

### 3. Růst a množení mikroorganismů Mikroorganizmy a vnější prostředí



Zdroj: Trends in Biotechnology

## 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 dceřiné buňky

## Růst a množení

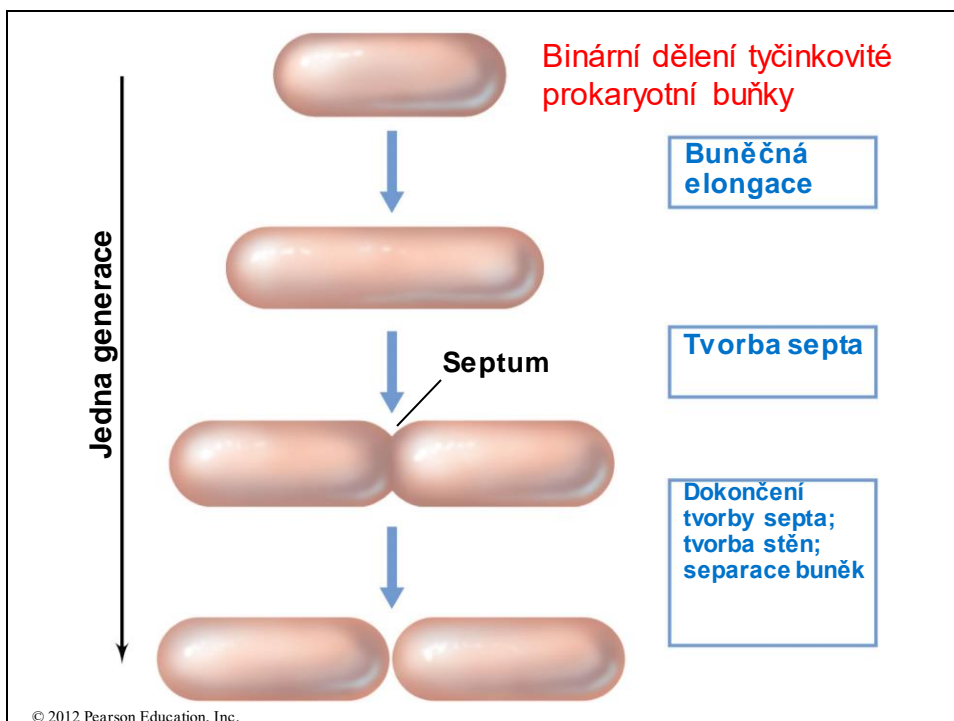
- Růst jednotlivé buňky – **vyvážený** – hmotnost, objem, obsah DNA, peptidoglykanu atd. roste za časovou jednotku rovnoměrně. Jestliže nejsou splněny podmínky, jde o růst **nevyvážený**.
- Růst populace – pokud jednotlivé buňky populace vykazují růst vyvážený, nachází se populace v **ustáleném stavu**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

## Další aspekty růstu

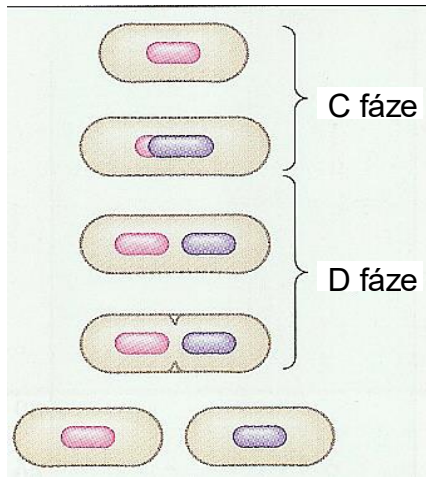
- Růst nelimitovaný – všechny živiny jsou v nadbytku po celou dobu kultivace
- Růst v tekutém prostředí (ve formě homogenní suspenze) nebo na/v zpevněném prostředí (ve formě kolonií)
- Růst v přirozeném prostředí a v prostředí *in vitro*
- Růst v prostředí homogenním (fermentor) a nehomogenním (půda,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

## Buněčný růst a binární dělení

- *Generační doba*: čas potřebný pro zdvojení počtu buněk
- Během dělení získává každá dceřiná buňka chromozom a poměrný díl ostatních složek nutných pro samostatný život.



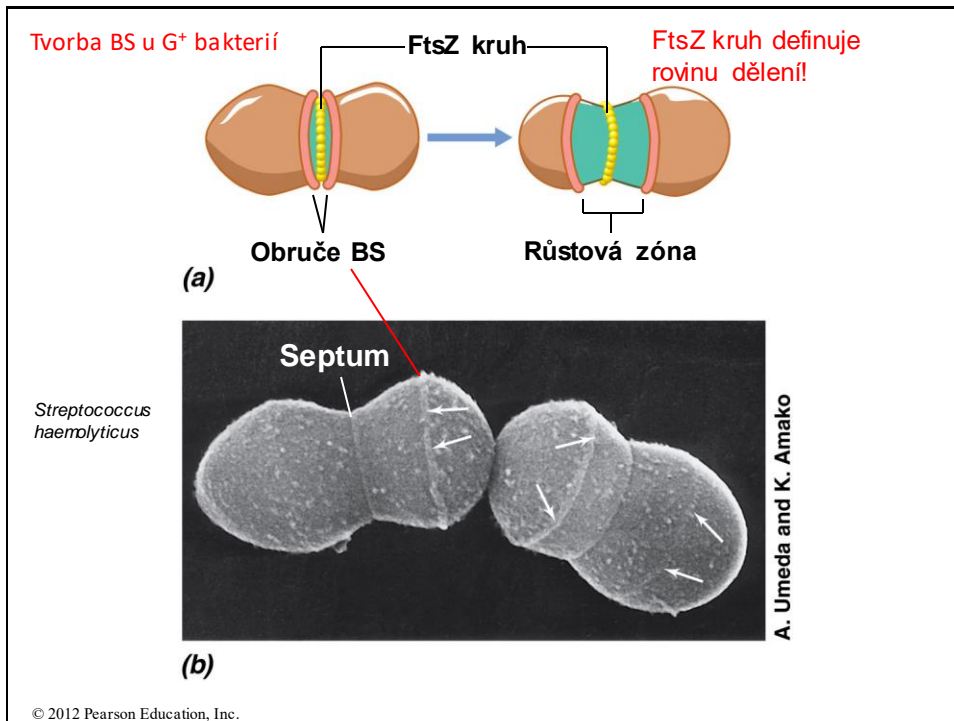
## Buněčný cyklus u bakterií



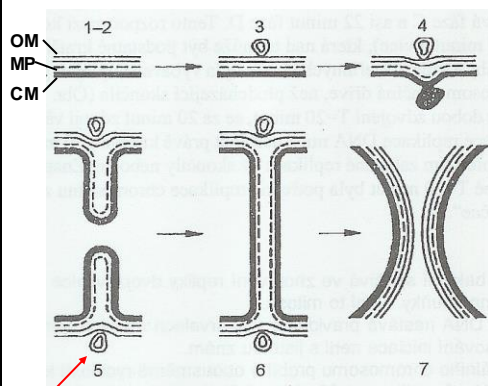
- **C fáze** – zvětšování objemu buňky (Syntéza materiálu buňky včetně syntézy buněčné stěny – vkládáním stavebních jednotek na specifická místa). Začátek replikace bakteriálního chromozomu (na iniciaci se podílí produkt dnaA genu)
- **D fáze** – dokončení replikace DNA, vytváření septa (přepážka tvořená cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou). Dokončení rozdělení buňky ve dvě buňky dceřné.
- Doba trvání jednotlivých fází je téměř konstantní asi 40 min. – C, 20 min. – D

## Syntéza peptidoglykanu a buněčné dělení

- Tvorba nového materiálu buněčné stěny je hlavní podmínkou dělení buněk
- Koky – buněčná stěna roste obousměrně směrem od FtsZ kruhu
- U tyčinkovitých buněk probíhá růst z několika bodů podél délky buňky



## Tvorba septa u *Escherichia coli*



Mimobuněčné měchýřky  
 OM – vnější membrána  
 MP - peptidoglykan  
 CM – cytoplazmatická membrána

- U G<sup>-</sup> 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 dceřiných buněk - aktivita **autolyzinů**
- Po rozdělení - pasivní spojení buněk **extracelulárním tmelem** nebo **společnou pochvou** (streptokoky, stafylokoky, neisserie, bakterie vytvářející společnou pochvu, ...)

