

# 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

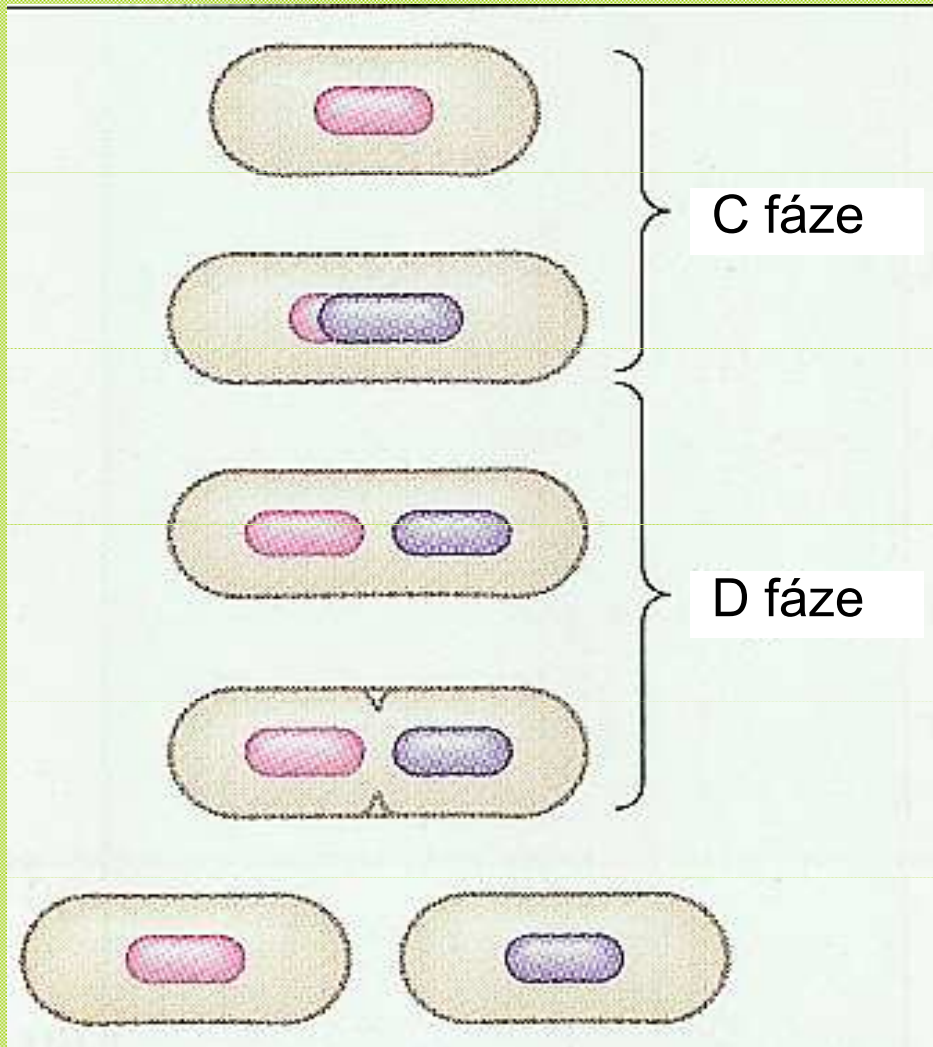
- Růst jednotlivé buňky – **vyvážený** – hmotnost, objem, obsah DNA, peptidoglykanu atd. roste za časovou jednotku rovnoměrně. Jestliže nejsou splněny podmínky jde o růst **nevyvážený**.
- Růst populace – pokud jednotlivé buňky populace vykazují růst vyvážený, nachází se populace v **ustáleném stavu**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

# Další aspekty růstu

- Růst nelimitovaný – všechny živiny jsou v nadbytku po celou dobu kultivace
- 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)
- Růst čisté a směsné kultury



# Buněčný cyklus u bakterií

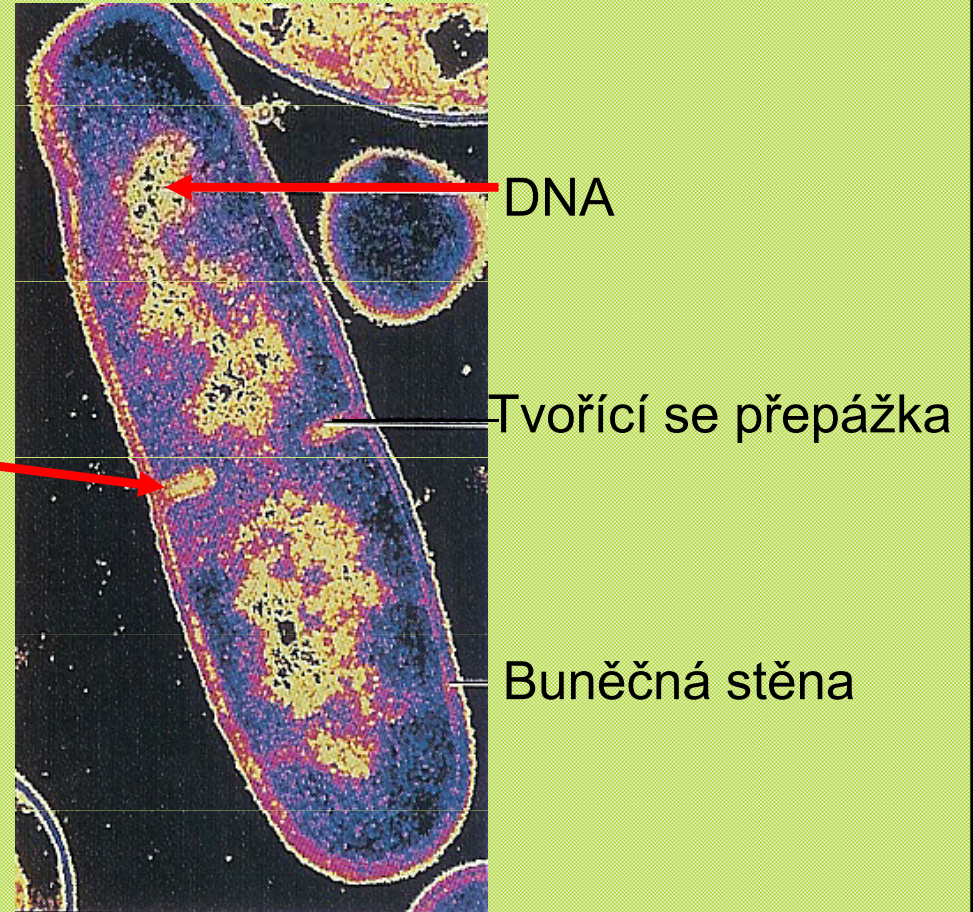
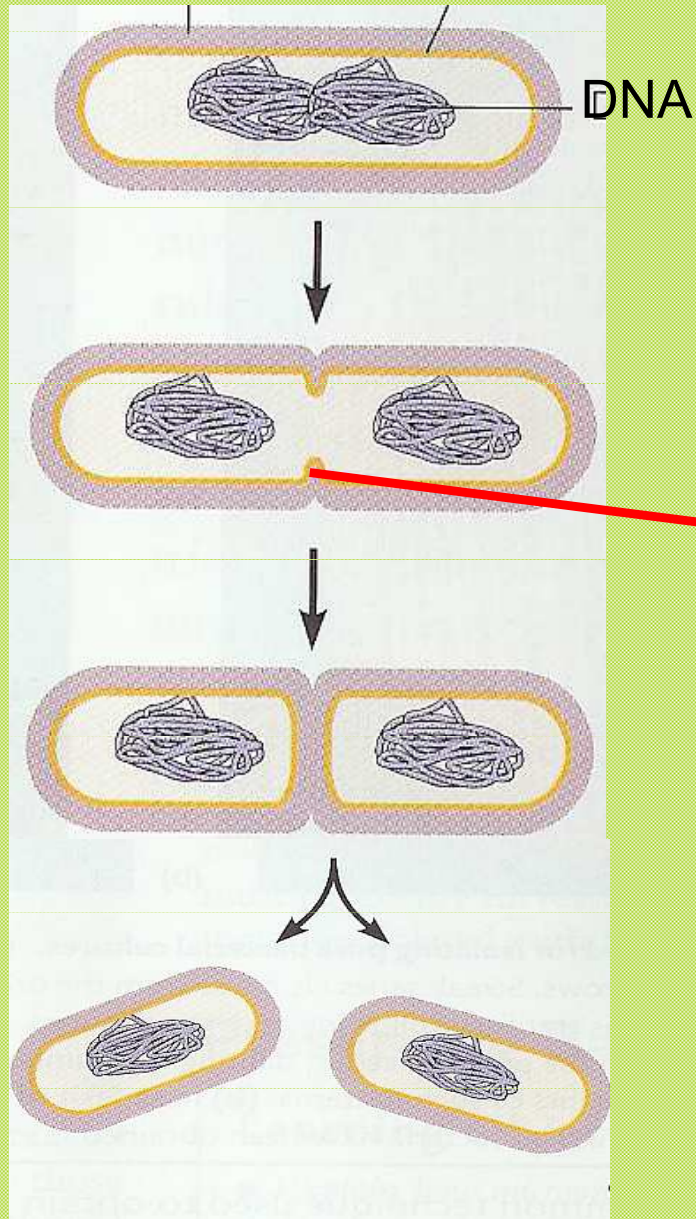


