

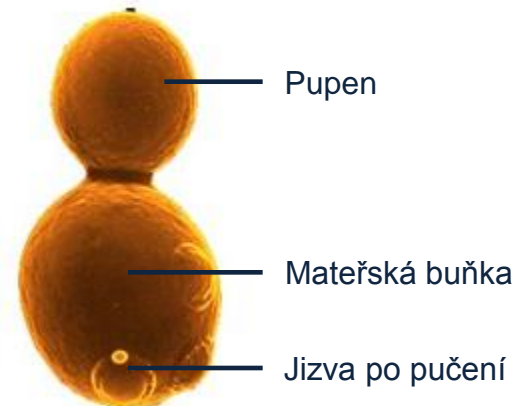
- Pohlavní i nepohlavní
- Nepohlavní – pučení a přehrádečné dělení
- Pohlavní – konjugace haploidních buněk a vznik diploidní zygoty
 - Diploidní zygota – pučení nebo sporulace spojená s meiozou
 - Sporulace – tvorba askospor (ve vřecku) nebo exospor (vně sporotvorných buněk)

Askus Saccharomyces cerevisiae



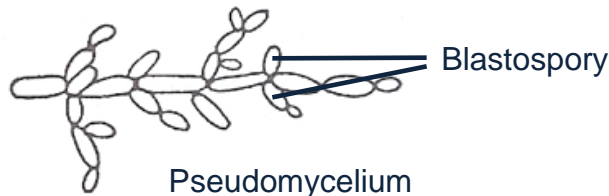
Kvasinky – nepohlavní rozmnožování

- Pučení - vznik dceřiné buňky spojené s mateřskou buňkou
 - Tvorba pupene – do pupene vstupují vakuoly a mitochondrie, současně mitotické dělení jádra, vstup do pupenu
 - Oddělení mateřské a dceřiné buňky cytoplasmatickou membránou
 - Tvorba buněčné stěny, zvětšení pupenu
 - Většinou oddělení dceřiné buňky od mateřské
 - Jizva po pučení – na povrchu buněčné stěny kvasinek
 - Rod *Saccharomyces* – buňky nikdy nepučí tam, kde už pučely – počet jizev odpovídá stáří buňky



Kvasinky – nepohlavní rozmnožování

- Pučení
 - Monopolární – vznik pupene na jednom, vždy stejném pólu buňky
 - Bipolární – střídavě na obou pólech buňky
 - Na široké základně – pupen spojen krčkem s mateřskou buňkou
 - Multipolární – kdekoli na povrchu buňky – *Saccharomyces*
 - Buňky po pučení na pólech – spojeny v dlouhá vlákna - pseudomycelium
 - Na pseudomyceliu – svazky kratších buněk – blastospory

