

Biotechnologie – mikrobiální metabolismum

Josef Trögl



Energetika mikroorganismů

- Organismy potřebují energii
 - zachování organizované struktury
 - rozmnožování
 - pohyb
 - obrana
 - ...
- **Hlavní zdroj energie je vždy mimo organismus**

Získávání energie

1. **Dýchání (respirace)** – oxidace jedné látky jinou látkou za uvolnění energie
2. **Kvašení (fermentace)** – rozklad jedné látky na energeticky chudší látky
3. **Fototrofie** – využití světelné energie
 - **Fotosyntéza** = využití světla k syntéze organických látek

Dýchání (respirace)

Substrát + oxidovadlo → odpad + energie

- Organické látky (sacharidy, tuky, bílkoviny, uhlovodíky ...)
- Anorganické látky (Fe^{2+} , H_2S , NH_4^+ , NO_2^- , H_2 atd.)
- Kyslík O_2 (aerobní respirace)
- SO_4^{2-} , NO_3^- , CO_2 , halogenované etheny... (anaerobní respirace)
- aerobní odpad $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
- anaerobní odpad $\text{CO}_2 + \text{CH}_4, \text{N}_2, \text{H}_2\text{S} \dots$

Kvašení (fermentace)

Substrát → odpad + energie

- **Sacharidy**
- Aminokyseliny
- Puriny
- Organické kyseliny
- ...
- Odpad CO₂, ethanol, k. mléčná, k. propionová, aceton, butanol ...

Starší termíny

- Chemotrofní – získání energie chemickou reakcí
- Organotrofní – získání energie z organických látek
- Lithotrofní - získání energie z anorganických látek
- Fototrofní – získání energie ze světla

- překrývající se termíny

Zdroje uhlíku

- **Autotrofní organismy** – uhlík z jednoduchých látek (CO_2)
- **Heterotrofní organismy** – uhlík ze složitějších organických látek

Zdroje dusíku

- **Organický dusík** – většina organismů
- **Amonné ionty** – většina MO, rostliny
- **Dusičnany, dusitany** – některé MO, rostliny
- **Plynný dusík** – hlízkovité bakterie, sinice

Další látky

- Vitamíny
- Aminokyseliny
- Mastné kyseliny
- ...

Auxotrofie

(neschopnost syntézy některé
složitější látky)

- **Aerobní** – vyžadují kyslík
- **Anaerobní** – nevyžadují kyslík
- **Mikroaerofilní** – potřebují jen málo kyslíku (urychluje růst)
- **Aerotolerantní** – nepotřebují kyslík, ale nevadí jim

- **Obligátní** = povinné, nemohou žít v jiném prostředí
- **Fakultativní** = volitelné, mohou žít i v jiných prostředích

- Obligátní aerobové
 - nemohou žít bez kyslíku, hynou
 - např. plísně *Penicillium*
- Obligátní anaerobové
 - kyslík je zabijí
 - např. bakterie *Clostridium*

Fakultativní

- Umí přepínat metabolismus mezi aerobním a anaerobním
 - respirace ↔ kvašení
 - přepínání mezi aerobní a anaerobní respirací (místo kyslíku např. dusičnany)
- Aerobní respirace je **nejúčinnější** pro získávání energie
→ **v přítomnosti kyslíku většina MO přepíná na respiraci**