- **C fáze** – zvětšování objemu buňky (Syntéza materiálu buňky včetně syntézy buněčné stěny –vkládáním stavebních jednotek na specifická místa). Začátek replikace bakteriálního chromozomu (na iniciaci se podílí produkt dnaA genu)
- **D fáze** – dokončení replikace DNA, vytváření septa (přepážka tvořená 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



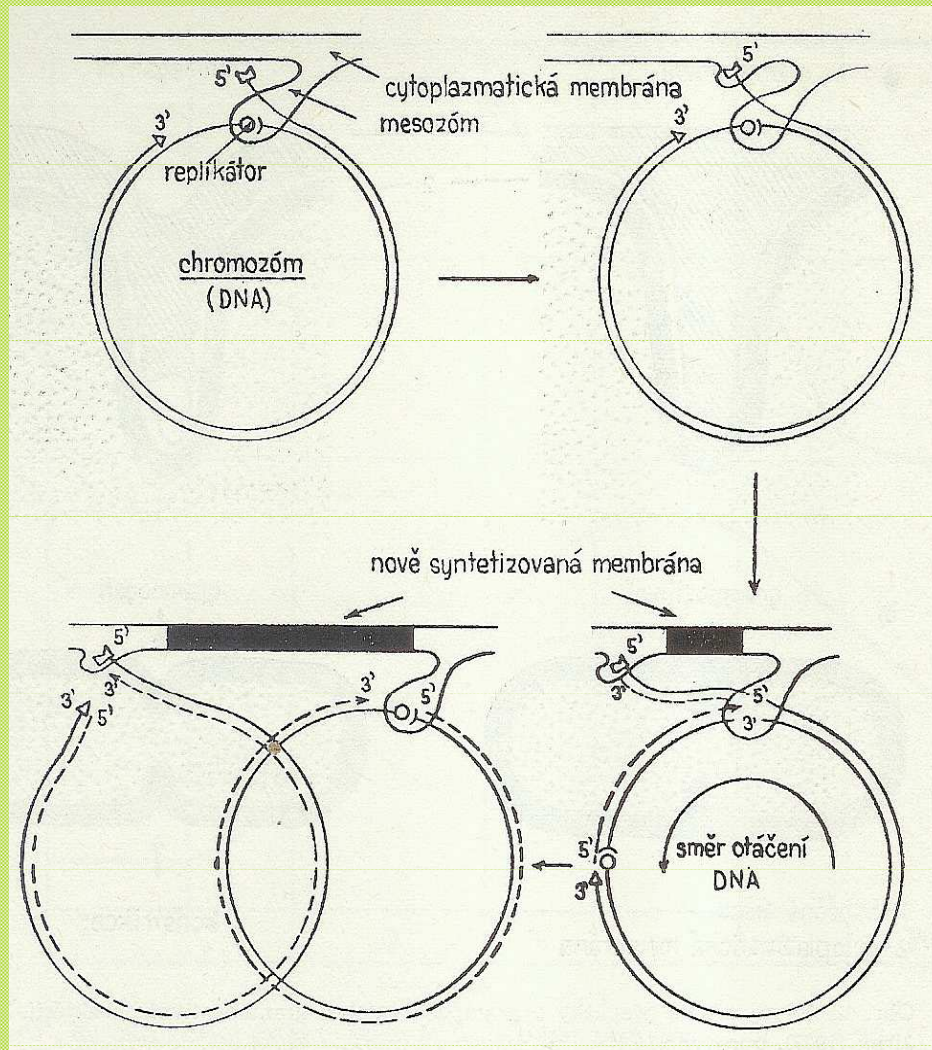
# Dělení buněk

Buněčná stěna    Cytoplazmatická membrána



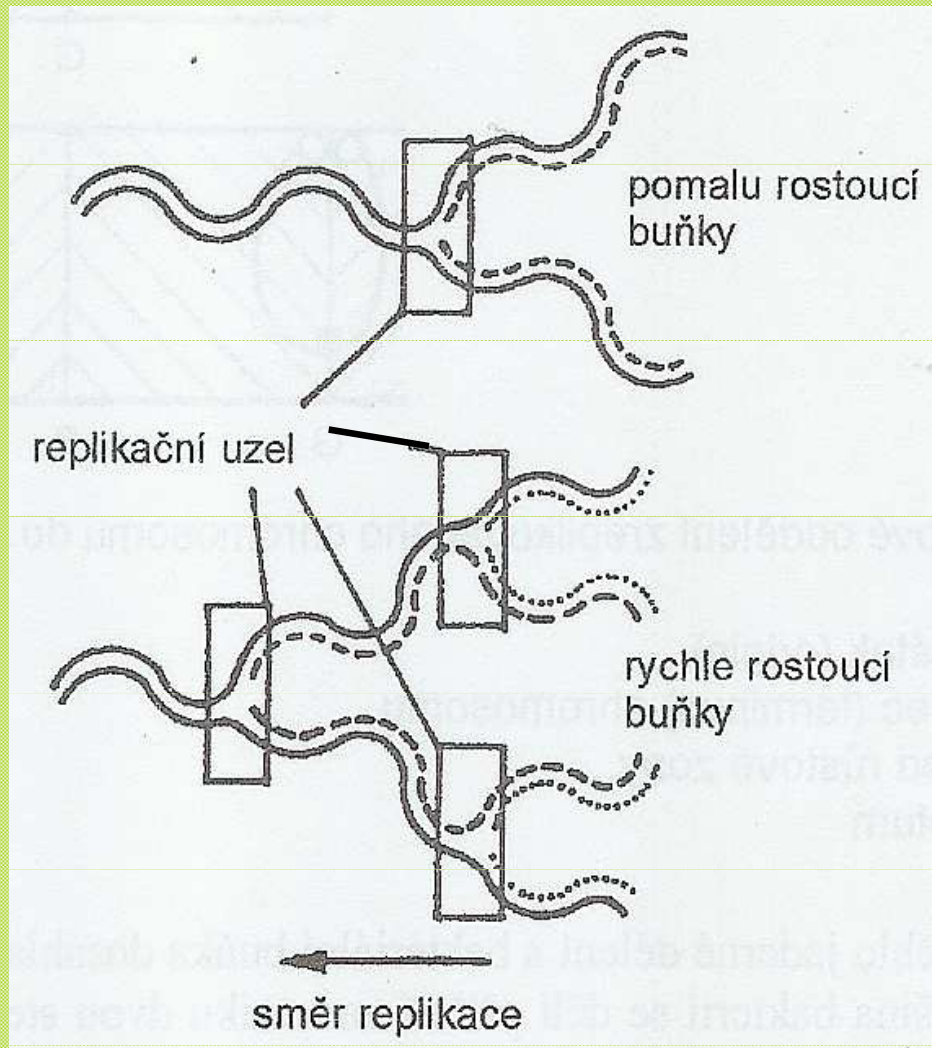