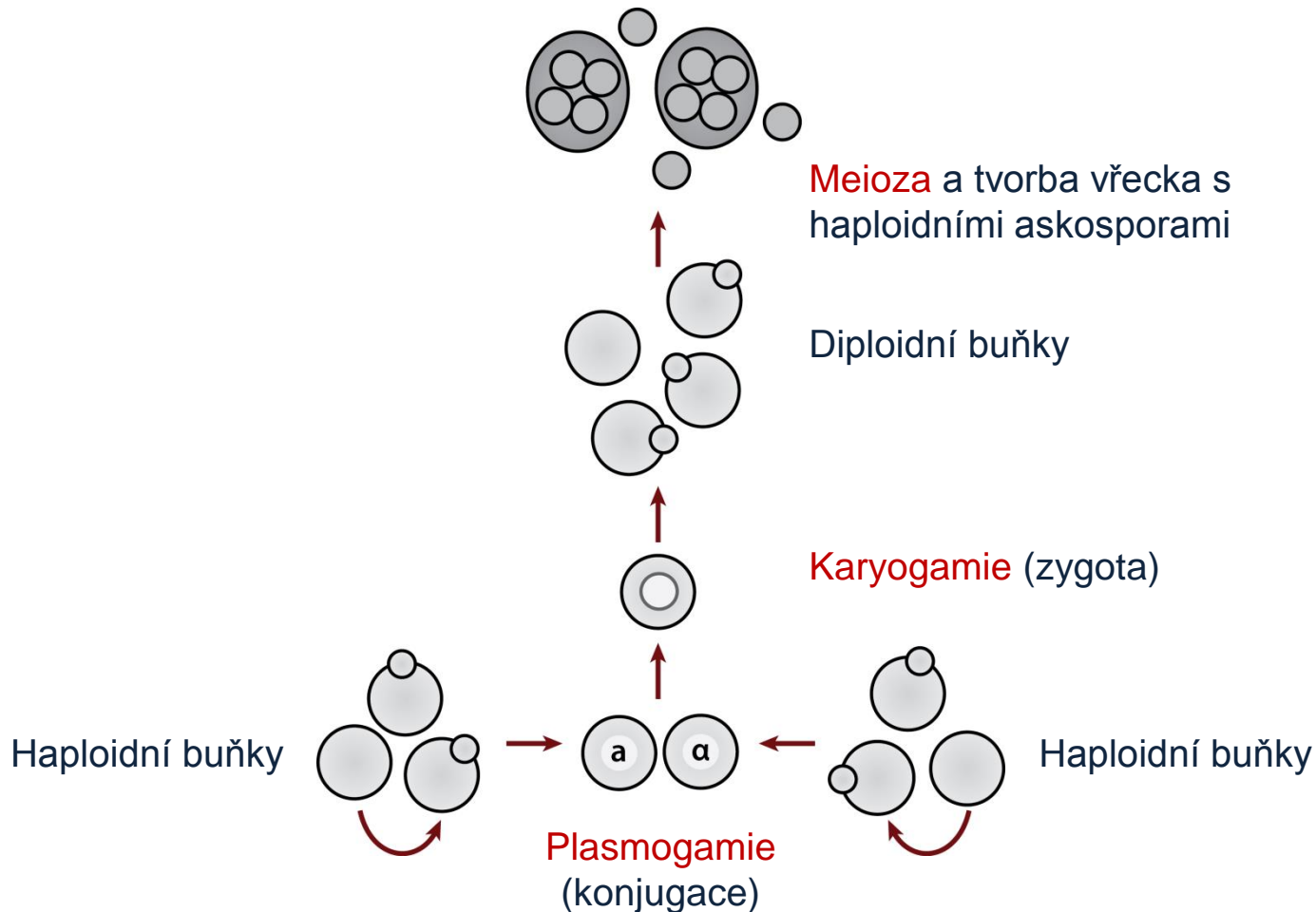


- Přehrádečné dělení
 - Dělení bez tvorby mycelia – *Schizosaccharomyces*
 - Vznik pravého mycelia, na myceliu vznikají svazky blastospor - *Candida*

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – pohlavní rozmnožování

- Střídání haploidní a diploidní fáze v životním cyklu kvasinek
- Tři fáze pohlavního rozmnožování – plasmogamie, karyogamie, meioza