## Dělení buněk

- Buňky vzniklé dělením buňky rostoucí vyváženě, **nejsou** fyziologicky přesně identické a rovnocenné
- Populace bakterií - 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

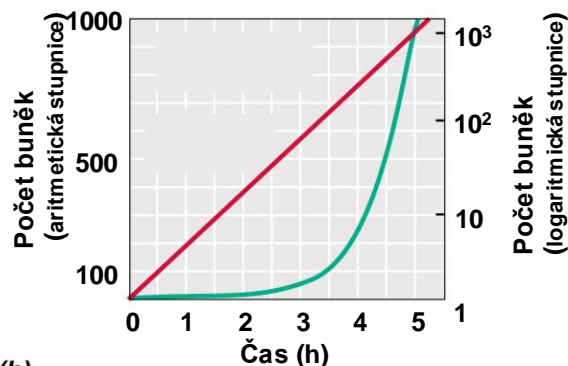
1. Koncepce exponenciálního růstu
2. Matematické vyjádření exponenciálního růstu
3. Růstový cyklus – růstová křivka
4. Růst v podmínkách kontinuální kultivace - chemostat

# 1. Koncepce exponenciálního růstu

- Většina bakterií má kratší generační dobu než eukaryotické mikroorganismy!
- Generační doba - závislá na růstovém médiu a inkubačních podmínkách
- **Exponenciální růst** – růst mikrobiální populace, kdy dochází ke zdvojnásobení počtu buněk v určitém časovém intervalu
- Během exponenciálního růstu dochází na počátku k pomalejšímu zvětšování počtu buněk. Poté následuje prudký nárůst počtu buněk, růst je rychlejší.

| Time (h) | Total number of cells | Time (h) | Total number of cells  |
|----------|-----------------------|----------|------------------------|
| 0        | 1                     | 4        | 256 ( $2^8$ )          |
| 0.5      | 2                     | 4.5      | 512 ( $2^9$ )          |
| 1        | 4                     | 5        | 1,024 ( $2^{10}$ )     |
| 1.5      | 8                     | 5.5      | 2,048 ( $2^{11}$ )     |
| 2        | 16                    | 6        | 4,096 ( $2^{12}$ )     |
| 2.5      | 32                    | .        | .                      |
| 3        | 64                    | .        | .                      |
| 3.5      | 128                   | 10       | 1,048,576 ( $2^{19}$ ) |

(a)



(b)

**Rychlost růstu mikrobiální kultury**

## 2. 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**
  - 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  
 $t = nT$ , kde  
n – počet zdvojení za dobu t-t<sub>0</sub>, T doba potřebná k rozdělení buňky

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



## 2. Růstové konstanty

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

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

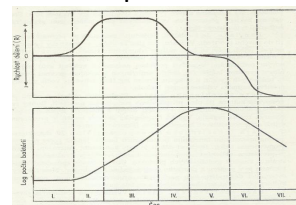
- Z tohoto vztahu odvodíme **střední generační dobu ( $\tau$ )**

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

## 2. 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**

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

## 2. 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

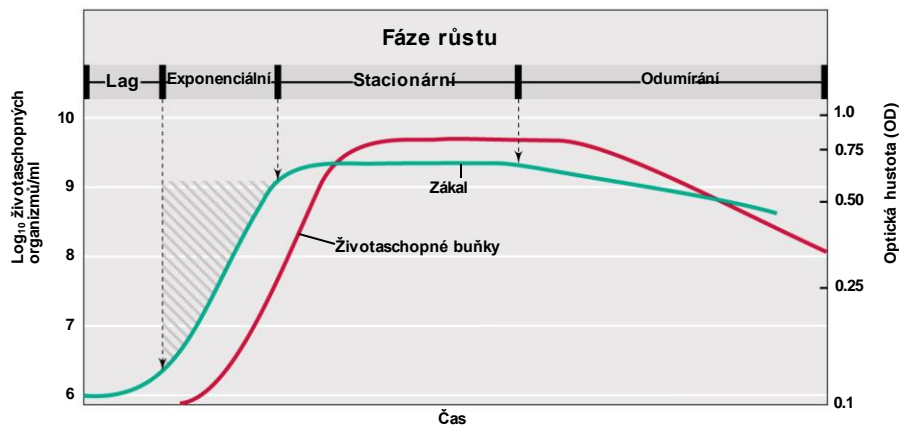
S = koncentrace substrátu

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

### Množení mikroorganismů v podmínkách statické kultivace - růstová křivka

- Uzavřený systém bakteriální kultury v médiu
  - Typická růstová křivka je charakterizována čtyřmi základními (případně šesti) fázemi
- 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



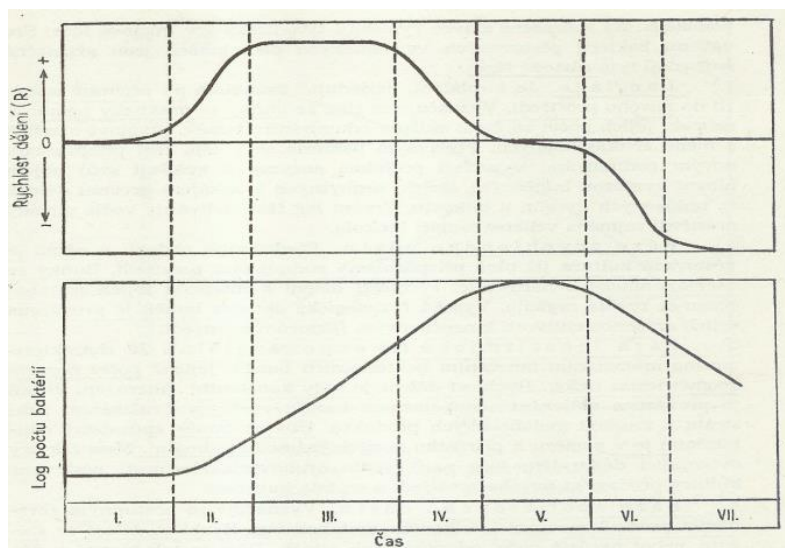
© 2012 Pearson Education, Inc.

## Růstová křivka

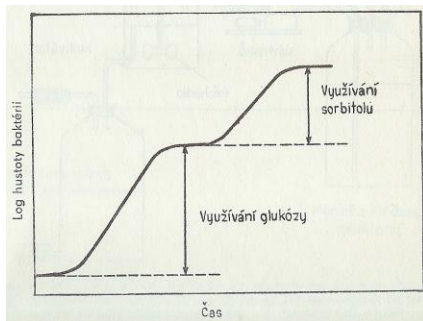
- **Lag fáze** – buňky se většinou nemnoží, snižuje se mírně počet životaschopných buněk. Buňky se přizpůsobují prostředí a syntetizují potřebné enzymy. Vytvářejí se látky potřebné pro rozdělení buňky.
- **Fáze zrychleného růstu** (fáze fyziologického mládí) – buňky jsou přizpůsobeny prostředí, ke konci 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.

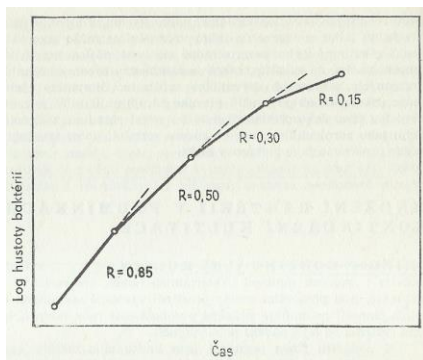


## Diauxie



- 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 média

## 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

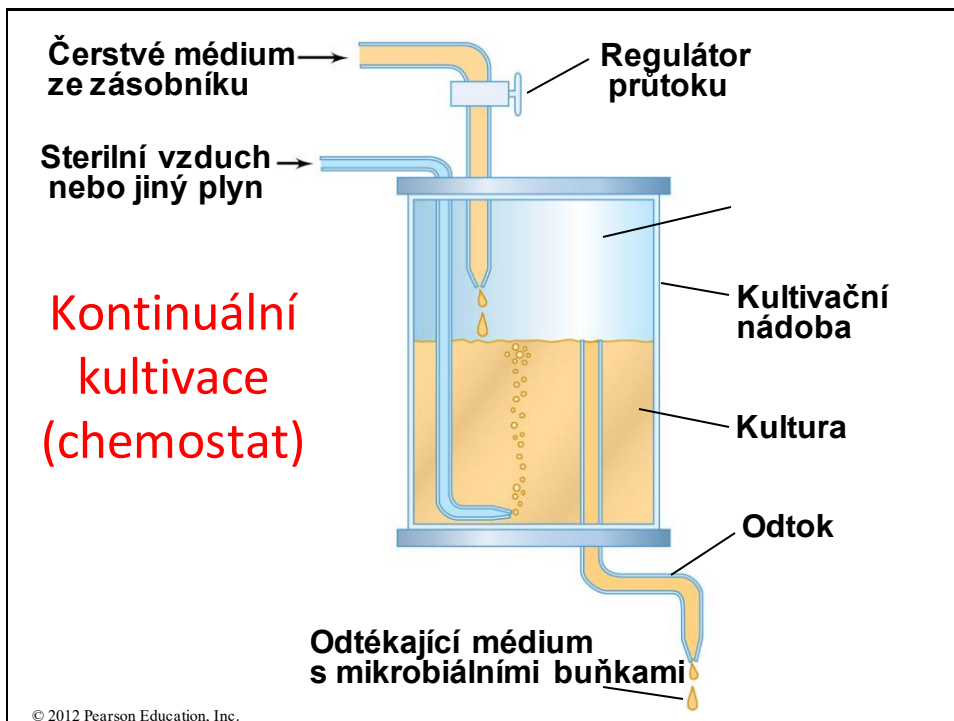
- **Metody navození synchronního množení**
  - \***chladový šok** – zastavení buněčného cyklu ve fázi C -  
blokována syntéza DNA
  - \***zfázování hladověním** – využití výživového signálu  
(ve fázi C)
  - \***filtrace membránovými filtry** (zachycení buněk  
o přibližně stejné velikosti)