# Replikace bakteriálního chromozomu



- 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

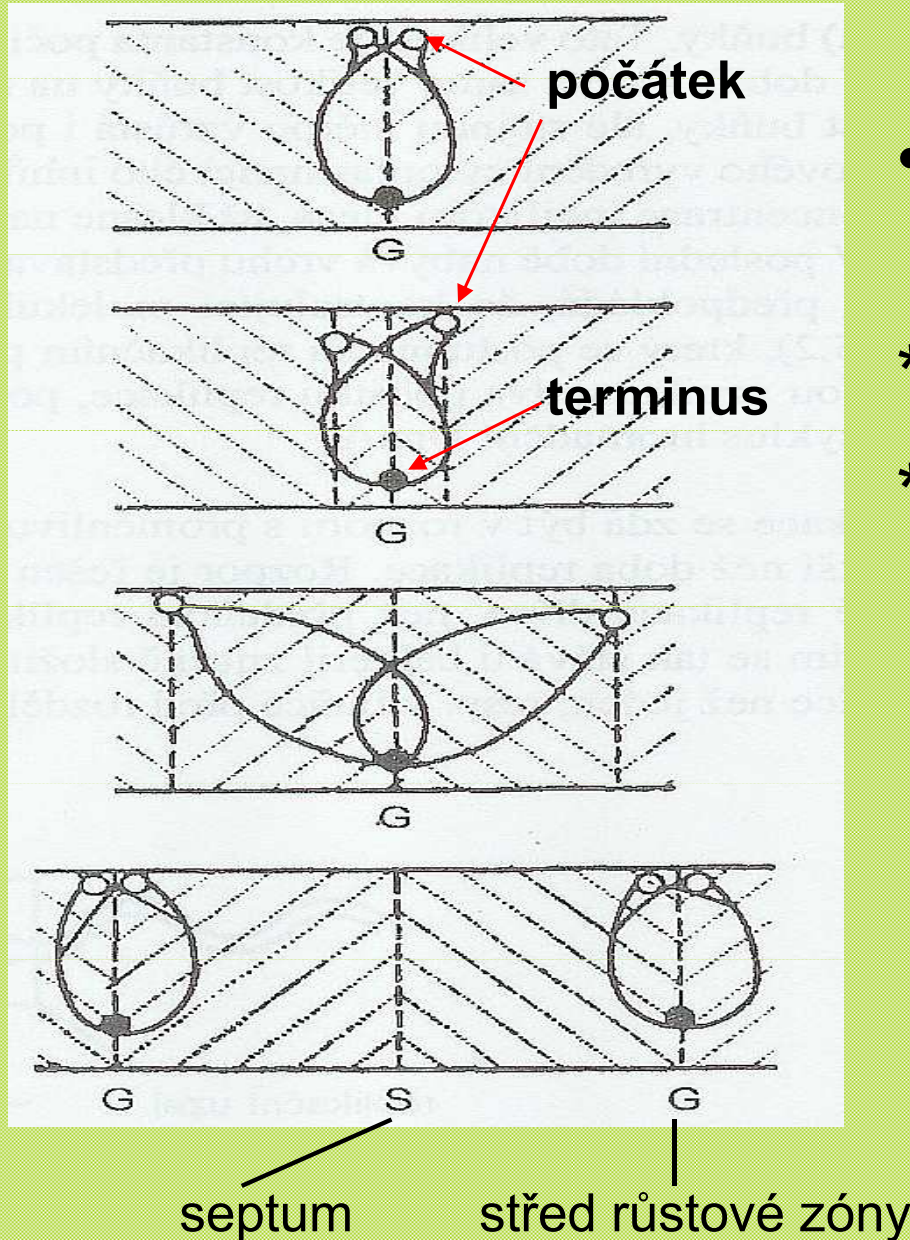
# Replikace bakteriálního chromozomu



- 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



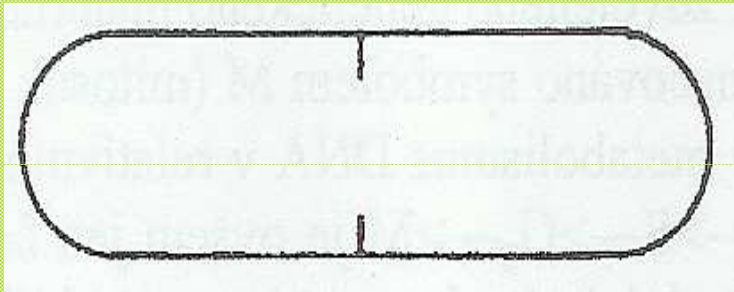
# Replikace bakteriálního chromozomu



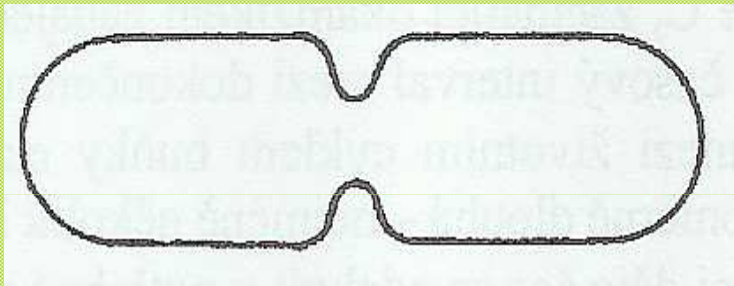
- Prostorové oddělení chromozomů
  - \*u eukaryot – vřeténkem
  - \*u prokaryot intenzivním lokálním růstem mezi místy připojení chromozomů k cytoplazmatické membráně