Sekundární metabolismus

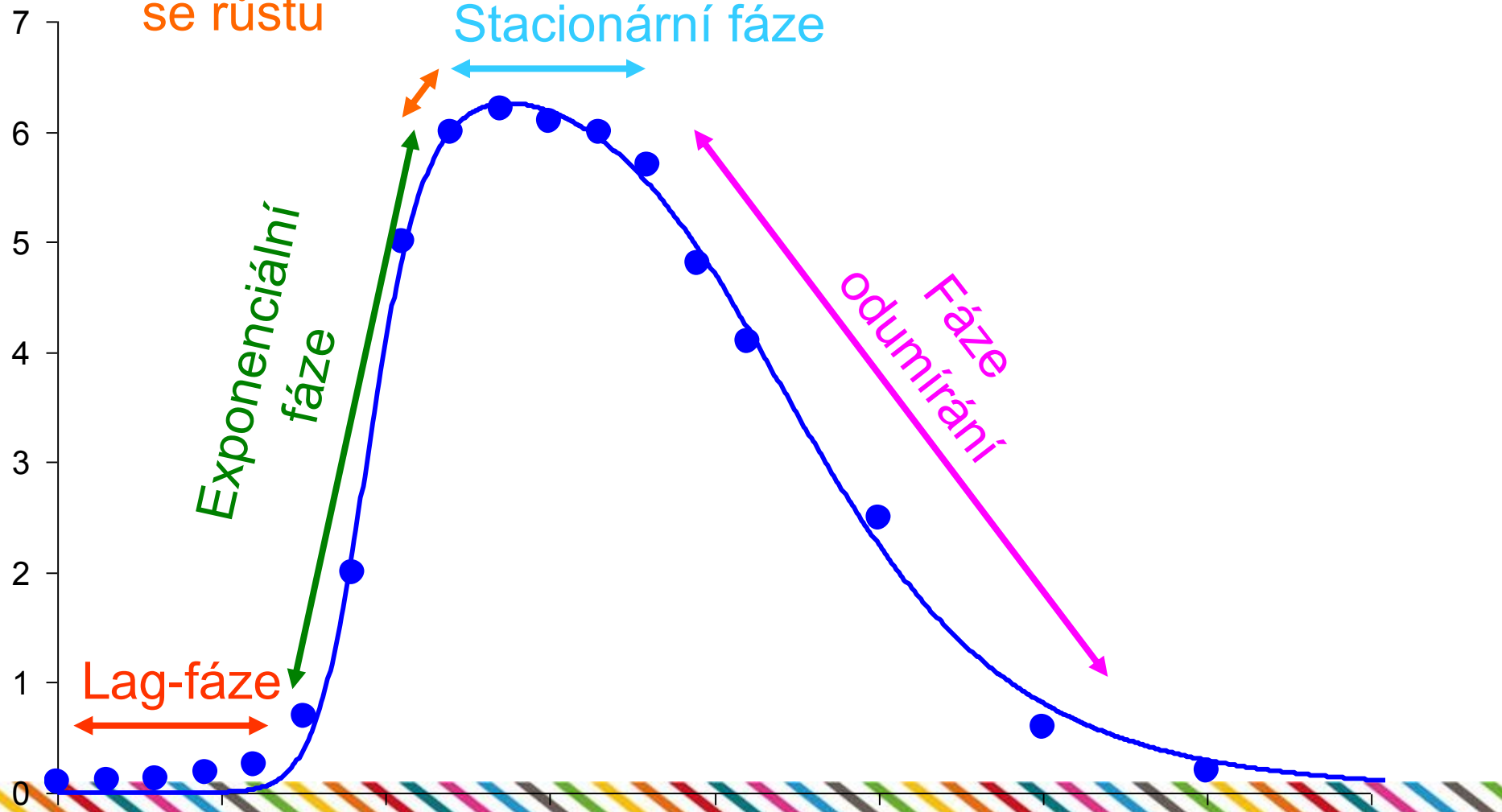
- Historické vymezení metabolických drah na **primární** a **sekundární**
 - přesně nevymezené, tradiční chápání
- **Primární** – základní katabolické a anabolické dráhy, energetický metabolismus, genetické pochody...
- **Sekundární** – méně významné („postradatelné“) metabolické dráhy
 - speciální dráhy jen některých organismů
 - doplňkové dráhy jen při výjimečných příležitostech (zhoršené podmínky, neobvyklá výživa, obranné látky...)
 - dráhy pro „zbytné“ metabolity (barviva, vůně...)
 - zásobní látky při nevyváženém růstu

Sekundární metabolismus

- Řada sekundárních metabolitů má praktický význam – biotechnologická produkce
 - antibiotika a jiná léčiva
 - barviva
 - komunikační molekuly (hormóny, homoserinlaktony...)
 - zásobní látky
 - ...
- U mikroorganismů často produkce jen ve stacionární fázi
 - zhoršují se podmínky – zostřený konkurenční boj
 - zvýšení šancí na přežití v určitých podmínkách
 - produkt nevyváženého růstu (nedostatek některé živiny)

Růstová křivka

Fáze zpomalujícího se růstu



Sekundární metabolity MO

- Komunikační molekuly
 - homoserinlaktony – quorum sensing – u mnoha rodů bakterií
 - koordince sporulace u streptomycet
 - u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pohlavní diferenciacce
- Obranné funkce
 - toxiny včetně neurotoxinů (patogení MO)
 - mykotoxiny plísní (aflatoxin...)
 - fytopatogenní látky, rostlinné hormóny

Syntéza sekundárních metabolitů

- „Typický“ anabolismus – divergentní dráhy
- vychází z centrálních meziproductů metabolismu – zde se prolíná s primárním metabolismem
 - meziproducty citrátového cyklu
 - acetylkoenzym A
 - pyruvát
 - aminokyseliny
 - purinové a pyrimidinové báze
 - karboxylové kyseliny s krátkým řetězcem (octová, propionová, máselná...)
 - jednouhlíkaté látky
 - ...