## 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**

## 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

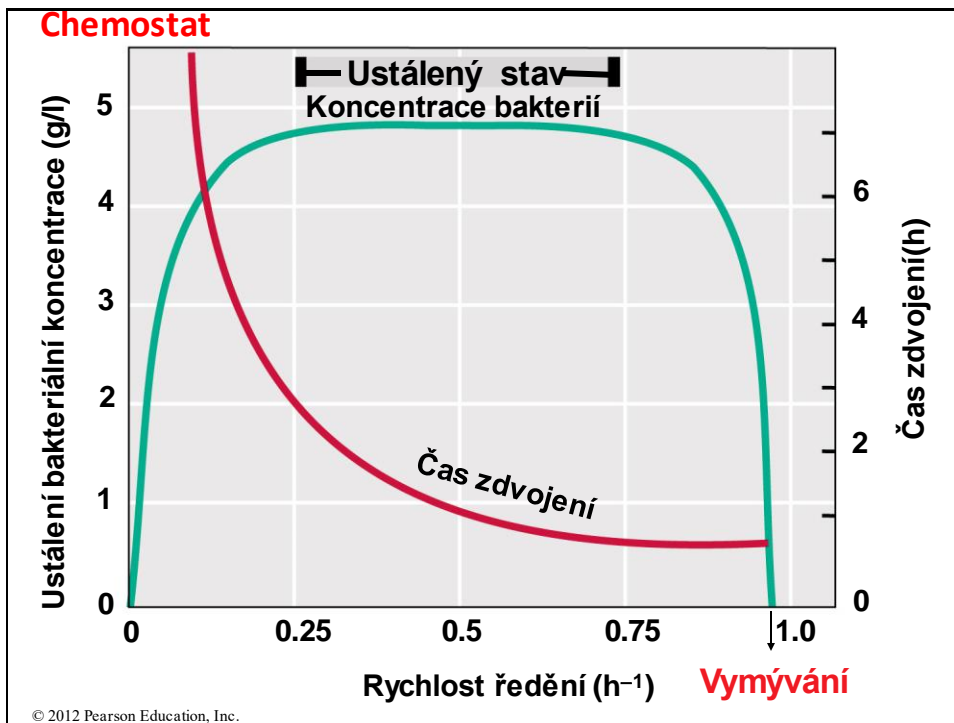


## Chemostat

- Kultury v chemostatu citlivé na:
  - ředění,
  - rychlost ředění,
  - limitující koncentraci živin
- Příliš vysoká rychlost ředění – vymytí organismů
- Příliš nízká rychlost ředění – odumírání buněk díky hladovění

*Zvyšující se koncentrace limitujících živin způsobí větší nárůst biomasy, ale při stejné rychlosti růstu!*





## 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 částice v systému udrží

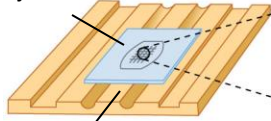
- Jestliže  $\mu > D$  buněk bude přibývat  
 $\mu < D$  buněk bude ubývat  
 $\mu = D$  počet buněk bude téměř konstantní

## Metody pro stanovení růstové křivky, počtu buněk

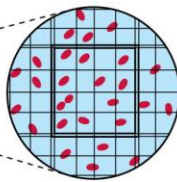
1. Počítání živých buněk (plotnová metoda, počítací komůrka)
2. Turbidimetrické metody - stanovení optické hustoty (hustoty) suspenze
3. Stanovení biomasy
  - \*stanovení sušiny
  - \*rozpuštěných bílkovin
  - \*mokrých biomasy
  - \*DNA

## Počítání živých buněk např. Bürkerova komůrka

Krycí sklíčko



Plošky o obsahu  $1/400 \text{ mm}^2$ ,  
hloubka prostoru mezi sklíčky  $0,1 \text{ mm}$   
(objem  $1/4000 \text{ mm}^3$ )



Malý čtvereček – plocha  $1/400 \text{ mm}^2$ , objem nad  
1 ploškou  $1/4000 \text{ mm}^3$ , počet  
vyhodnocených plošek – 80.  
Zjištěný celkový počet buněk -  
800, ředění suspenze 10x.

Počet buněk v 1 ml původní  
suspenze =  $800/80 \cdot 4000 \cdot 10 =$   
 $4 \cdot 10^5$  buněk

## Počítání živých buněk - omezení

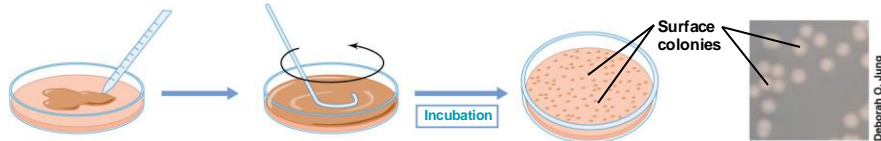
- Nerozlišuje mezi živými a mrtvými buňkami bez speciálního nabarvení
- Malé buňky mohou být přehlédnuty
- Nutná je přesnost při práci
- Mikroskopy s fázovým kontrastem jsou nutné, pokud nejsou buňky nabarveny
- Buněčná suspenze musí mít malou hustotu (<math>10^6</math> buněk/ml)
- Pohyblivé buňky musí být nejdříve imobilizovány
- Nečistoty ve vzorku mohou být chybně započítány

## Počítání živých buněk, kultivační stanovení počtu buněk

- Plotnová metoda: počítání životaschopné, reprodukcující se populace
  - Dva základní přístupy:
    - Spread-plate method – očkování inokula na agarové plotny a jeho rozetřením sterilní hokejkou
    - Pour-plate method – zalití inokula vytemperovaným agarem a důkladné rozmíchání
- Abychom získali počet bakteriálních kolonií, musíme vzorek přepočítat na základě ředění.

**Spread-plate method** – očkování inokula na agarové plotny a jeho rozetřením sterilní hokejkou

**Spread-plate method**

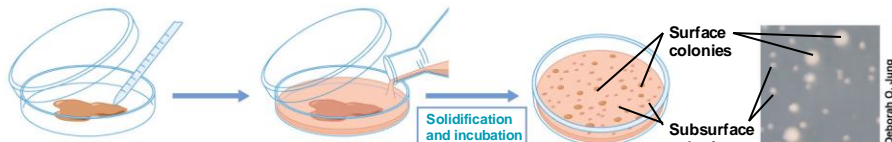


Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)

Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader

Typical spread-plate results

**Pour-plate method**



Sample is pipetted into sterile plate

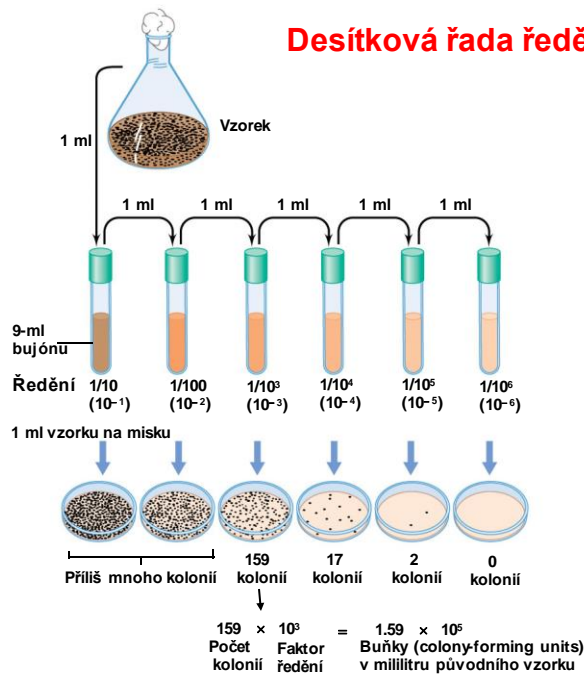
Sterile medium is added and mixed well with inoculum

Typical pour-plate results

**Pour-plate method** – zalití inokula v teplem roztaveném agaru a důkladné rozmíchání

© 2012 Pearson Education, Inc.

**Desítková řada ředění vzorku**



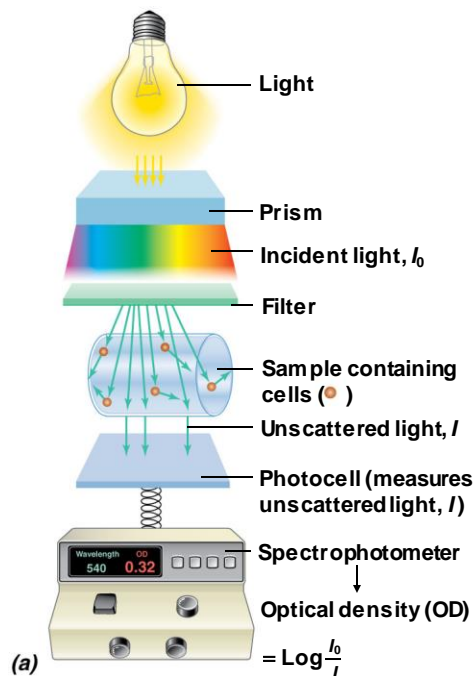
© 2012 Pearson Education, Inc.

## Turbidimetrické metody

- Měření zákalu - nepřímá, rychlá metoda
- **Spektrofotometr**
- Výsledek  
optická hustota  
(optical density, O.D.)
- *Problematické v případě, že mikroorganismy tvoří vločky nebo biofilm v tekutém médiu*



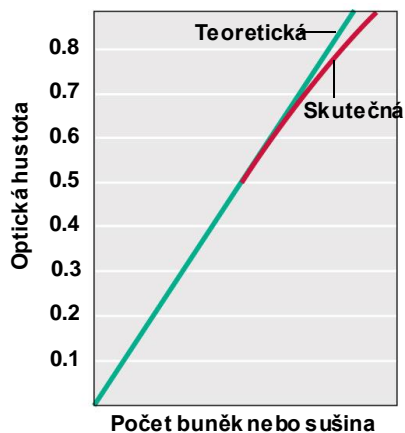
### Měření zákalu



© 2012 Pearson Education, Inc.

## Turbidimetrické metody

Abychom zjistili počet buněk ve vzorku, musíme nejdříve stanovit standardní přímku.