# Tvorba septa – dělení buňky

Bez konstriktce u většiny G+



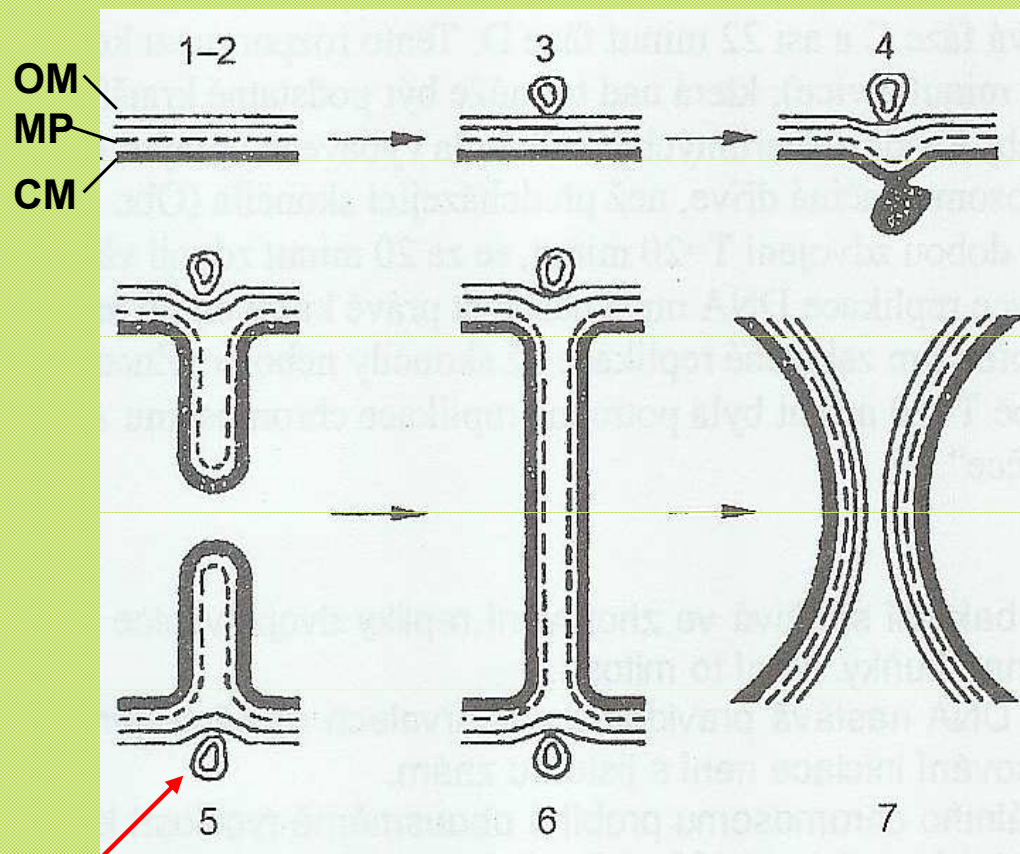
S konstrikcí u většiny G-



- 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

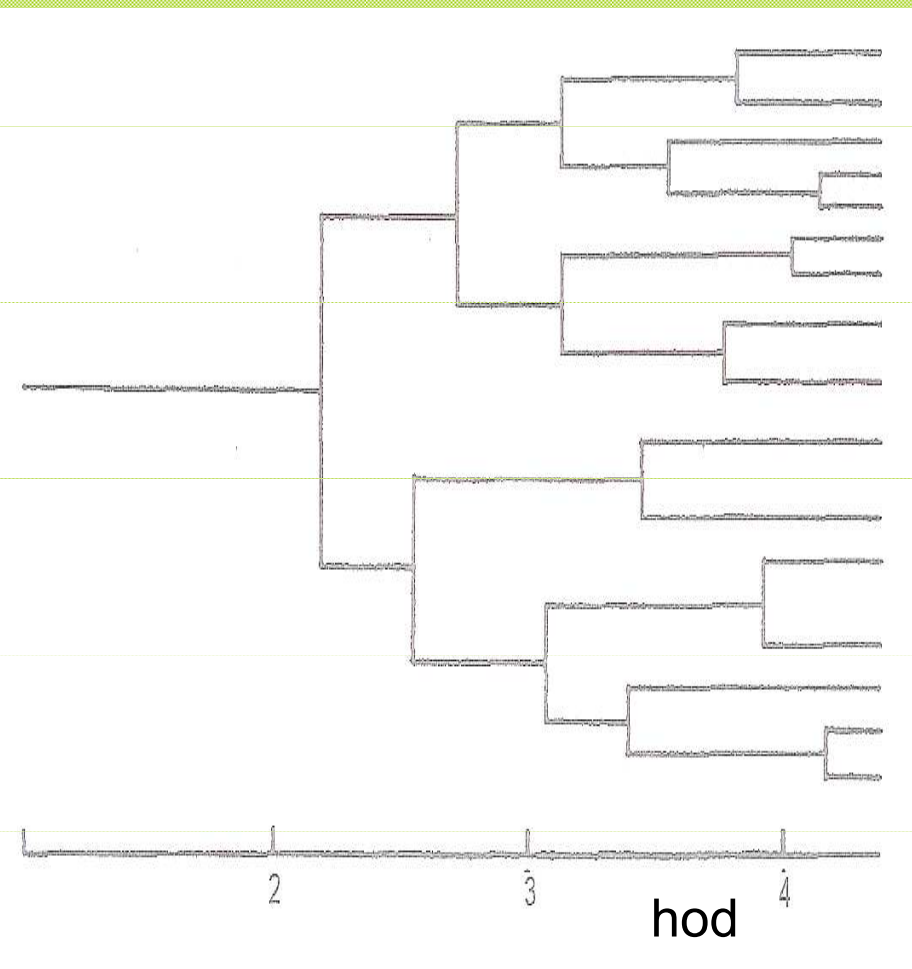
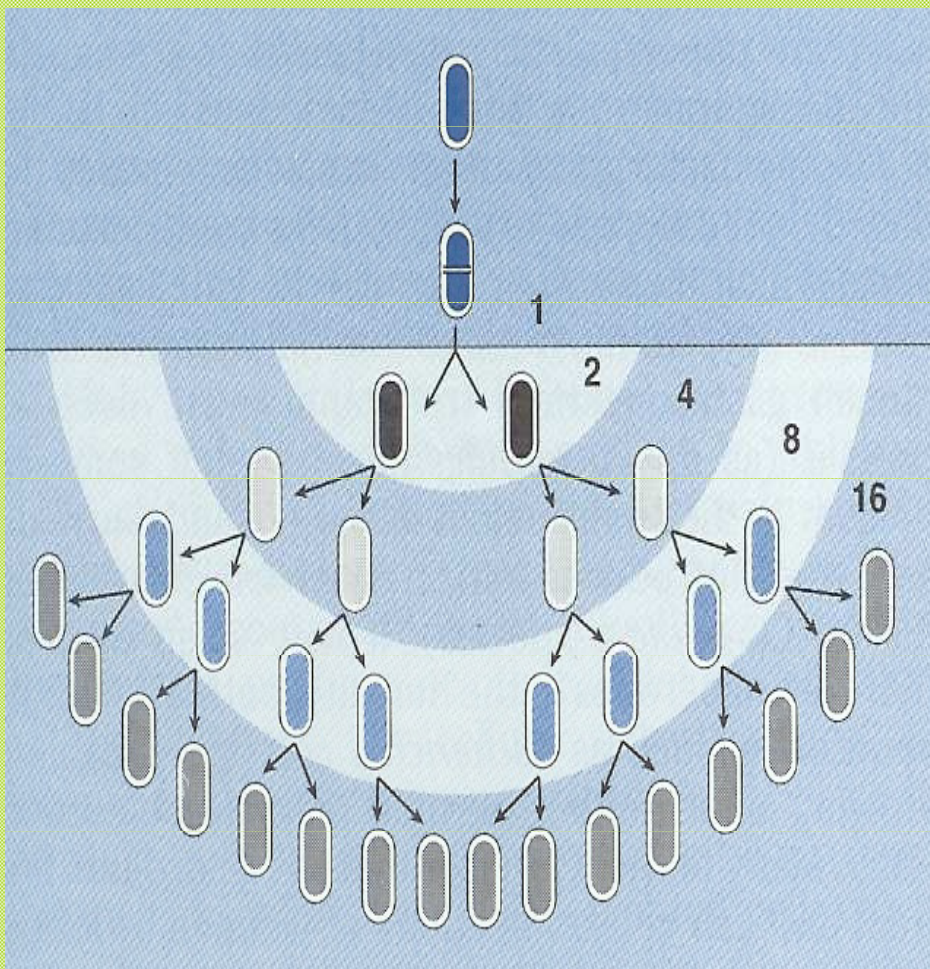
MP - peptidoglykan