Antibiotika

- Známá už ve starověku – starověcí Číňané léčili infekce obklady z plesnivého mléka
- 1929 – Alexandr Fleming objevil penicilin
- 1945 – S. Waksman - látky produkované mikroorganismy, které zasahují do růstu a množení jiných organismů

Antibiotika

- Skupina látek s odlišnou chemickou strukturou a negativním působením na mikroorganismy
- Obvykle nízkomolekulární látky
- **Historické dělení**
 - antibiotika (biologického původu)
 - chemoterapeutika (uměle syntetizované)
- Dnes rozdíl setřen
- **Moderní chápání je odlišné**
- Skupina látek působících negativně na MO zejména bakterie buď jejich usmrcením nebo inhibicí rozmnožování. Účinek na vyšší organismy je slabší.

Antibiotika

- Producenti antibiotik
 - bakterie
 - houby
 - rostliny (řasy, vyšší rostliny)
 - lišejníky
 - prvoci
 - hmyz
 - živočichové (měkýši, červi, tkáně obratlovců...)

Antibiotika

- β -laktamová (penicilin, cefalosporin)
- tetracyklická (tetracyklin)
- makrolidová
- aminoglykosidová (streptomycin)
- nukleosidová
- steroidní
- polyketidová (kondenzací acetyl-S-CoA)
- laktonová
- polyenová (nystatin)
- naftalenová
- peptidová (cyklické oligopeptidy)
- odvozená z aminokyselin (chloramfenikol)

...

- **Inhibice syntézy buněčné stěny**
 - beta-laktamy, bacitracin, penicilin...
- **Narušení cytoplazmatické membrány**
 - polyeny, polymyxiny...
- **Inhibice syntézy DNA a RNA**
 - aminoglykosidy, chinolony
- **Inhibice proteosyntézy**
 - tetracykliny, amfenikoly
- **Inhibice syntézy kyseliny listové**
 - sulfonamidy
- ...

- s užším spektrem (penicilin proti G+ bakteriím)
- širokospektrální (tetracyklin - G+, G-, prvoci)
- s antifungálním účinkem (nistatin)
- se specifickými účinky (např. streptomycin - TBC)

Původ antibiotik

- **Biologického původu**
 - produkované jinými bakteriemi – např. streptomycin (*Streptomyces*)
 - produkované houbami – např. penicilin (*Penicillium*)
- **Chemického původu**
 - zcela umělá
 - modifikace přírodních

Rezistence k antibiotikům

- Velký problém současné medicíny
- Bakterie prochází rychlou evolucí, kterou člověk urychluje nadbytečným používáním antibiotik
- Vznik **rezistentních mikroorganismů**
 - v rychle rostoucí mikrobiální populaci se prakticky vždy objeví mutant, který je rezistentní
 - tito mutanti přežívají a dále se rozmnožují – v přítomnosti antibiotika rychleji
- Lze snadno nasimulovat v laboratoři

Rezistence k antibiotikům

- **Aktivní rezistence**

- mnohé bakterie syntetizují **enzymy rozkládající antibiotika** (např. penicilinázu)
- **často kódované na plasmidech** – možný přenos i mezi různými druhy (konjugace...)
- aktivní vypuzování antibiotika z buňky