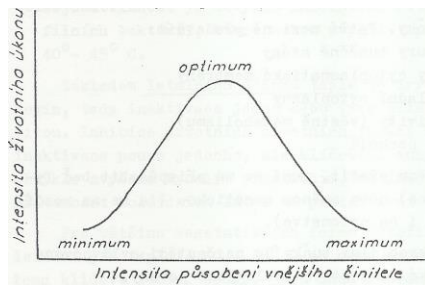
© 2012 Pearson Education, Inc.



## Mikroorganizmy a vnější prostředí

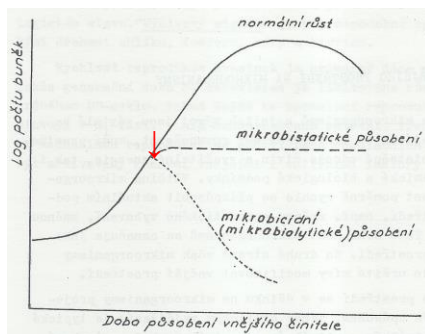


## Mikroorganizmy a vnější prostředí



- **Minimum** – nejmenší koncentrace faktoru, která vyvolá u organismu odpověď
- **Optimum** – koncentrace faktoru vyvolávající maximální odpověď
- **Maximum** – maximální koncentrace faktoru, při níž zaznamenáme ještě odpověď organismu
- Průběh křivky je shodný pro inhibiční i stimulační faktory

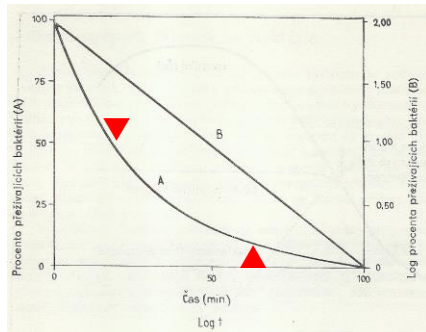
## Mikroorganizmy a vnější prostředí



↓ začátek působení vnějšího faktoru

- **Stimulační faktory** – vyvolají zvýšenou aktivitu organismu
- **Inhibiční faktory** – omezují aktivitu organismu
- **Mikrobistatické působení** – po odeznění vlivu faktoru, se vrací organismus na původní aktivitu
- **Mikrobicidní působení** – vyvolávají ireverzibilní negativní změny v organismu, které mohou vyústit jeho odumřením

## Mikroorganizmy a vnější prostředí



- ▼ odumírání senzitivních organizmů
- ▲ odumírání rezistentních organizmů

- Odumírání buněk nenastává obvykle u celé populace najednou. Populace je heterogenní fyziologicky i geneticky
- Průběh procesu odumírání se znázorní křivkou odumírání (A) nebo logaritmickou křivkou odumírání (B)
- Průměrná odpověď populace na faktor vnějšího prostředí je dána **inaktivační konstantou**

$P_0$  – počet organizmů v čase 0

$P_t$  – počet organizmů v čase t

## Podmínky ovlivňující působení vnějších faktorů

- **Povaha a intenzita** působení faktoru – některé faktory působí na všechny organizmy (teplo, UV, tlak, ...), jiné selektivně (jen na některé organizmy – chemické látky)
- **Doba a teplota** působení – limitující je doba působení - prodloužením doby se zvětšuje účinek. Efektivní dobu je možné měnit změnou teploty (obvykle při vyšší teplotě vyšší účinek)
- **Povaha organismu** – vegetativní buňky jsou citlivější než klidová stadia (nejcitlivější na začátku log fáze)
- **Povaha prostředí** – zesílení/oslabení účinku lze dosáhnout změnou fyzikálních a chemických parametrů prostředí (oslabení - větší viskozita, přítomnost organických látek,...; zesílení – změna pH, zvýšením teploty, ...)



## Mechanismus účinku vnějších faktorů

- Poškození buněčné stěny
- Narušení funkce cytoplazmatické membrány
- Změna struktury a funkce základní cytoplazmy
- Zastavení procesů biosyntézy
- Zastavení procesů tvorby energie
- Inhibice enzymatické aktivity

## Faktory vnějšího prostředí

- **Fyzikální faktory**
  - \*Sucho
  - \*Teplota
  - \*Osmotický tlak
  - \*Hydrostatický tlak
  - \*Ultrazvuk
  - \*Záření
- **Chemické faktory**
  - \*pH
  - \*Oxidoredukční potenciál
  - \*Povrchově aktivní látky
  - \*Dezinfekční látky
  - \*Těžké kovy
  - \*Chemoterapeutika
  - \*Antibiotika

## Fyzikální faktory - **sucho**

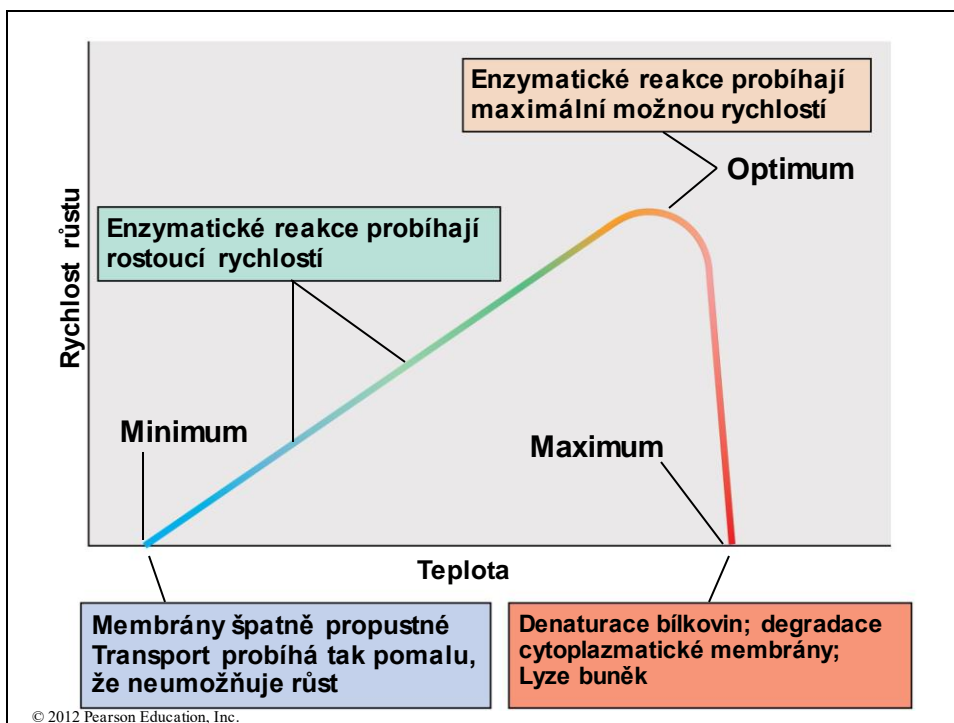
- Většina mikroorganismů vyžaduje **volně přístupnou vodu**
- Některé aktinomykety mohou využívat i vodu hygrokopickou (xerofilní organizmy)
- Při nedostatku vody dochází k dehydrataci buněk, snižuje se metabolická aktivita a mění se velikost protoplastu - **plazmolýza**. Při dlouhodobém nedostatku – odumření buňky
- Velmi citlivé jsou k nedostatku vody G<sup>-</sup> koky, zejména gonokoky a meningokoky (odumírají po několika hodinách)
- Odolné jsou mykobakterie (*M. tuberculosis* v suchém sputu přežívá i několik týdnů), klidové formy a spory bakterií
- **Lyofilizace** – odejmutí vody při velmi nízké teplotě ve vakuu. Možnost revitalizace. “Konzervace” mikroorganismů.

## Fyzikální faktory - **teplota**

- Vliv teploty na růst
- Mikrobiální život při nízkých teplotách
- Mikrobiální život při vysokých teplotách

## Vliv teploty na růst

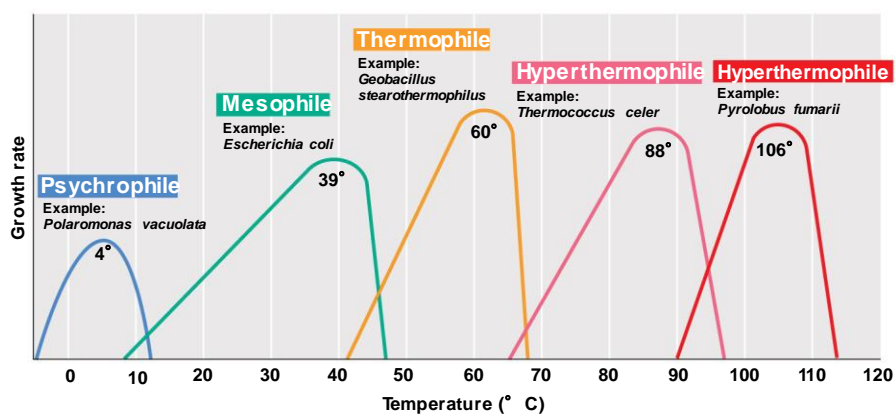
- Teplota je hlavní faktor vnějšího prostředí, který ovlivňuje mikrobiální růst
- Určujeme teplotní rozsah růstu:  
teplotní minimum, optimum a maximum, ve kterém je organismus schopen růst
- **Minimum** – nejnižší teplota, při níž je možné zaznamenat množení
- **Optimum** – rozmnožování nejvyšší rychlostí
- **Maximum** – nejvyšší teplota, při níž se ještě rozmnožují