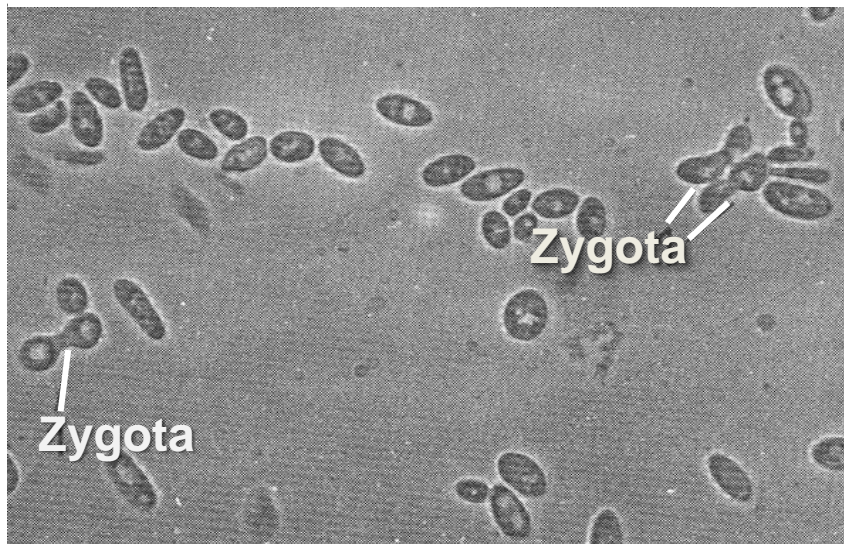


MIKROBIOLOGIE

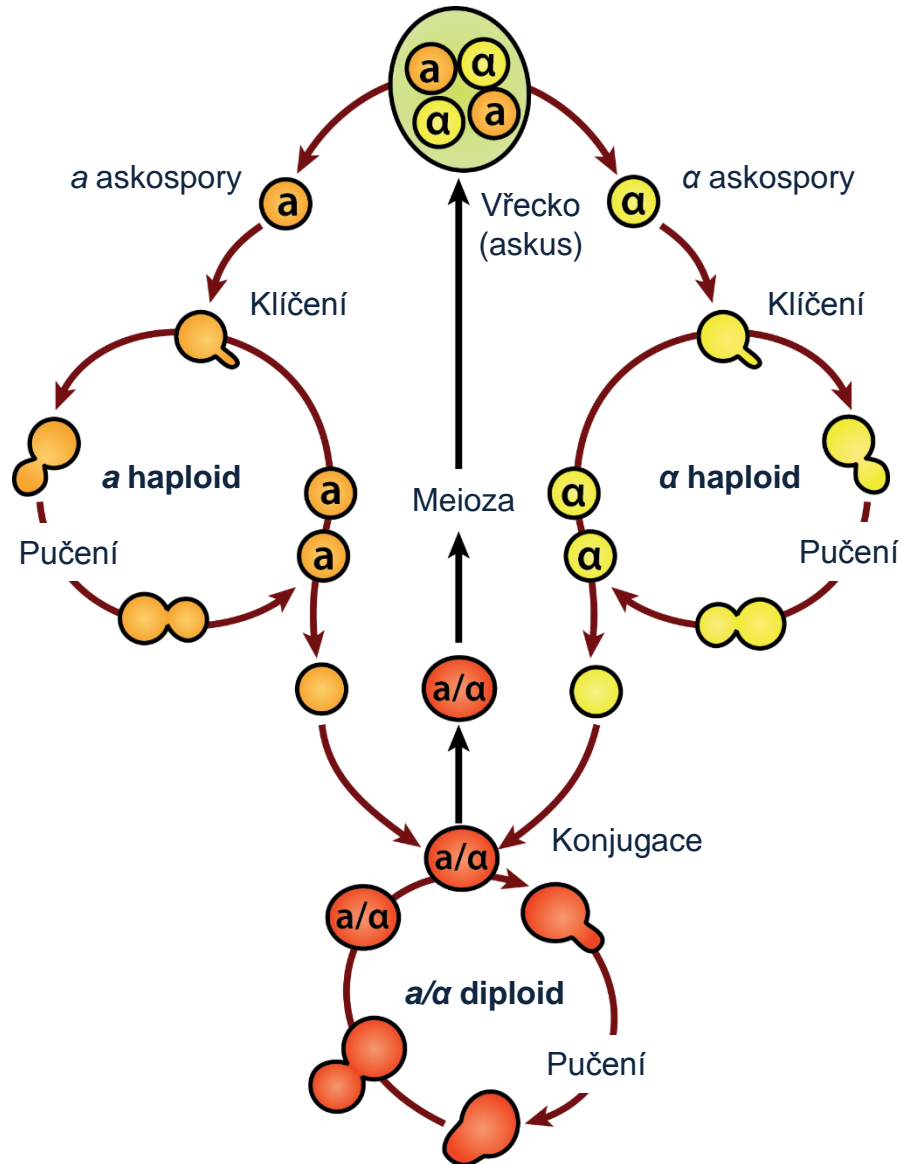
Kvasinky – pohlavní rozmnožování

- Izogamní konjugace – přibližně stejně velké buňky
- Heterogamní konjugace – velká buňka s malou
- Homothalické kmeny kvasinek – konjugace mezi buňkou a jejím potomstvem
- Heterothalické kmeny kvasinek – konjugace buňky jednoho párovacího typu s buňkou opačného párovacího typu