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

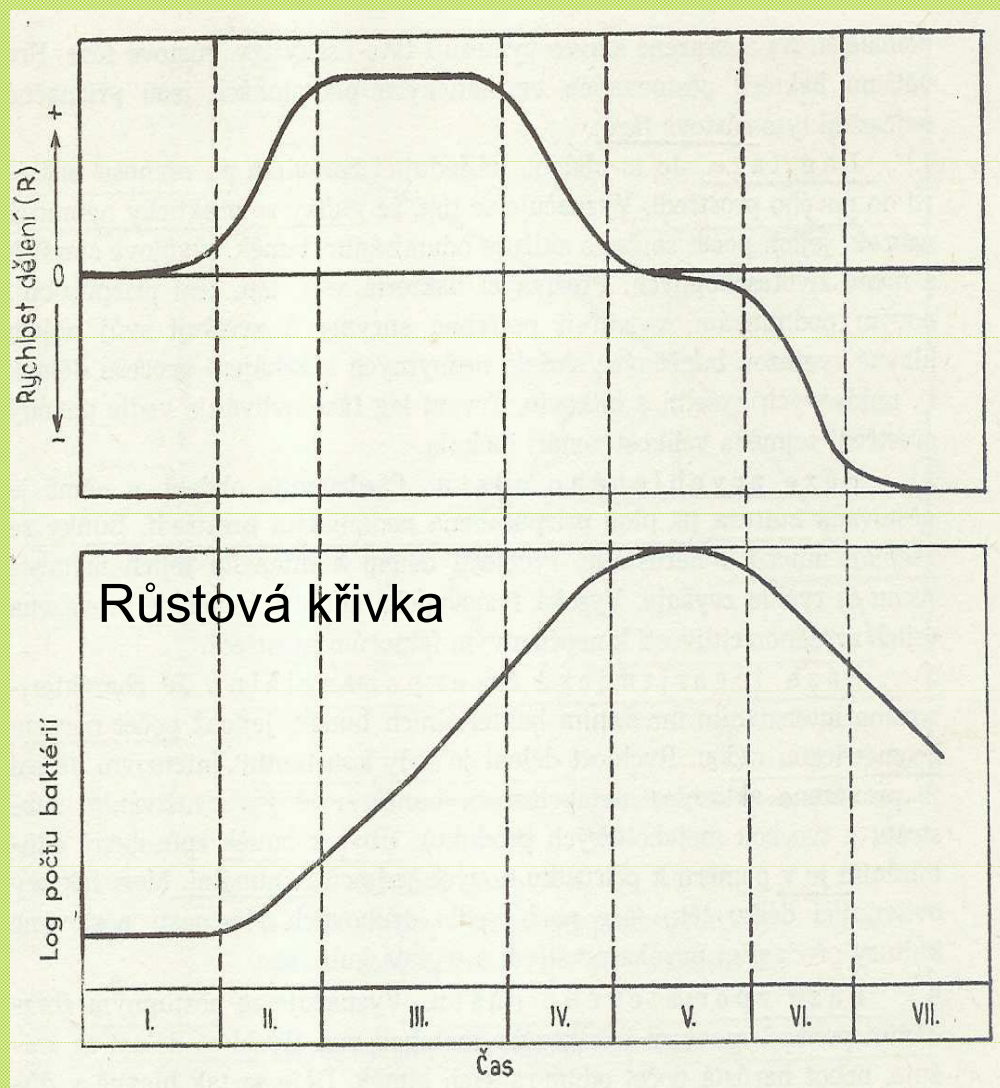
- Buňky vzniklé dělením buňky rostoucí vyváženě, **nejsou** fyziologicky přesně identické a rovnocenné
- V populaci se nacházejí buňky v odlišných fázích životního cyklu (od buněk nejmenších - těsně po rozdělení až po největší - těsně před rozdělením)
- Jednotlivá buňka mezi děleními roste “rovnoměrně“ 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
- **Kontinuální** – otevřený systém – koncentrace živin i metabolitů je udržována na stanovené hladině
- **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“



# 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<sub>0</sub>, 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 ( $\tau$ )**

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

# 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  $\mu$  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  $\mu$  je v exponenciální fázi závislá na koncentraci substrátu (esenciální živiny)