## Fyzikální faktory - **teplota**

- **Psychofilní** – rostou při teplotách pod +20°C (0 – 5). Výskyt – oceány, hluboká jezera, studené prameny. Některé organizmy mohou růst i při -10°C. V laboratorních podmínkách se snadno přizpůsobí vyšším teplotám
- **Mezofilní** – růst při +20 – 40 °C. Většina organismů saprofytických i parazitických
- **Termofilní** – teplota růstu +45 – 90 °C ,v chlévské mrvě, kompostu. Termofilní *Euryarcheota* mají maximální teplotu pro růst vyšší než 113°C (*Pyrobolus*)
- **Extrémně termofilní** rostou v horkých hlubinných mořských pramenech i při teplotě +350 °C
- Teplotní šok
- Chladový šok (při teplotách -15 až -20°C **přežívají** bakterie více než rok)
- **Extrémofilové** – rostou v extrémních podmínkách

## Teplotní třídy mikroorganismů



## Mikrobiální obyvatelé Antarktidy



John Gosink and James T. Staley

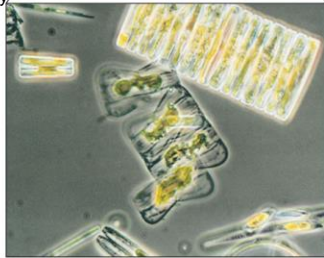
(a)



James T. Staley

(c)

Fototrofní mikroorganizmy



John Gosink and James T. Staley

(b)



Deborah Jung and Michael T. Madigan

Lake Bonney

© 2012 Pearson Education, Inc.

## Růst hypertermofilů ve vřídlech



T. D. Brock

(a)

Přítomni jsou zástupci bakterií i archeí, chemoorganotrofní i chemolitotrofní



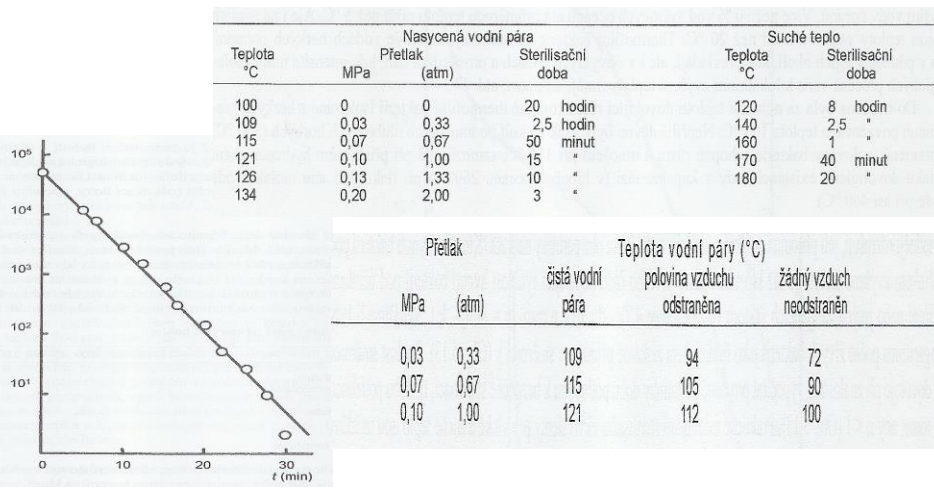
T. D. Brock

(b)

© 2012 Pearson Education, Inc.

## Fyzikální faktory – sterilizace teplem

Mechanismus spočívá v denaturaci bílkovin a s ní spojenou inaktivací jednoho nebo více enzymů



## Fyzikální faktory – pasterace

- Jednorázové zahřátí na teplotu pod 100 °C – odstraňovány jsou pouze vegetativní formy mikroorganismů
- Pasterují se hlavně potraviny, které by při zvýšené teplotě ztratily nutriční hodnotu nebo by se poškodila chuť (mléko, pivo, víno, ...)
- Proces pasterace je založen na vztahu mezi teplotou a časem.

Je možné provádět:

- \* ošetření vysokou teplotou po krátkou dobu (HTST: High Temperature – Short Time)
  - k usmrcení patogenních bakterií se používá vyšší teplota po krátkou dobu, např. mléko je pasterováno při teplotě 72 °C za 15 sekund;
- \* ošetření nízkou teplotou po dlouhou dobu (LTLT: Low Temperature – Long Time)
  - k usmrcení patogenních bakterií se aplikuje nižší teplota po delší čas, např. mléko je pasterováno při teplotě 63 °C po 30 minutách.

\* **Blesková pasterace**

- Jde o aplikaci vysoké teploty po krátkou dobu. Používá se k ošetření např. šťáv. Po dobu 3 až 15 sekund se aplikuje teplota, při které se ničí nebezpečné mikroorganismy. Výrobek se po ohřevu chladí a balí. Používá se pro nápoje v krabičkách a sáčcích. Umožňuje jejich delší skladování bez chlazení.

\* **Pasterace parou**

- Používá se ke snížení škodlivých mikroorganismů u hovězího masa. Tlaková pára se po dobu 6 až 8 sekund aplikuje na jatečně opracované hovězí kusy, které již prošly veterinární kontrolou na jatkách. Pára zvyšuje teplotu na povrchu kusů (88 ° až 93 °C). Následně se kusy chladí studenou vodou. Uvedený proces snižuje patogenní mikroorganismy jako *E. coli* O157:H7, *Salmonella* a *Listeria* bez použití jakýchkoliv konzervačních prostředků.

\* **Pasterace ozářením**

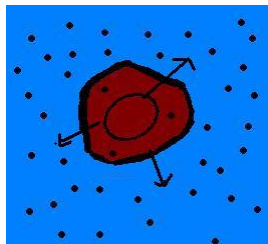
- Potraviny jako drůbež, červené maso, koření, ovoce a zelenina se vystavují účinkům gama-zářením. Uvedený proces účinně reguluje vegetativní bakterie a parazity potravin a prodlužuje dobu uchování potravin.

\* **UHT (Ultra High Temperature) pasterace**

- Typicky jde o ohřev mléka a smetany na 135 ° až 150 °C po dobu 1 nebo 2 sekund. Mléko se pak plní do sterilních hermeticky uzavřených obalů a lze skladovat bez chlazení až po dobu 90 dnů.

## Fyzikální faktory – osmotický tlak

- Tlak mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky dosahuje 0,1 až 0,6 MPa. Tento tlak (**turgor**) je fyziologický a je kompenzován buněčnou stěnou.
- V **hypertonickém** prostředí je znemožněn příjem vody – **fyziologické sucho** kolem buňky. Po delší době působení buňky (zmenšení objemu protoplastu) podléhají **plazmolýze** – odumření buňky



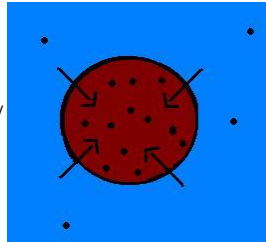
<http://www.wikiskripta.eu/>

Využití při konzervování potravin 10 - 15 % solí, 5 – 70 % cukrů

## Fyzikální faktory – osmotický tlak

- **Hypotonické prostředí** zvětšuje množství vody v buňce → zvýšení turgoru → ruptura buňky (**plazmoptýza**)

<http://www.wikiskripta.eu/>



- **Halotolerantní** nebo **halofilní** organizmy – změna osmolarity vnitřního prostředí tak, aby zůstal tlak zachován (většinou produkce některých látek – glycerol, ..)

## Osmotické vlivy na mikrobiální růst

- **Vodní aktivita ( $a_w$ ):** dostupnost vody

Obsah volné vody, jenž není vázaná například v hydratačních obalech iontů a mikroorganismy tuto vodu mohou využívat.

Vodní aktivita - hodnoty 0 až 1

Je nepřímo úměrná osmotickému tlaku - čím vyšší je osmotický tlak, tím nižší je vodní aktivita.

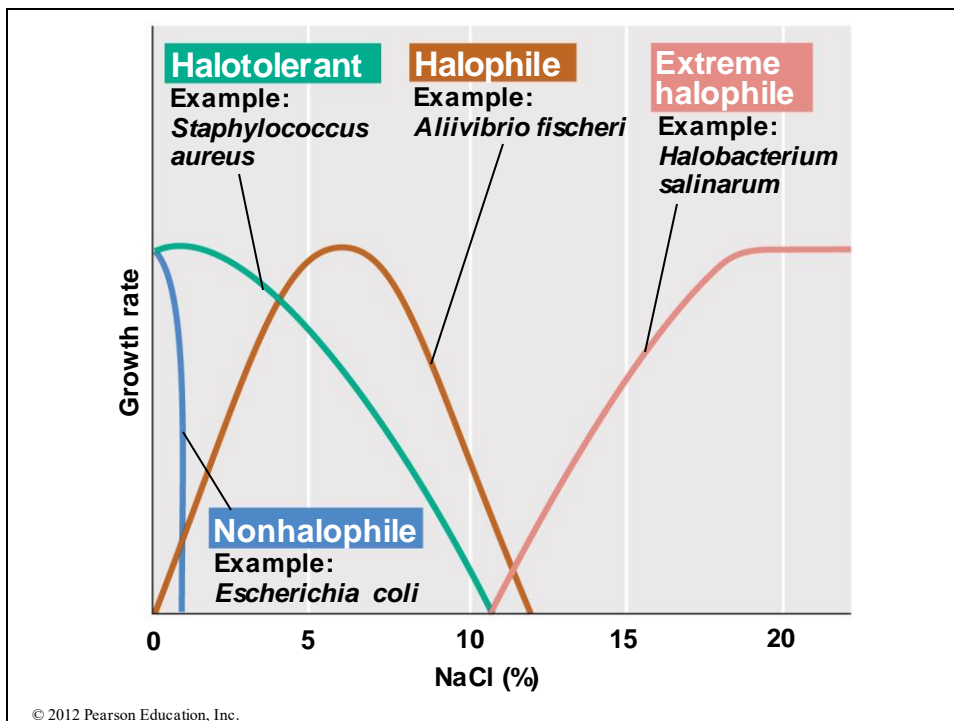
Látky s nízkou vodní aktivitou jsou nevhodné pro růst mikroorganismů.