Izogamní konjugace rod *Saccharomyces*

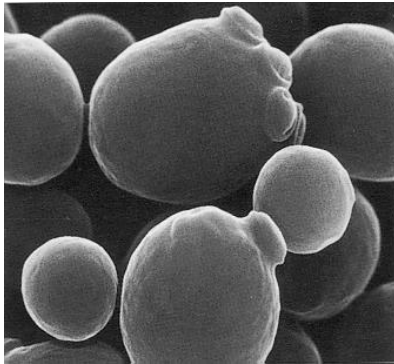


Kvasinky – životní cyklus *Saccharomyces cerevisiae*



Kvasinky – nejvýznamnější zástupci

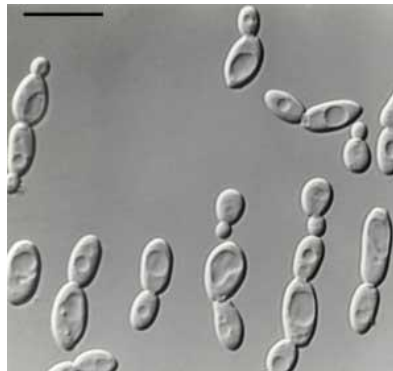
- *Saccharomyces*
 - Elipsoidní, vejčité nebo protáhlé buňky
 - Kvašení glukosy, sacharosy, maltosy, galaktosy
 - Izogamní konjugace, 1-4 askospory
 - *Saccharomyces cerevisiae* – výroba pekařského droždí, pivovarské a vinařské kvasinky, modelový mikroorganismus pro biochemické a genetické studie



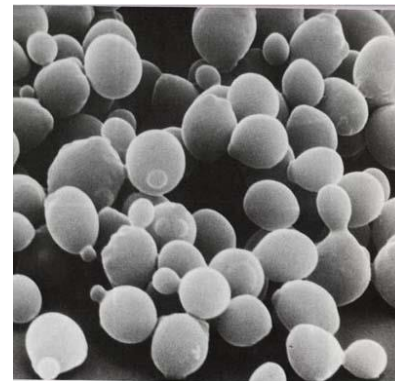
Kvasinky – nejvýznamnější zástupci

- *Kluyveromyces*
 - Zkvašování laktosy
 - Součást kefirových zrn pro výrobu kefiru
- *Pichia*
 - Tvorba protáhlých buněk a pseudomycelia
 - Nízké kvasné schopnosti, kontaminace piva a vína
 - *Pichia pastoris* – biotechnologická produkce proteinů (inzulín, antigeny, enzymy)

Kluyveromyces

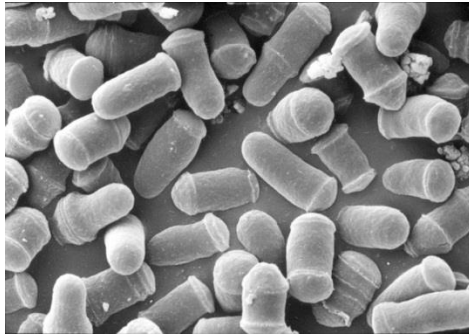


Pichia



Kvasinky – nejvýznamnější zástupci

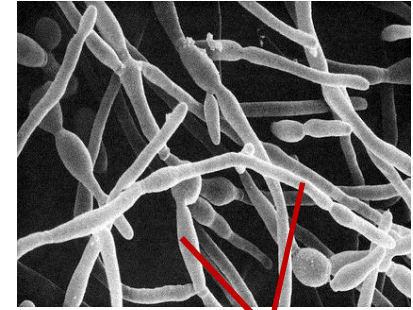
- *Schizosaccharomyces*
 - Obdélníkové buňky
 - Množí se přehrádečným dělením, ale netvoří mycelium
 - Dobré kvasné schopnosti
 - *Schizosaccharomyces pombe* – modelový organismus pro genetické studie, v Africe výroba alkoholických nápojů