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

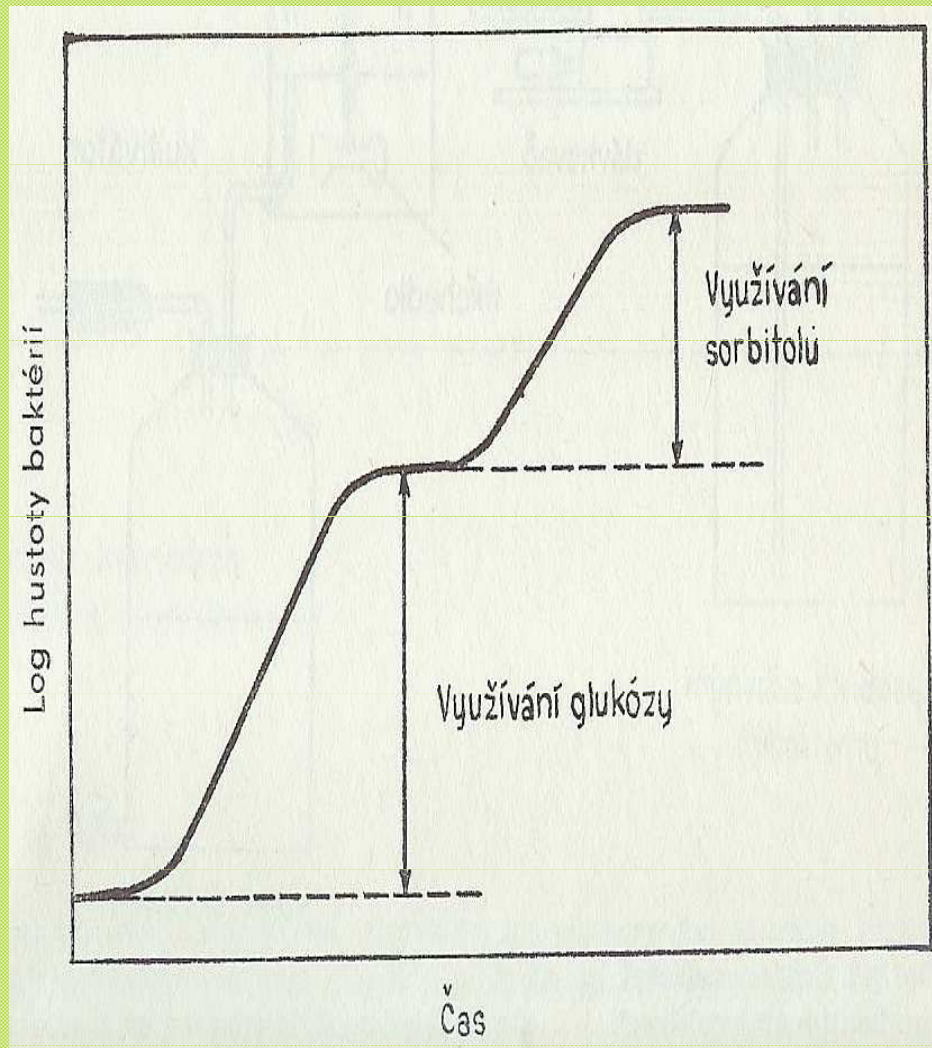
kde

$\mu_m$  = maximální růstová rychlost

$S$  = koncentrace substrátu

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

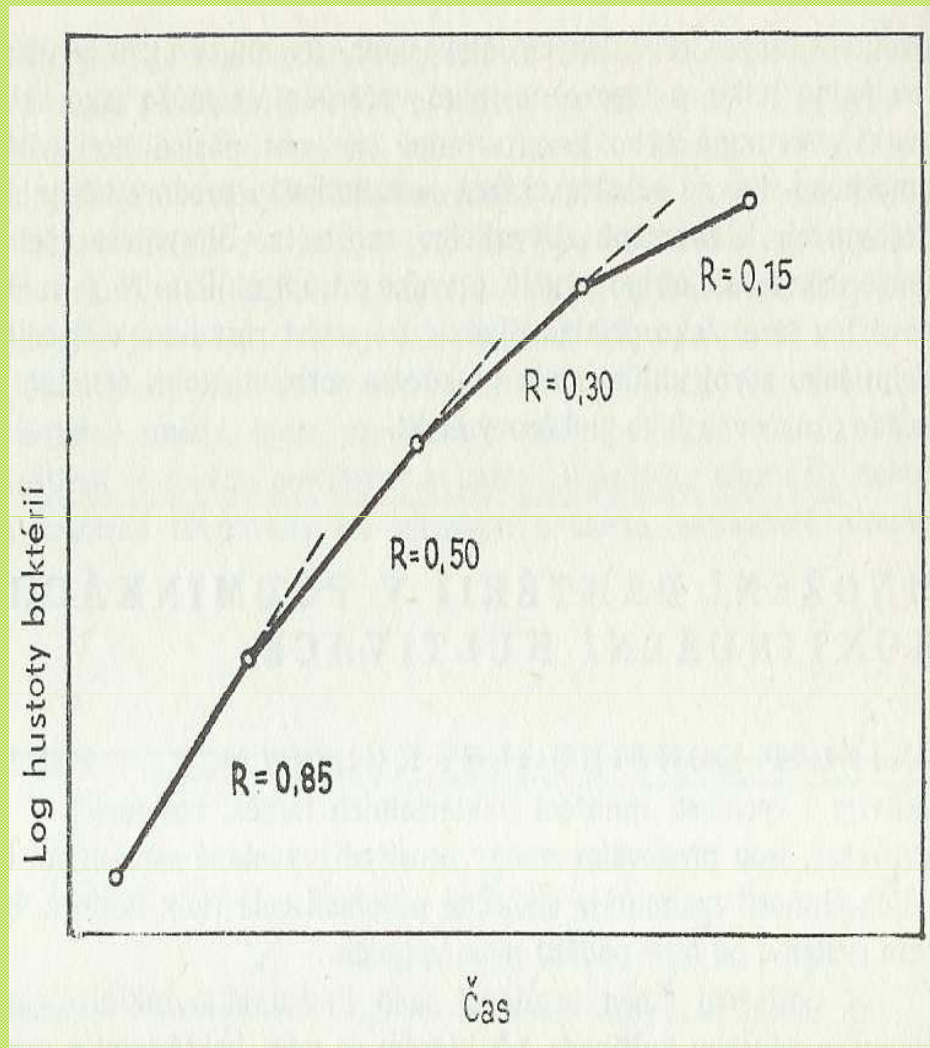
# Diauxie



- 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  $\text{CO}_2$ . Při suboptimální koncentraci jsou syntetizovány zásobní látky, které jsou následně využívány po vyčerpání základního media

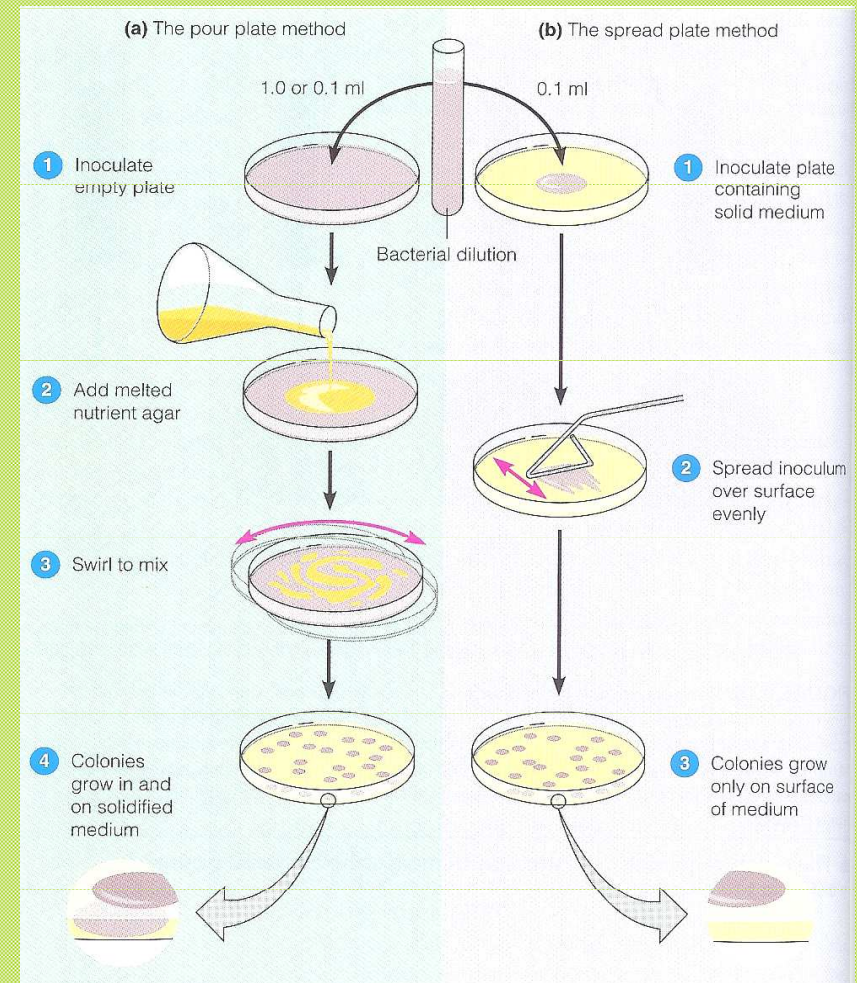
# Metody pro stanovení růstové křivky

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



# Metody pro stanovení růstové křivky

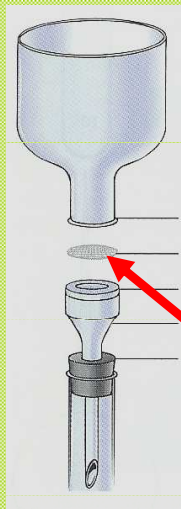
- Počítáním živých buněk - plotnová metoda