- *Např. cytoplazma má vyšší koncentraci rozpuštěných látek než okolní prostředí, což způsobuje tendenci vody pohybovat se směrem do buňky (positive water balance)*
- *Pokud je buňka v prostředí s vyšší koncentrací rozpuštěných látek, voda naopak buňku opouští*



## Osmotické vlivy na mikrobiální růst

- *Halofilové*: organismy, které rostou nejlépe při nízkých hodnotách vodního potenciálu; mají specifické požadavky na NaCl
- *Extrémní halofilové*: organismy, které vyžadují pro růst vysoké koncentrace (15 – 30 %) NaCl
- *Halotolerantní mikroorganismy*: organismy, které mohou tolerovat určité snížení vodní aktivity prostředí, ale nejlépe rostou bez přidaného roztoku NaCl



## Osmotické vlivy na mikrobiální růst

**Osmofilové:** organizmy, které žijí v prostředí s vysokou koncentrací rozpuštěného cukru

**Xerofilové:** organizmy schopné růstu ve velice suchém prostředí

Nízká vodní kapacita v prostředí způsobí zvýšenou koncentraci roztoku uvnitř buněk mechanismem:

- pumpování iontů z vnějšího prostředí do buňky
- syntézy organických roztoků uvnitř buňky

**Osmotické roztoky:**

**Izotonické** – koncentrace roztoku stejná jako v buňce

**Hypotonické** – konc. roztoku nižší než v buňce

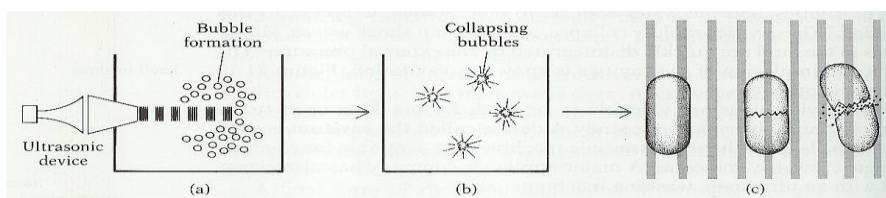
**Hypertonické** – konc. roztoku vyšší než v buňce

## Fyzikální faktory – hydrostatický tlak

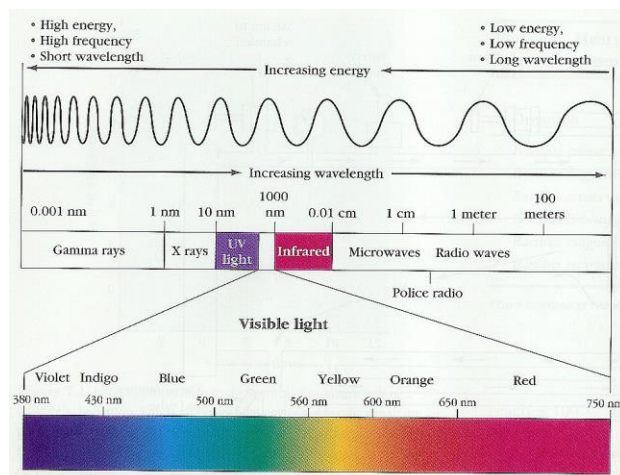
- Většina mikroorganismů - žije za normálního atmosférického tlaku
- do 10 MPa (100 atm) neovlivňuje tlak životní projevy
- Tlaky 10 – 50 MPa zastavují růst i množení
- **Barotolerantní** bakterie – v oceánech do hloubky 4000 m
- **Barofilní** bakterie – hloubky větší než 5000 m (rostou ale i za normálního tlaku !)
- **Obligatočně barofilní** – hloubky větší než 10000 m (doba zdvojení delší než 1 den)

## Fyzikální faktory – ultrazvuk

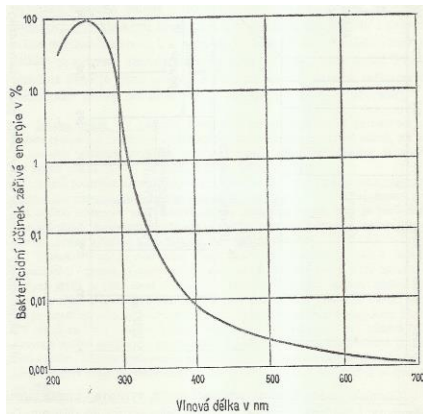
- Zvukové vlny o frekvenci vyšší než 20 kHz s intenzitou kolem 10 W/cm<sup>2</sup>
- **Kavitační ultrazvuk** – uvolňování plynů rozpuštěných v kapalině (prostředí, základní cytoplazma)
- Mechanismus účinku – přímo mechanicky nebo změnou tlaku vyvolaným uvolněným plynem. V některých případech i inhibiční efekt látek vznikajících po účinku ultrazvuku z média (z chloridů – volný chlór)
- Největší účinek na vláknité organizmy a G<sup>+</sup> tyčky. Nejmenší na kvasinky a G<sup>+</sup> koky
- Letální účinek je tlumen zvýšenou viskozitou prostředí, přítomností bílkovin nebo látek zvyšujících povrchové napětí
- **Letální účinek ultrazvuku nikdy není 100%!**



## Fyzikální faktory – záření

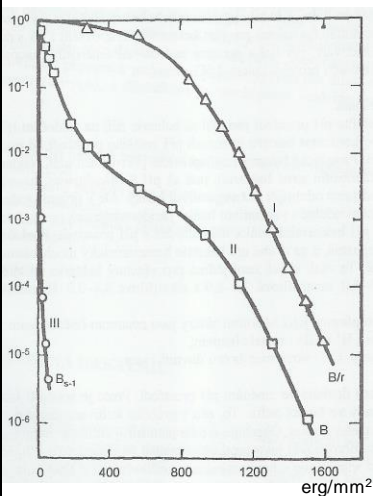


## Fyzikální faktory – záření



- Na mikroorganismus působí škodlivě každé záření, které je buňkou adsorbováno a vyvolává v ní chemické změny
- Míra účinku je závislá na množství získané energie – **kvantu**
- Energie ve světelném kvantu nepřímo závisí na vlnové délce
- Chemické změny molekul nebo atomů, vyvolávají kvanta o vlnové délce asi do 1000 nm

## Fyzikální faktory – ultrafialové záření

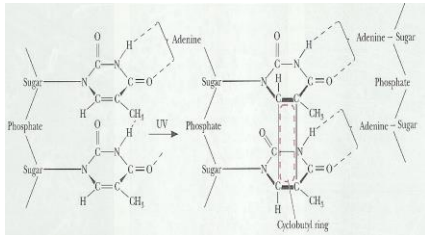


*E.coli* kmen I, II, III

n-počet buněk, t-čas

- Silné mutagenní a letální účinky
- Nejčastěji se využívá v oblasti s vlnovou délkou kolem 265 nm
- Vlnové délky germicidních lamp – 210 - 310 nm
- Intenzita účinku je závislá na množství pohlceného záření a klesá se čtvercem vzdálenosti od zdroje
- Pronikavost UV je velmi malá – využití pro sterilizaci předmětů, pracovních ploch, zařízení, ...
- **Citlivost mikroorganismů k UV je velmi odlišná (i v rámci jednoho druhu!!)**
- Vegetativní buňky jsou citlivé, klidové formy odolné. Odolnost se také zvyšuje s obsahem karotenoidních pigmentů.

## Fyzikální faktory – **ultrafialové záření**



- UV je adsorbováno nukleovými kyselinami a nukleoproteiny
- Nejvíce - tyminem a cytozinem – ionizace a excitace atomů
- Důsledek – tvorba dimerů pyrimidinů, vznik kovalentních vazeb uvnitř molekuly, přetržení řetězce, ...
- Zvláště negativně působí UV o vlnové délce menší než 210 nm. Účinky záření v rozmezí 210-300 nm jsou opravitelné
- **Fotoreaktivace** (fotoreparace) – oprava účinků UV vlivem viditelného světla – indukce enzymů štěpících pyrimidinové dimery

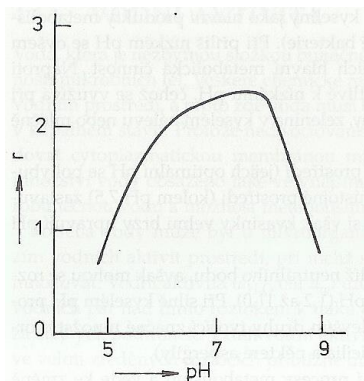
## Fyzikální faktory – X a $\gamma$ **paprsky**

- Značná penetrační schopnost
- Působí na všechny buňky (včetně vyšších organismů)
- Mechanismus – ionizace molekul intracelulární vody za tvorby volných hydroxylových radikálů, vznik oxiranů, přímý účinek na DNA (indukce zlomů chromozomů)
- Velmi citlivé jsou  $G^-$  bakterie, méně  $G^+$ , kvasinky a vláknité mikromycety
- Účinnost se výrazně zvyšuje přítomností  $O_2$ , látky silně redukující (askorbová kyselina, sulfhydrylové skupiny) působí protektivně
- K dosažení letální dávky pro mikroorganismy je potřebí  $10^4$  krát větší dávky než pro člověka
- Využití při sterilizaci některých potravin, léků, obvazového materiálu, ... (Účinkem se mohou měnit některé fyzikální a chemické vlastnosti)