Kvasinky – nejvýznamnější zástupci

- *Candida*

- Kvasinkovité mikroorganismy
- Netvoří pohlavní spory
- Tvorba pseudomycelia nebo pravého mycelia
- *Candida utilis* – příprava krmného droždí
- *Candida kefir* – využívá laktosu, výroba kefiru
- *Candida albicans* – onemocnění kůže a nehtů, kandidózy vnitřních orgánů u oslabených jedinců

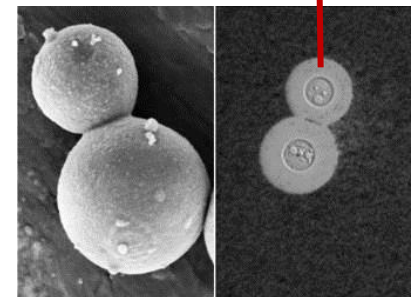


Hyfy

- *Cryptococcus*

- Kulovité až protáhlé buňky, často se slizovým obalem
- *Cryptococcus neoformans* - patogen

Slizový obal



Kvasinky – význam

- Biotechnologie – výroba alkoholických nápojů
 - Vznik ethanolu a CO₂ fermentací sacharidů za anaerobních podmínek
 - Inhibice růstu kvasinek při koncentracích ethanolu 14-18%
 - Pivo – mírně alkoholický nápoj, rozštěpení škrobu obsaženého v obilných zrnech na zkvasitelné sacharidy, následná fermentace pomocí *Saccharomyces cerevisiae*
 - Víno – vyšší obsah alkoholu, fermentace ovocné šťávy za přítomnosti disiřičitanu – inhibice růstu nežádoucích mikroorganismů

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – význam

- Biotechnologie – výroba piva
 - Suroviny – obilný slad, voda, chmel, kvasinky
 - Výroba sladu – přeměna ječmene na slad – máčení a klíčení ječmene, sušení sladu
 - Pivovarské kvasinky – *Saccharomyces cerevisiae* – svrchní – po kvašení vynášeny na povrch kapaliny, tvoří hustou pěnu, spodní – v konečné fázi se shlukují ve vločky a sedimentují na dně kvasné nádoby