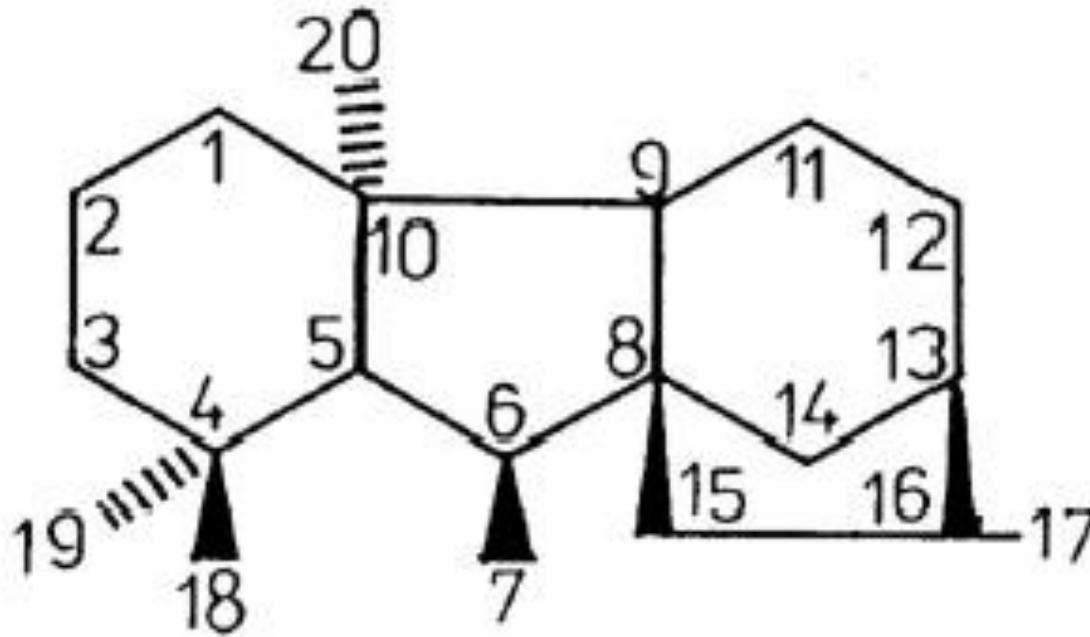
- **Pasivní rezistence**

- obvykle mutací získaná **změna místa působení antibiotika**
 - např. tetracyklin se váže na 30S ribozomální podjednotku, vhodnou mutací je tato vazba znemožněna, ale ribozóm je nadále plně funkční
- změna průchodnosti cytoplazmatické membrány
- absence místa působení (bakterie bez buněčné stěny...)
- absence cílového enzymu

Významní producenti antibiotik

- **Penicilin** – *Penicilium chrysogenum* (houba, askomyceta)
- **Cefalosporin** – *Cephalosporium acremonium* (houba, askomyceta)
- **Streptomycin** – *Streptomyces gryseus* (bakterie, *Actinobacteria*)
- **Bacitracin** – *Bacillus*

Gibereliny



- Producent – *Gibberella fujikuroi* (askomyceta)
- rostlinné hormóny (regulátory) – způsobují „dlouživý růst“
- potenciál v zemědělství

Polyhydroxyalkanoáty

- Některé bakterie produkují zásobní látky na bázi **polyhydroxyalkanových kyselin (PHA)**
 - zásoba uhlíku
 - **β -hydroxymáselná** - nejčastěji
 - **β -hydroxyvalerová**
 - ...
- Tyto polymery mají charakter plastických hmot = **potenciální náhrada klasických ropných plastů**
- **Nevýhoda** = vysoká cena (10x – 100x vyšší než z ropy) – zatím jen speciální použití (lékařské implantáty apod.)
- **Výhoda** = plně recyklovatelné

Polyhydroxyalkanoáty

- Zásobní látky jsou produkovány ve stacionární fázi růstu a při nevyváženém růstu (hodně C, málo N)
- Složení polymeru závisí na kultivačních podmínkách a živinách – možnost ovlivnit
- **Možnost využít odpadních surovin - vysoký obsah C**
 - celulóza (papír), škrob, lipidy...
 - recyklované PHA

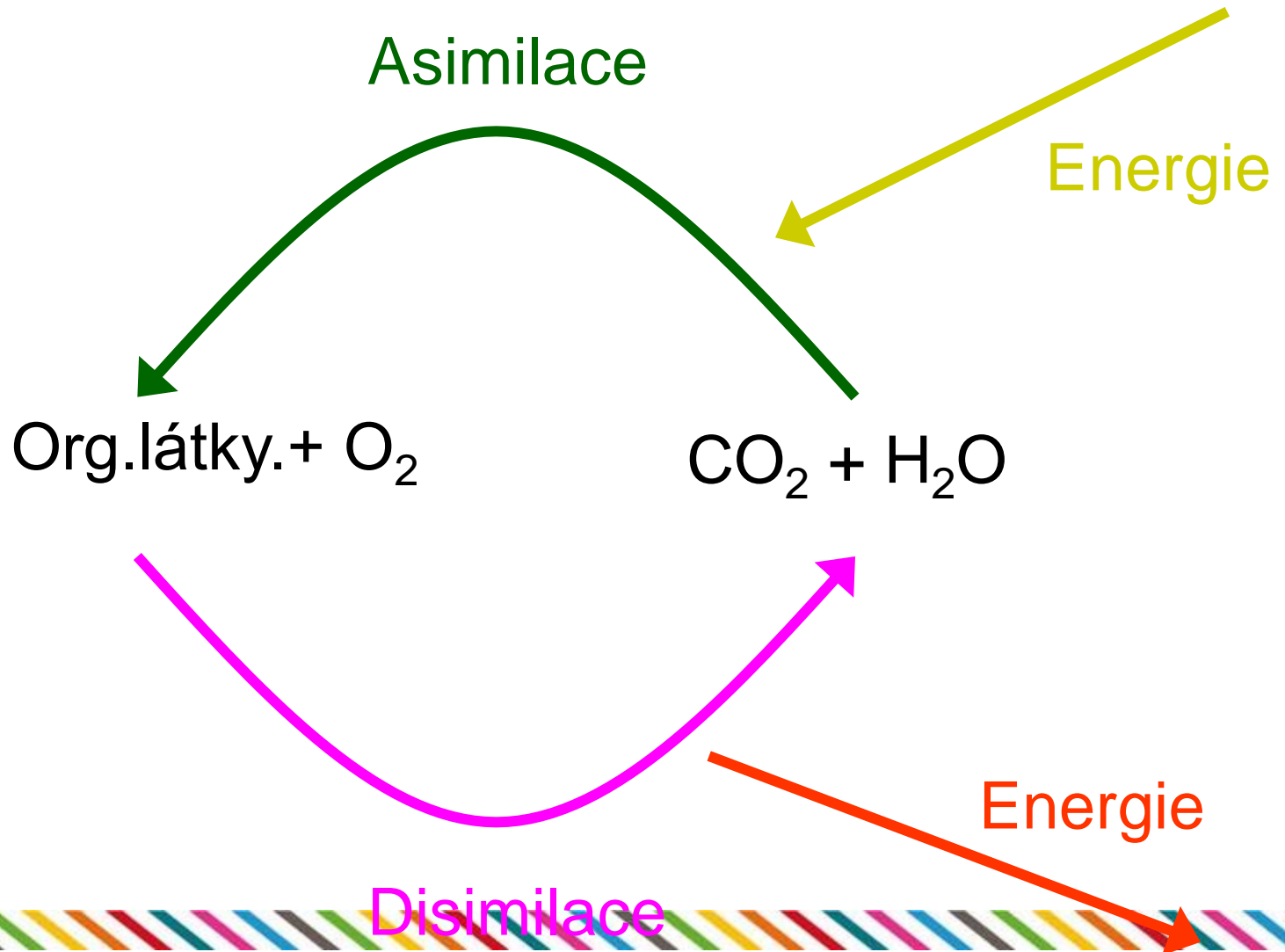
- =**geochemické cykly**
- Organismy využívají různé látky z prostředí a jiné produkují
- U většiny prvků cyklické změny
- Nejdůležitější cykly C, O, N, S, P
- **Klíčová role mikroorganismů** – některé přeměny jiné skupiny organismů neumí