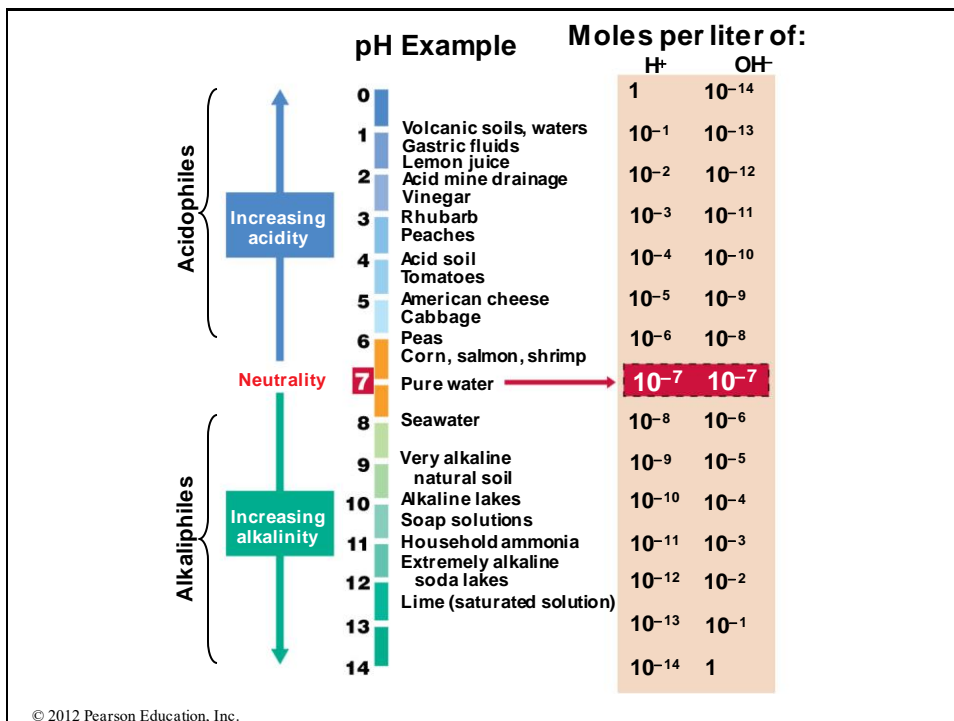
## Chemické faktory a jejich vliv na růst mikroorganismů

1. pH
2. Oxidoredukční potenciál
3. Povrchově aktivní látky
4. Dezinfekční látky
5. Těžké kovy
6. Chemoterapeutika
7. Antibiotika

## 1. Chemické faktory - pH



- Každý organismus má jiné pH pro **optimální růst**
- Každý druh může růst jen v určitém rozmezí pH
- Pro většinu bakterií a kvasinek je rozpětí úzké, pro mikromycety široké
- Většina bakterií roste v rozmezí pH 6 - 7, kvasinky 4,2 - 5,5
- Krátkodobé změny pH prostředí jsou kompenzovány aktivním transportem
- Buňka udržuje intracelulární pH ve velmi úzkém rozmezí



## 1. pH – acidita a alkalita prostředí

- Vnitřní hodnota pH buňky musí být téměř neutrální (i když je vnější prostředí vysoce kyselé nebo zásadité!)
- Extrémy představují extrémní acidofilové s vnitřním pH 4,6 a extrémní alkalofilové s vnitřním pH 9,5
- Mikrobiální kulturační média většinou obsahují pufrы pro zajištění konstantní hodnoty pH

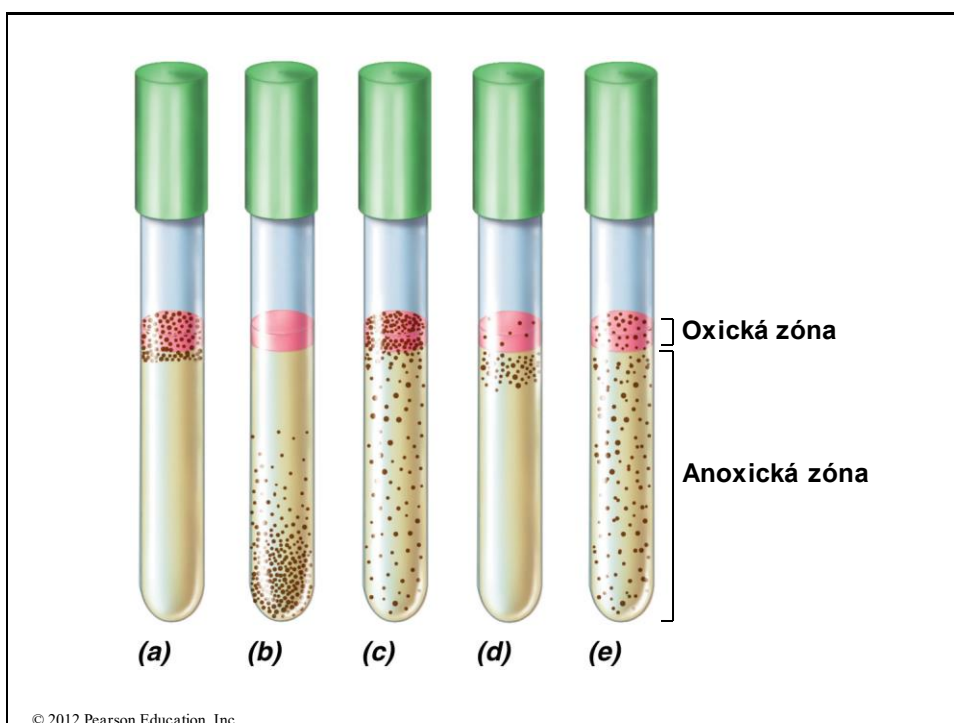
## 2. $E_h$ – oxidoredukční potenciál

- Každé prostředí zahrnuje určitý oxidačně redukční (oxidoredukční, redoxní) potenciál – je dán přítomností oxidujících a redukujících látek
- **Oxidační látky** –  $O_2$ , dusičnany,  $Fe^{3+}$ , peroxidy, ...
- **Redukující látky** –  $Fe^{2+}$ ,  $H_2$ , sloučeniny se sulfhydrylovou skupinou nebo reaktivními dvojnými vazbami, ...
- Oxidačně redukční potenciál je ( $E_h$ ) – rozdíl potenciálu mezi platinovou a vodíkovou elektrodou
- Pro aerobní mikroorganismy je vhodné  $E_h$  v rozmezí **0,2 - 0,4 V** (pH 7,0)
- Pro anaerobní méně než **-0,2 V**
- Snížení hodnot  $E_h$  se dosáhne přidáním kyseliny askorbové, cysteinu, kyseliny thioglykolové (v "upraveném" prostředí potom mohou růst i anaerobní organismy – *Clostridium*, *Streptococcus*, ... - v přítomnosti kyslíku)
- Redoxní potenciál kultivačního prostředí se mění v průběhu kultivace (změna pH a produkty metabolismu, které mají povahu redoxních systémů –  $H_2O_2$ ,  $H_2$ ,...)

## Vztah mikroorganismů ke kyslíku

- **Aerobové**: k životu vyžadují kyslík
- **Anaerobové**: nevyžadují kyslík a mohou být v kyslíkatém prostředí usmrceny
- **Fakultativní organizmy**: mohou žít v přítomnosti kyslíku i bez něj
- **Aerotolerantní anaerobové**: mohou tolerovat kyslík a růst v jeho přítomnosti, ačkoliv kyslík nevyužívají
- **Mikroaerofilové**: využívají kyslík, jen pokud je přítomen v nižší koncentraci než ve vzduchu





## Vztah mikroorganismů ke kyslíku

Pro kultivaci aerobních a anaerobních mikroorganismů existují speciální techniky



(a)

Deborah O. Jung and M. T. Madigan



(b)

Coy Laboratory Products

### 3. Chemické faktory - povrchově aktivní látky

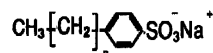
- Sloučeniny s molekulou tvořenou hydrofilní a hydrofobní částí
- Přidáním do média se snižuje jeho povrchové napětí – tenzidy (smáčedla)
- **Anionaktivní tenzidy** (aniontová smáčedla) – mýdla
- **Kationaktivní tenzidy** (kationtová detergencia) – invertní mýdla s dezinfekčními účinky
- **Neionogenní tenzidy** (neionizovaná detergencia)

Biosurfaktanty – skupina neionogenních tenzidů produkovaných mikroorganismy

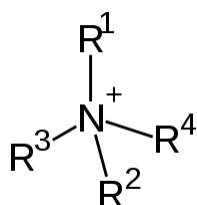
Stabilizují emulze, zvyšují rozpustnost hydrofobních organických látek, využití v bioremediacích, při tvorbě biofilmu, antibakteriální účinky atd.