Vznik mladiny



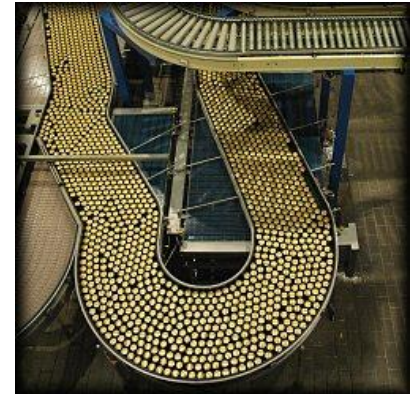
Kvašení



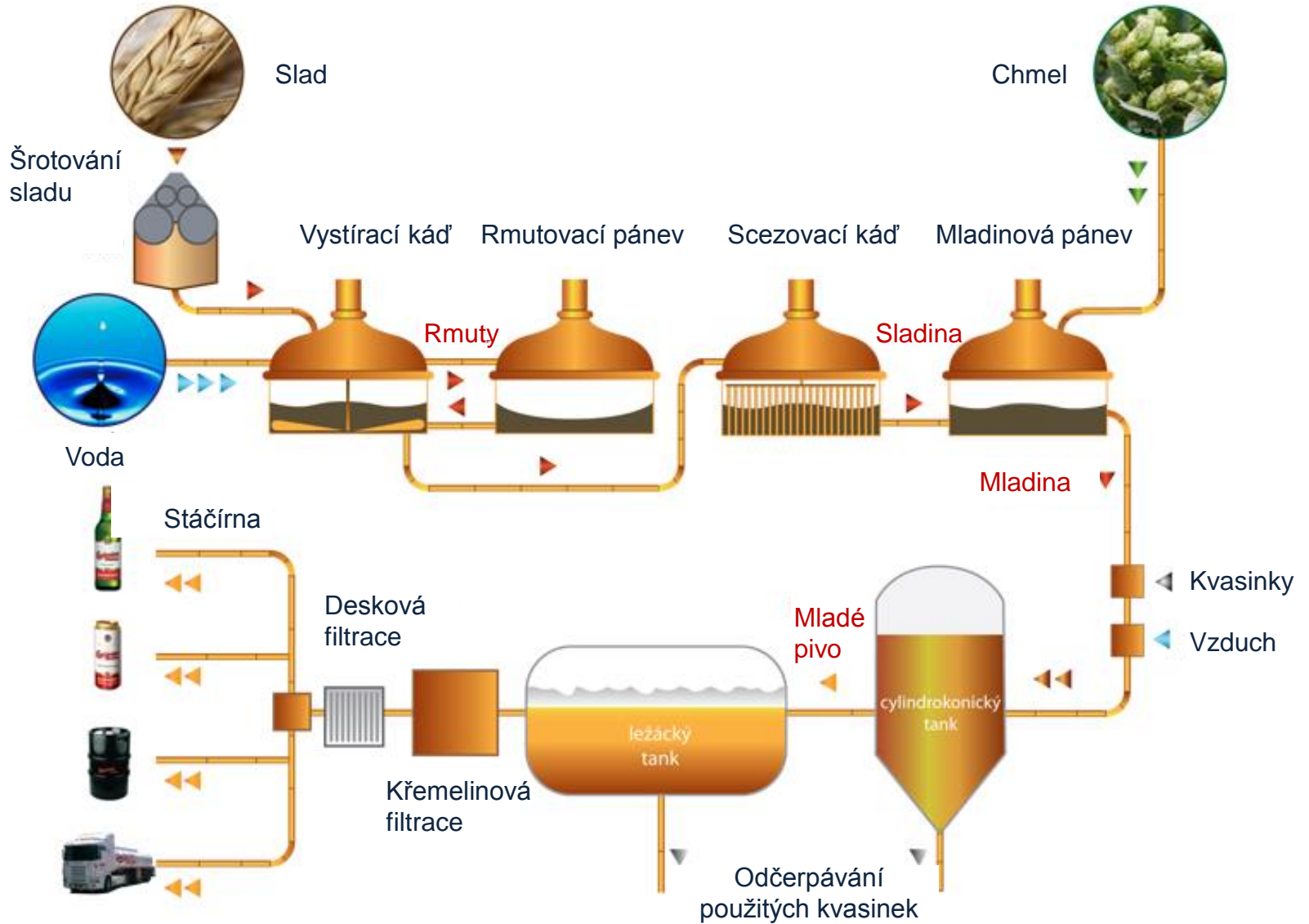
Filtrace



Stáčení



Kvasinky – výroba piva



MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – význam

- Biotechnologie – výroba vína
 - Suroviny – hrozny vinné révy, kvasinky
 - Bílé víno – kvašení moštu (po vylisování)
 - Červené víno – kvašení rmutu (mošt se slupkami)
 - Fermentace – pouze komerční kmeny *Saccharomyces cerevisiae* – více odolné k ethanolu a SO_2