- Je třeba odlišovat **asimilační** (anabolické) a **disimilační** procesy
- **Asimilační proces** – smyslem je zabudovat prvek do své biomasy
 - fixace vzdušného dusíku, asimilace dusičnanů...
- **Disimilační proces** – prvek je přeměněn (oxidační stav) a zpět vyloučen, organismus využije rozdíl energie
 - nitrifikace, denitrifikace...

- Uhlík je v přírodě v různých podobách
- **Anorganický**
 - uhličitany
 - CO₂
 - nesloučený uhlík – grafit, uhlí
- **Organický**
 - **Biotický** – základní stavební prvek živé hmoty – živá a odumřelá těla organismů
 - **Abiotický** – fosilní uhlík (ropa, uhlí, zemní plyn)

- Kyslík je v přírodě v různých podobách
- **Nesloučený**
 - O_2 v atmosféře
 - ozón O_3 ve svrchních vrstvách atmosféry
- **Sloučený**
 - voda
 - organické látky živého i neživého původu – sacharidy, alkoholy, bílkoviny...
 - anorganické látky – oxidy, sole, kyseliny...

Koloběh uhlíku a kyslíku



Asimilace uhlíku

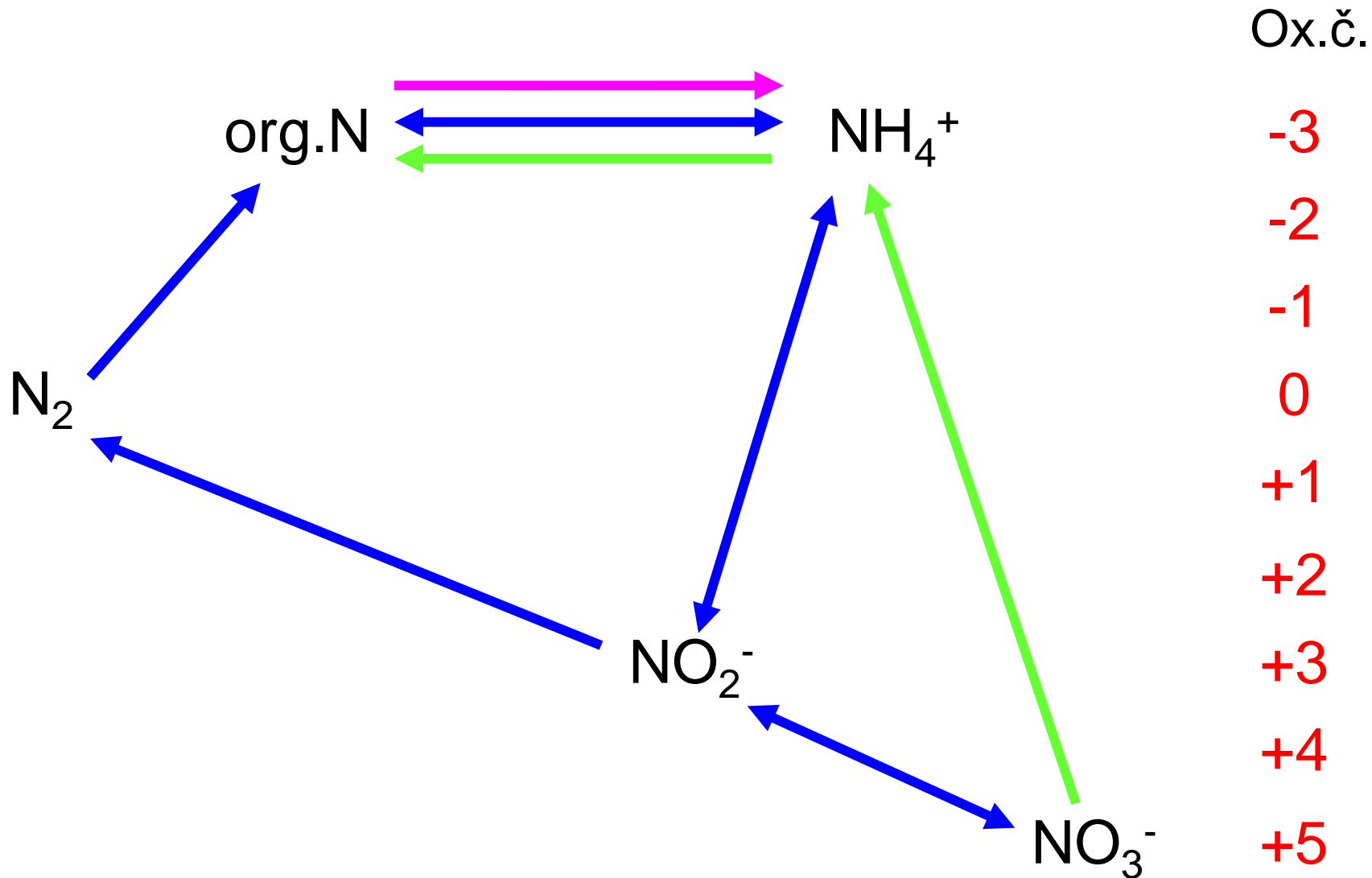
- **Potřeba energie**
 - světelná (fotosyntéza)
 - chemická
- **Autotrofní organismy**
 - Sinice (Bacteria)
 - Rostliny (Eukarya)
 - Řasy (Eukarya)
 - Mnohé lithotrofní bakterie a archea

Disimilace

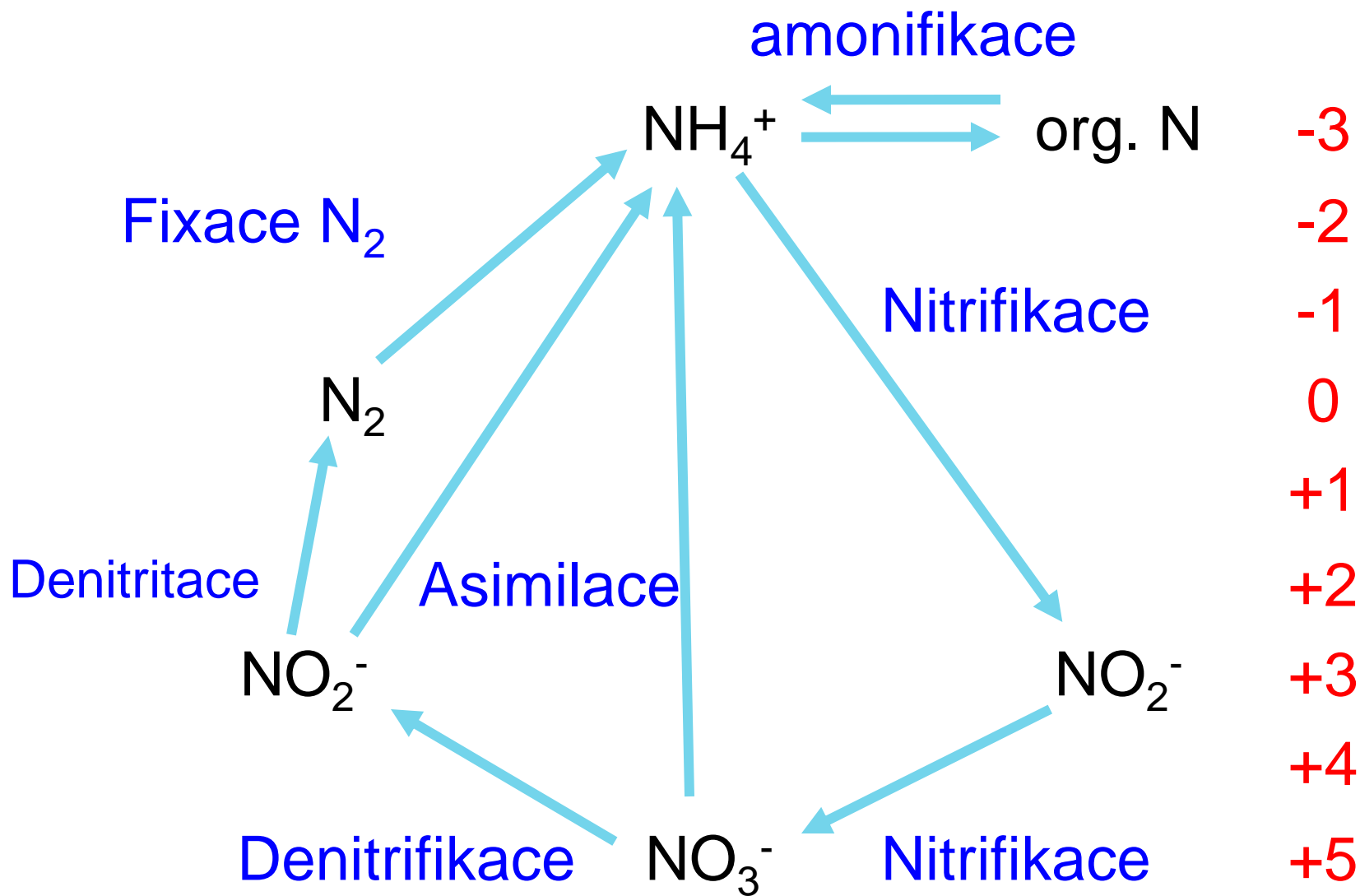
- Oxidace organických látek na CO₂ a vodu
- Aerobní (nejčastěji) i anaerobní
- Heterotrofní organismy