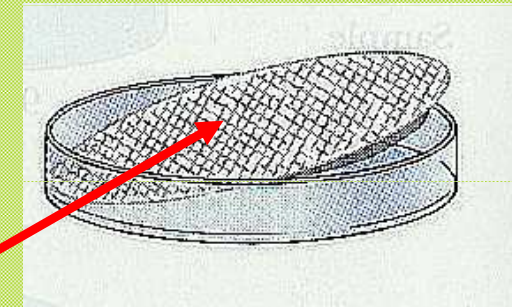
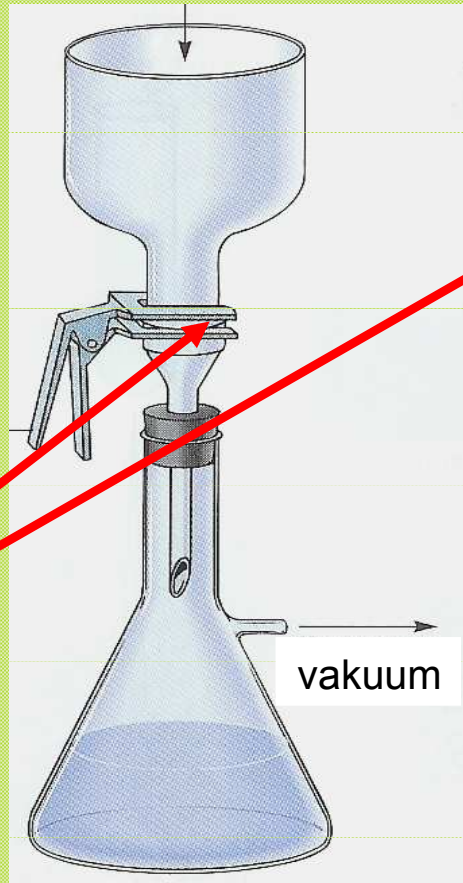
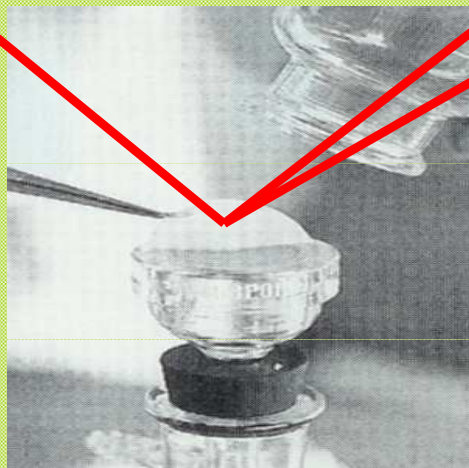


# Metody pro stanovení růstové křivky

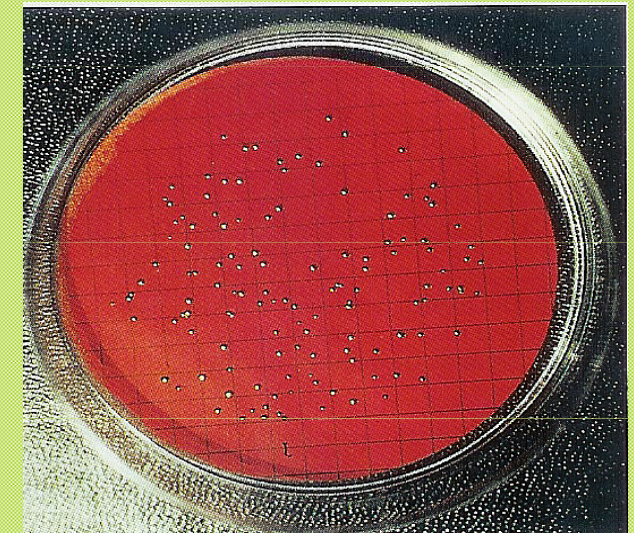
- Počítáním živých buněk – metoda membránových filtrů



nálevka  
membránový filtr  
základní deska



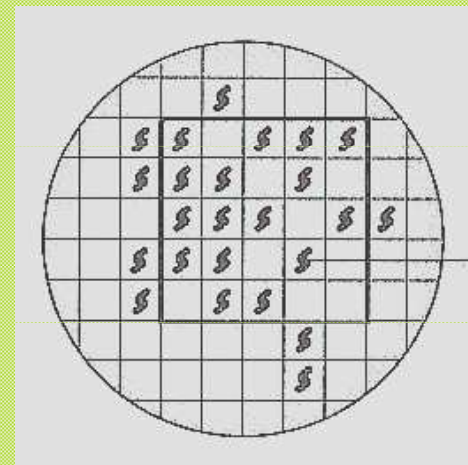
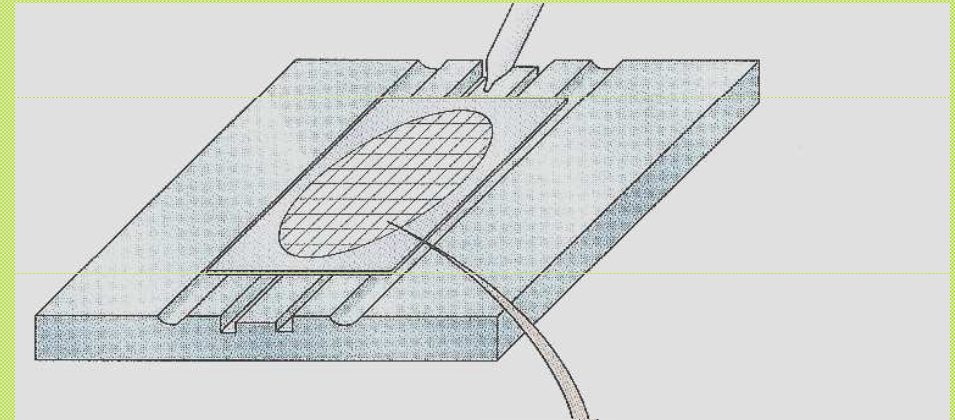
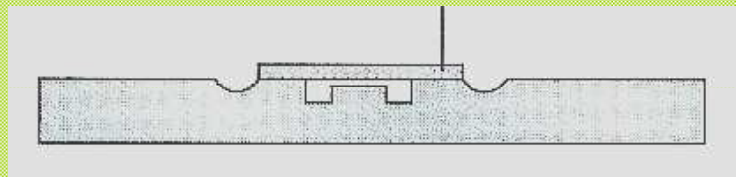
Miska s agarem