Sklizeň hroznů



Získávání moštu



Kvašení moštu



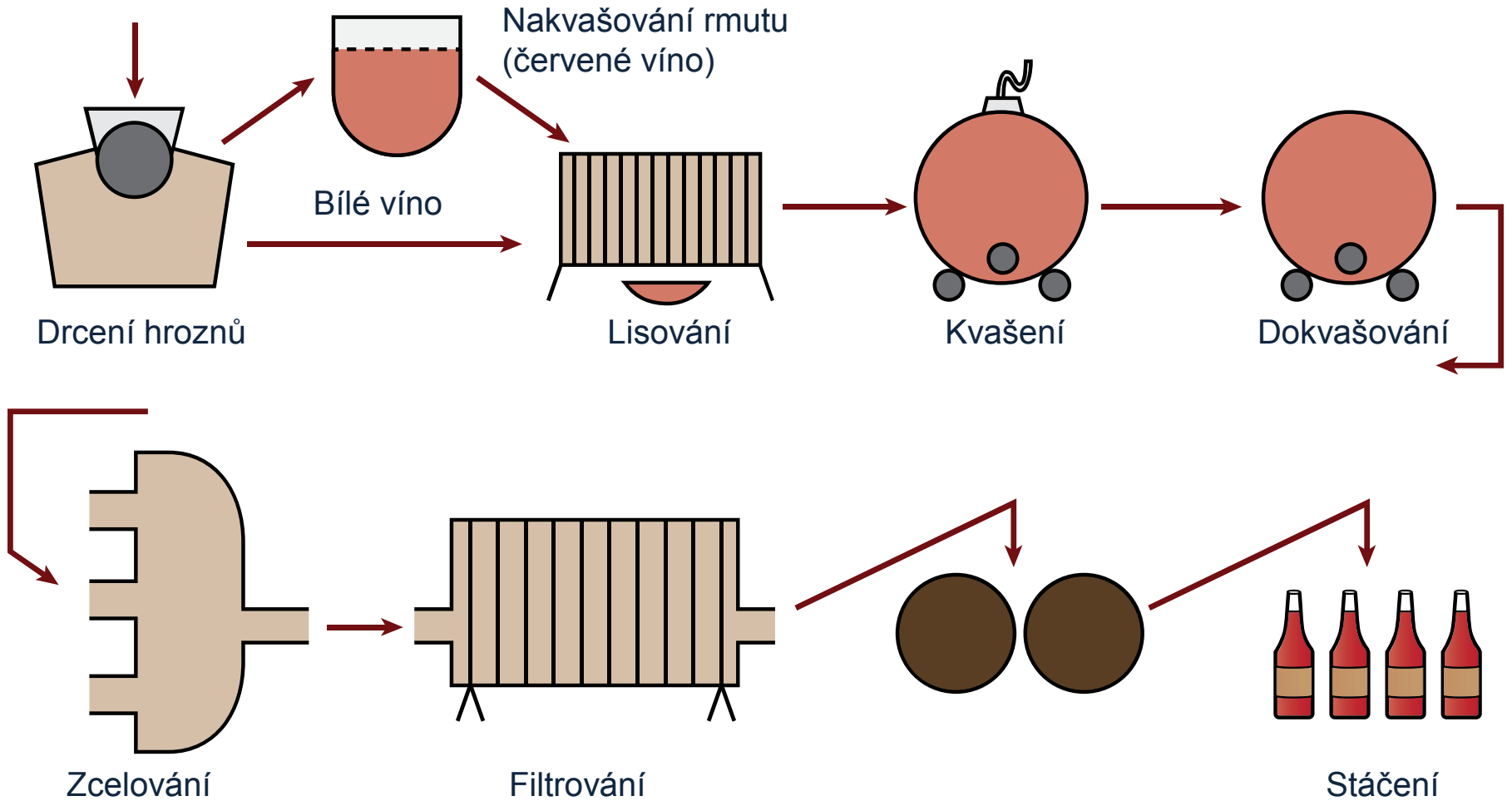
Školení a zrání vín



MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – význam

- Výroba vína



MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – význam

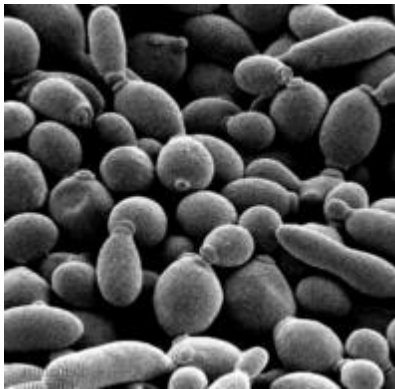
- Alkoholické nápoje vyráběné pomocí *Saccharomyces*