- Dusík je v přírodě v různých podobách
- **Nesloučený**
 - N_2 v atmosféře
- **Sloučený**
 - **anorganické látky** – dusičnany, dusitany, amonné sole...
 - **organické látky** – živého i neživého původu – bílkoviny, puriny, aminy...

Koloběh dusíku



Koloběh dusíku u MO



Nitrifikace

- Oxidace amonných látek (amoniaku) na dusitany a dusičnany
 - není znám organismus schopný kompletní nitrifikace
 - nitritace – $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$
 - nitratace – $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$
 - žijí v symbióze (metabióza)
- Aerobní proces sloužící jako zdroj energie
- *Nitrosomonas* (nitritační), *Nitromonas*, *Nitrobacter* (nitratační)...
- Využití při čištění odpadních vod

- Redukce dusičnanů na dusitany a dusík
- Obvykle **anaerobní proces**
 - obvykle inhibice kyslíkem
- Dusičnany a dusitany slouží jako konečný akceptor elektronů v oxidačním řetězci (**anaerobní respirace**)
 - zisk energie
- Heterotrofní bakterie, obvykle G⁻
- *Pseudomonas, Alcaligenes, Thiobacillus, Paracoccus*
 - **praví denitrifikátoři (true denitrifiers)**
 - kompletní denitrifikace až na N₂
- řada dalších bakterií umí jen NO₃⁻ → NO₂⁻

Fixace dusíku

- Přeměna vzdušného dusíku na amoniak
- Aerobní proces vyžadující **mnoho energie** (12-16 ATP na jednu molekulu N₂)
- Hlízkovité bakterie – symbióza s rostlinami (*Rhizobium*)
- *Azotobacter* – nesymbiotické
- *Cyanobacteria* (sinice)
- Některé aktinobakterie (*Frankia...*) – symbiotické i nesymbiotické

Asimilace dusičnanů a dusitanů

- Většina bakterií umí využít (**asimilovat**) dusičnany a dusitany pro tvorbu organických látek
- Několikanásobná redukce