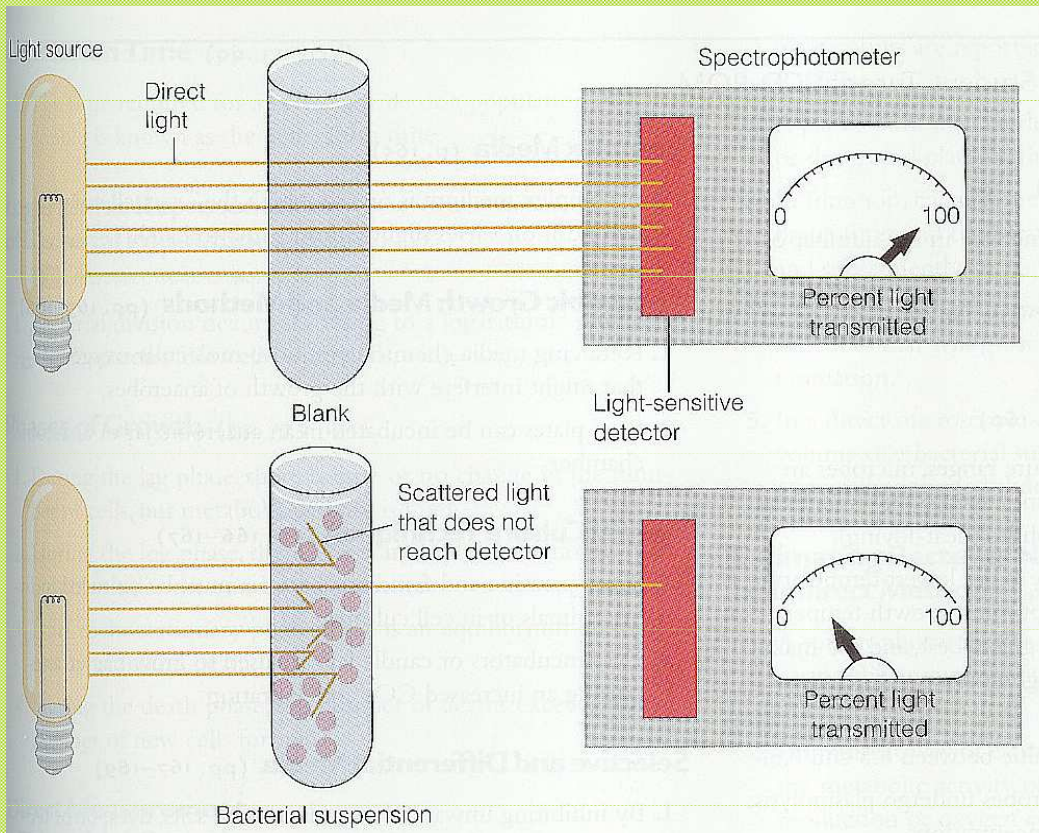
# Metody pro stanovení růstové křivky

- Počítáním živých buněk – počítací komůrka

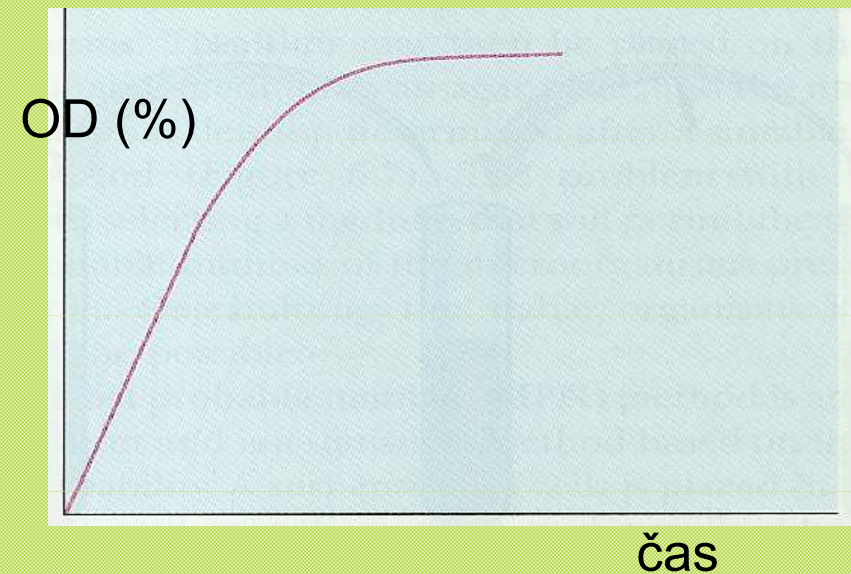


# Metody pro stanovení růstové křivky

- Stanovením optické denzity suspenze



Růstová křivka stanovená turbidimetrem





# Metody pro stanovení růstové křivky

- Stanovením biomasy
  - \*stanovení sušiny
  - \*rozpuštěných bílkovin
  - \*mokrých 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)

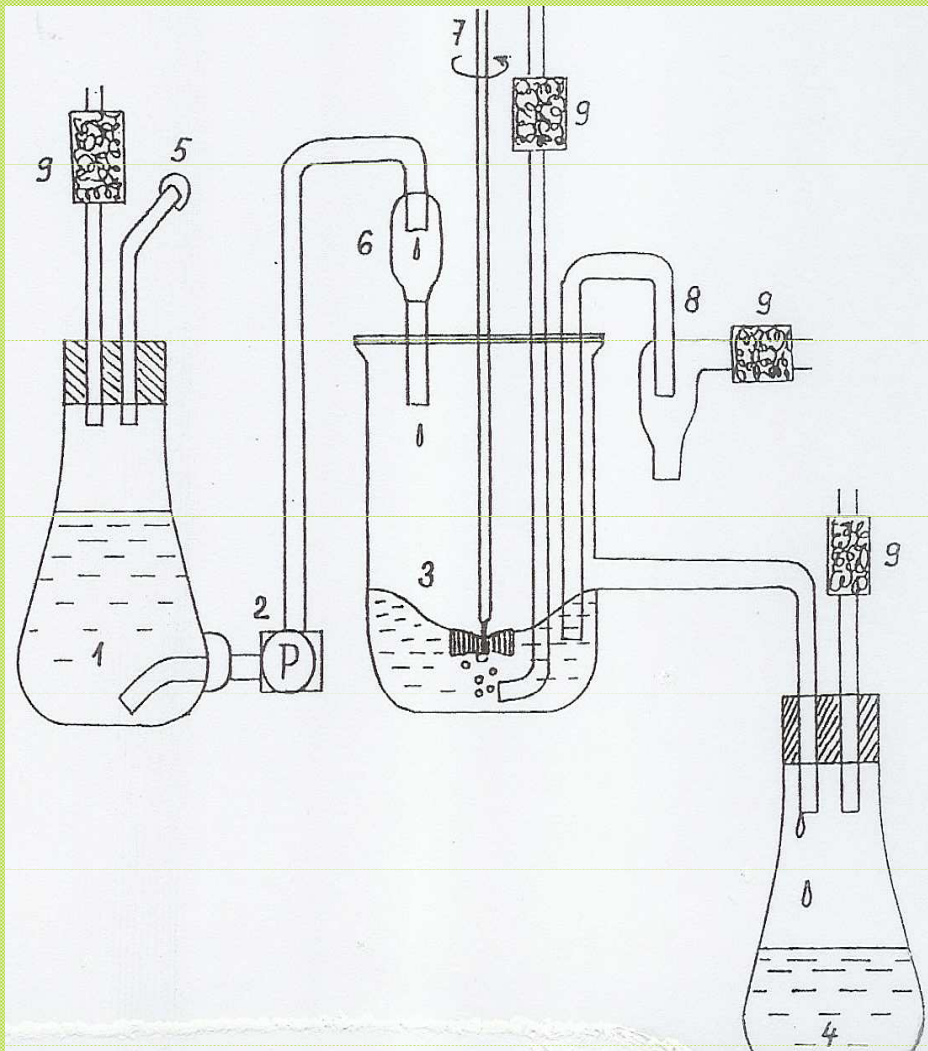
- \*filtrace membránovými filtry (zachycení buněk o přibližně stejné velikosti)

# 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 ( $\mu$ ) 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

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