Nápoj	Výchozí surovina	Princip
Pivo	Ječmen	Fermentace sacharidů
Víno	Hrozny vinné révy	Fermentace sacharidů
Saké	Rýže	Fermentace sacharidů
Alkoholizované víno (sherry, portské)	Hrozny vinné révy	Fermentace a přídavek brandy pro zvýšení koncentrace alkoholu na 20%
Brandy	Hrozny vinné révy	Fermentace následovaná destilací
Whisky	Ječmen, pšenice, kukuřice	Fermentace následovaná destilací
Rum	Melasa	Fermentace následovaná destilací
Vodka	Brambory	Fermentace následovaná destilací

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – význam

- Pekařství
 - Výroba pekařského droždí – kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, fermentace melasových zápar s přidanými amonnými solemi a fosfátem
 - Výroba chleba a pečiva – mouka – škrob a sacharosa, štěpení amylasou a invertasou
 - Fermentace jednoduchých sacharidů v mouce na ethanol a CO₂
 - CO₂ způsobuje nakynutí a strukturu těsta, odpar ethanolu během pečení



Kvasinky – význam

- Doplněk výživy
 - Výživné preparáty z droždí – vysoký obsah vitamínů B
 - Přísady do potravin – polévky, omáčky
 - *Saccharomyces cerevisiae* - produkce provitamínu D
- Normální mikroflóra a původci onemocnění
 - Normální mikroflóra v zažívacím traktu
 - Původci onemocnění u oslabených pacientů, těhotných žen, novorozenců
 - *Candida* – kandidózy – infekce ústní dutiny, nehtů, kůže, urogenitálního a zažívacího traktu, méně často plic, krve, srdce
 - *Cryptococcus neoformans* – infekce plic po vdechnutí z ptačího trusu, kryptokoková meningoencefalitida – rozšíření plicní infekce

MIKROBIOLOGIE

Kvasinky – význam

- Modelové organismy
 - *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*
 - Biochemické a genetické studie
- Produkce rekombinantních proteinů
 - *Pichia pastoris* – využití jako expresní systém, výhody – methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie, rychlý růst, produkce proteinů do kultivačního média
- Produkce chemikálií
 - Izolace z buněk kvasinek – enzymy, koenzymy, nukleotidy, nukleosidy
 - Extrakty z droždí – složka kultivačních pūd v mikrobiologii

Shrnutí

Kvasinky

Organismy	Jednobuněčné, případně tvorba pseudomycelia nebo mycelia
Typ buňky	Eukaryotická
Vlastnosti buňky	Buněčná stěna z chitinu Přítomno pravé jádro, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie
Výživa	Heterotrofní
Vztah ke kyslíku	Aerobní nebo fakultativně anaerobní
Rozmnožování	Pohlavní i nepohlavní
Nejvýznamnější zástupci	<i>Saccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i>

MIKROBIOLOGIE

Reference

- Carmona-Gutierrez D., Sommer C., Andryushkova A., Kroemer G., Madeo F. (2012): A higher spirit: avoiding yeast suicide during alcoholic fermentation. *Cell Death and Differentiation* 19: 913-914.
- Dujon B. (2010): Yeast evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics* 11: 512-524.
- Ene I.V., Bennett R.J. (2014): The cryptic sexual strategies of human fungal pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 12: 239-251.
- Gerngross T.U. (2004): Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 22: 1409-1414.
- <http://highered.mcgraw-hill.com/>
- Janderová B., Bendová O., *Úvod do biologie kvasinek*, Nakladatelství Karolinum, Praha, 1999.
- Pollard T.D., Wu J.-Q. (2010): Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 149-155.

MIKROBIOLOGIE

Reference

- Šilhánková L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Academia, Praha, 2008.
- Štindl P., *Obraz a schéma při výuce vybraných kapitol cytologie*, diplomová práce, Hradec Králové, 2005.
- Willey J., Sherwood L., Woolverton C., *Prescott's principles of microbiology*, McGraw-Hill, New York, 2009.

Animation

- http://highered.mheducation.com/sites/0072507470/student_view0/chapter25/animation__electron_transport_system_and_atp_synthesis__quiz_1_.html
- http://www.youtube.com/watch?v=wl_ayV-XuQU
- <https://www.youtube.com/watch?v=aQBTv6nLgFY>