### 3. Chemické faktory - povrchově aktivní látky

- Funkční skupiny : -COOH, -SO<sub>3</sub>H, -OSO<sub>3</sub>H, -OPO(OH)<sub>2</sub>
- \* monofunkční **R-COOMe** (alkalická mýdla vyšších mastných kyselin)
- \* bifunkční – 2 polární skupiny (obě nebo jedna disociována)  
**R-xR1-COOMe** (R – hydrofobní radikál, R1 – alkylenový můstek, x - nedisociovaná polární skupina [-SO<sub>2</sub>NH-, -O-, -SO<sub>2</sub>- ])
- Ve vyšších koncentracích poškozují cytoplazmatickou membránu, způsobují denaturaci bílkovin
- Při nižších koncentracích pronikají do buňky a ovlivňují metabolismus
- Alkylsulfáty a alkylsulfonáty jsou intezivní smáčedla a ovlivňují účinnost dezinfekčních prostředků – použití v potravinářském průmyslu, dezinfekční mýdla, ..

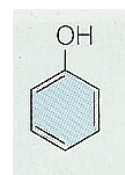


### 3. Chemické faktory - povrchově aktivní látky



- Dusíkaté organické sloučeniny zejména kvarterní amoniové (nebo pyridiniové) soli
- Bezdušíkaté organické sloučeniny obsahují S, J, P
- Kvarterní amoniové soli působí baktericidně (především na  $\text{G}^+$ , méně na  $\text{G}^-$ ), fungicidně, amoebicidně, virucidně
- Nepůsobí na mykobakterie a bakteriální endospory
- Smáčecí schopnost je malá

### 4. Dezinfekční látky - fenol



- Účinek – snížení povrchového napětí prostředí s následným porušením buněčné stěny
- Při koncentraci vyšší než 1% má výrazný antimikrobiální účinek
- Používá se pro dezinfekci kontaminovaných nástrojů, sputa, moči, .....
- **Fenolový koeficient** – pro srovnání účinnosti dezinfekčních přípravků (poměr mezi letální koncentrací srovnávaného preparátu a fenolu při nejvyšším ředění po 10 minutách působení)

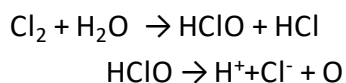
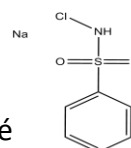
## 4. Dezinfekční látky - alkoholy

- Mechanismus účinku – denaturace bílkovin, narušení membrán, rozpouštění lipidů a lipidických frakcí
- Působí na bakterie, houby, obalené viry
- Nepůsobí na klidová stádia
- Účinnost alkoholů stoupá s jejich molekulovou hmotností
- **Nejčastěji používané:**  
etanol, isopropanol

| Concentration of Ethanol (%) | Time (sec) |    |    |    |    |
|------------------------------|------------|----|----|----|----|
|                              | 10         | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 100                          | -          | -  | -  | -  | -  |
| 95                           | +          | +  | +  | +  | +  |
| 90                           | +          | +  | +  | +  | +  |
| 80                           | +          | +  | +  | +  | +  |
| 70                           | +          | +  | +  | +  | +  |
| 60                           | +          | +  | +  | +  | +  |
| 50                           | -          | -  | +  | +  | +  |
| 40                           | -          | -  | -  | -  | -  |

## 4. Dezinfekční látky - halogeny - Cl

- Chlór jako plyn se používá v technologii čištění vody
- Chlornany a chloraminy (Chloramin B, R, Chlorseptol)
- Mechanismus účinku je v tvorbě kyseliny chlorovodíkové (chlorné) s následným rozkladem na kyslík ve stavu zrodu



- Působí na vegetativní i klidová stádia



## 4. Dezinfekční látky - halogeny - I

- Jód vykazuje silné antimikrobiální účinky především na vegetativní stádia
- Mechanismus účinku – vazba na bílkoviny a inhibice enzymatické aktivity
- V praxi se nejčastěji používá alkoholický roztok jódu k dezinfekci pokožky



## 5. Těžké kovy



- Některé kovy vykazují silný antimikrobiální efekt – stříbro, měď, rtuť
- Antimikrobiální aktivita kovů se označuje jako **oligodynamický účinek**
- Kovy působí v relativně nízkých koncentracích
- Mechanismus účinku – vazba na sulfhydrylové skupiny a denaturace bílkovin
- Toxicita stoupá od lehčích k těžším a od jednomocných k dvojmocným

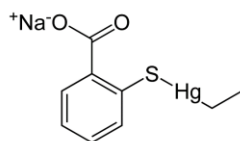
## 5. Těžké kovy

- **Ag** a aplikace jako  $\text{AgNO}_3$  ve formě organických nebo anorganických solí
- 1884 – prevence oftalmie u novorozenců ( $\text{AgNO}_3$ )
- Stříbrné ionty jsou velmi reaktivní s bílými kovy a chloridy – to omezuje jejich použití pro použití jako povrchového antiseptika
- Nyní se používají koloidně rozpustné sloučeniny stříbra ( $\text{Argentum colloidalis}$  – 60 - 70% Ag a 5 - 10% protei nátu stříbra)
- Dezinfekce vody (Sagen)
- Používá se i v případech rezistence k antibiotikům



- **Cu** – protihnilobný účinek mědi byl znám již starým Peršanům (uchovávání pitné vody v měděných nádobách)
- Sloučeniny mědi mají bakteriostatický, baktericidní a silný fungicidní účinek
- Aplikace jako anorganické a nebo organické sloučeniny
- Pro konzervaci textilií a celulózových vláken – měďnaté soli kyseliny stearové nebo naftenové, bis(8-hydroxychinolínato)měďnatý komplex
- Ochrana rostlin – chlorid trihydroxydi měďnatý (Kuprikol)
- Při dermatomykózách – měďnaté soli organických kyselin (undecylenová k.)

## 5. Těžké kovy



Thiomersal

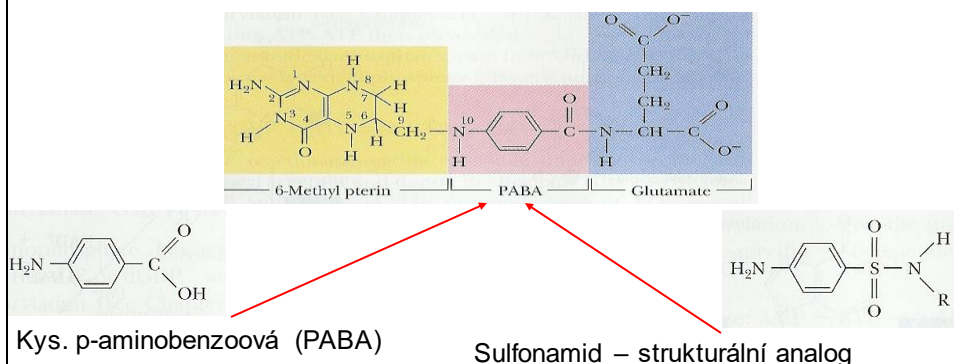
- **Hg** - příprava rtuti pro léčebné účely – asi 300 př.n.l.
- Antiseptika ve vodě nerozpustná –  $\text{HgO}$  (Ungentum luteoli), sulfid rtuťnatý, ..
- $\text{HgCl}_2$  a  $\text{Hg}_2\text{O}(\text{CN})_2$  jsou silně toxické – použití pro dezinfekci – korozivní účinky
- Organokovové sloučeniny rtuti
- Použití ve formě sublimátu  $\text{HgCl}_2$ , ten je na vegetativní formy bakterií účinný už při ředění 1:1000

## 6. Chemoterapeutika

- Mají selektivní antibakteriální účinek
- Inhibují pochody vedoucí k syntéze koenzymů, bílkovin a nukleových kyselin
- Jsou **strukturálními analogy** esenciálních látek, ale mají větší afinitu k enzymům
- **Jejich inhibiční efekt je možné odstranit nadbytkem esenciální látky**

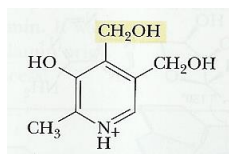
## 6. Chemoterapeutika - sulfonamidy

- Sulfonamidy mají vysokou selektivitu
- Bakteriostatický efekt je způsoben kompetitivní inhibicí syntézy kyseliny tetrahydrolistové

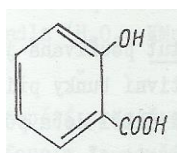


## 6. Chemoterapeutika

- Esenciální látka

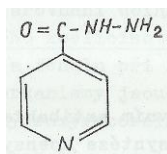


pyridoxin

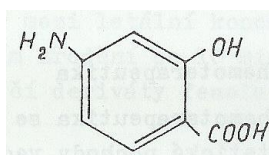


kys. salicylová

- Strukturální analog



isonicotinylhydrazid



kys. p-aminosalicylová

## 7. Antibiotika

- Antibiotika jsou organické látky produkované živou buňkou, které v malých koncentracích potlačují životní procesy bakterií
- Jsou produkty sekundárního metabolismu
- Vyznačují se selektivní toxicitou – působí pouze na některé buňky - **spektrum účinnosti antibiotika**
- Antibiotika mají vliv mikrobistatický i mikrobicidní
- Jeden organismus může produkovat několik antibiotik (*Bacillus subtilis* – 42)
- Jedno antibiotikum může být produkováno několika organismy (peniciliny – *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Streptomyces*,.....)



## 7. Antibiotika

Rozdělení antibiotik podle mechanismu účinku

- **Inhibice syntézy buněčné stěny** (peniciliny, cefalosporiny, cykloserin, bacitracin, vankomycin, ...)
- **Inhibice funkce cytoplazmatické membrány** (gramicidin A, valinomycin, polymyxiny, ....)
- **Inhibice proteosyntézy** (chloramfenikol, erytromycin, linkomycin, tetracykliny, streptomycin,...)
- **Inhibice syntézy a funkce nukleových kyselin** (rifampicin, kys. nalidixová, oxolinová, novobiocin, ...)