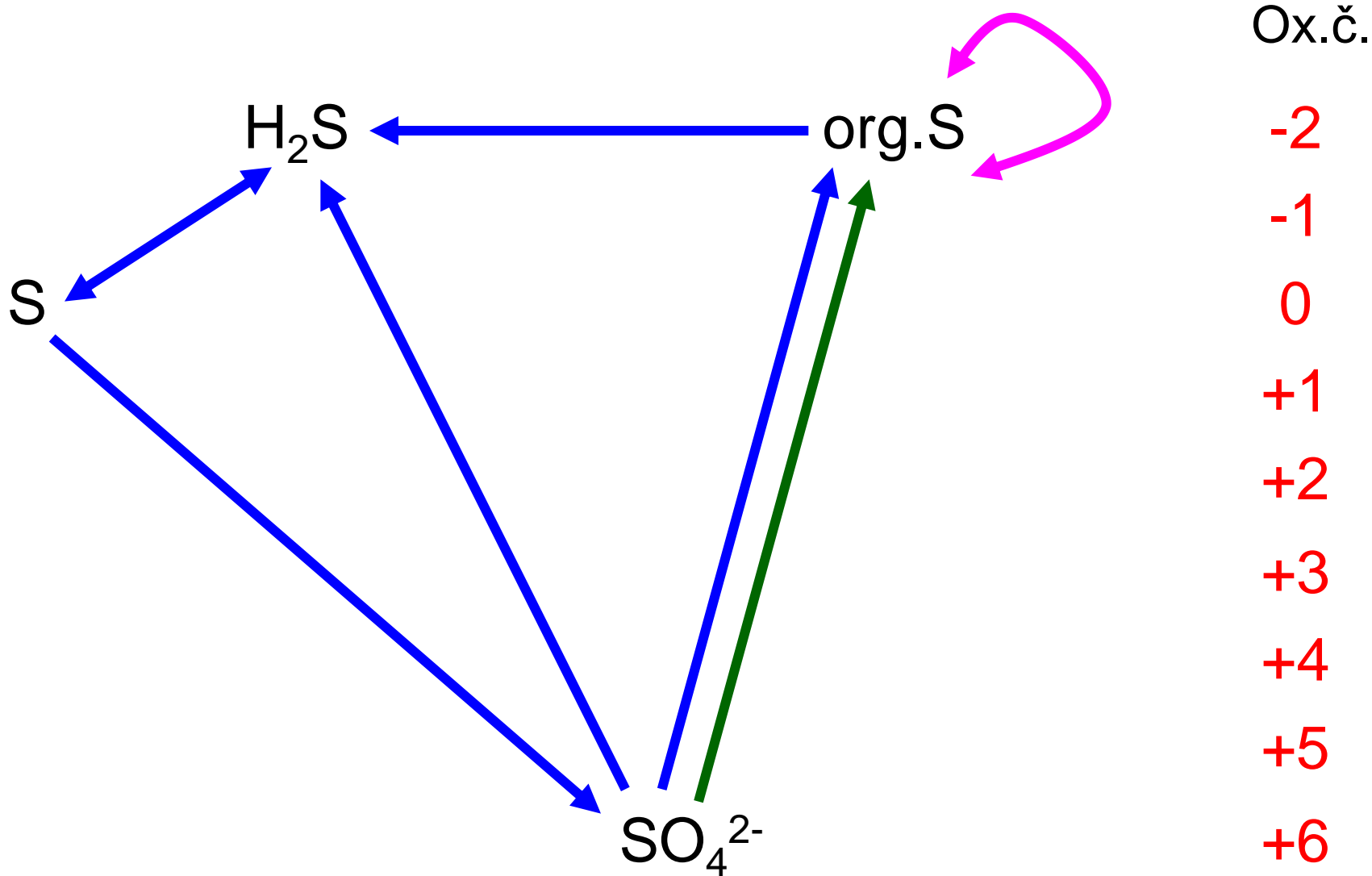


- **Bakterie musí dodat energii** – nevýhodné, dává přednost organickému dusíku nebo NH_4^+
- **nezaměňovat s denitrifikací!**

Koloběh síry

- Síra je v přírodě v mnoha podobách
 - čistá síra
 - sírany
 - sulfidy
 - sulfan
 - organická síra

Koloběh síry



Koloběh síry

- Většina živočichů umí využít jen organickou síru (**závislost na rostlinách**)
- MO a rostliny umí asimilovat sírany na organickou síru
- Jen MO umí převést organickou síru na sulfan

Anaerobní sírná respirace

- Bakteriální rody *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*
- Sírany, siřičitany a thiosírany slouží jako terminální akceptor elektronů při oxidaci organických látek
- Obvykle striktně anaerobní organismy

Sírné bakterie

- Rody *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*...
- Oxidace sulfanu na síru
- Oxidace síry na sírany (kys. sírovou)
- **Potřeba kyslíku**
- Někdy ukládání síry jako zásobní látky
- Někdy okyselení prostředí (vznik H_2SO_4)
 - *Thiobacillus*
- Pozn.: H_2S je na vzduchu samovolně oxidován na síru

Sírná fotosyntéza

- Fototrofní sírné bakterie
- Primitivnější fotosyntéza než u rostlin
- **Anaerobní proces**
- $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{S}$

Thermofilní redukce síry

- Extrémně termofilní Archea
- Redukce síry plynným vodíkem nebo organickými látkami
- V blízkosti podmořských sopek
- Anaerobní proces
- Teplota i přes 100°C

Asimilace síranů

- Většina bakterií
- Zapojení síranů do organických látek (zejména SH skupiny)
- Postupná enzymatická redukce