



**PRIROČNIK ZA UČENJE PRI  
PREDMETU OSNOVE  
MIKROBIOLOGIJE**

**(1. LETNIK - BOLONJSKI PROGRAM PRI PROF.  
NINI GUNDE CIMERMAN)**

Priročnik je napisan v obliki kratkih povzetkov in zajema snov 1. letnika smeri Biologija na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

**Ljubljana, 10.2.2010**

## KAZALO

Mikrobiologija.....	4
BAZIČNE IN APLIKATIVNE VEDE.....	4
Zgodovina mikrobiologije.....	5
LOUIS PASTEUR (1822 – 1895).....	5
ROBERT KOCH (1843 – 1910).....	5
AGAR IN PETRIJEVKA.....	5
VAKCINACIJA.....	5
KEMOTERAPIJA.....	6
ODKRITJA IZ MIKROBNE EKOLOGIJE.....	6
Mikroskopija.....	6
FIKSIRANJE PREPARATOV.....	6
Funkcionalna anatomija prokariontske celice.....	7
Morfologija prokariontskih celic.....	7
Velikost mikrobnih celic.....	8
BAKTERIJSKA CELIČNA STENA.....	8
PERIPLAZMATSKI PROSTOR.....	8
VKLJUČKI BAKTERIJSKI CELIC.....	11
BAKTERIJSKI KROMOSOM.....	12
Bakterijska endospora.....	12
Gibanje mikroorganizmov.....	13
Razporeditev bičkov.....	13
taksija.....	13
PILI IN FIMBRIJE.....	14
Metabolizem.....	14
Virusi.....	26
Onkovirusi in Onkogeni.....	28

Rastlinski virusi.....	29
Taksonomija virusov.....	29
Viroidi .....	29
VIRUSOIDI.....	29
Prioni.....	30
INTERFERONI.....	30

## MIKROBIOLOGIJA

Mikrobiologija je znanost o mikroorganizmih (bakterijah, algah, kvasovkah in protozoidih) in virusih. Obsega biosistematiko (taksonomijo), fiziologijo, ekologijo in molekularno biologijo mikroorganizmov.

Mikrobi imajo vse lastnosti živih celic:

- presnavljajo (se hranijo, izločajo, sintetizirajo za rast potrebne produkte ...),
- se razmnožujejo,
- se diferencirajo (npr. v sporo),
- komunicirajo,
- mutirajo in se evolucijsko spreminjajo.

Mikroorganizme najdemo povsod, poznamo pa le majhen delež vseh vrst (0,3% virusov, 0,2% bakterij, 4,2% gliv ...). Število vseh vrst lahko približno izračunamo iz hitrosti odkrivanja novih vrst.

Tudi človek je vsakodnevno v interakciji z mikroorganizmi, čeprav se jih zares zaveda šele, ko gre za povzročitelje bolezni. Nekoč je bilo največ smrti zaradi bakterijskih in virusnih okužb (pljučnica, tuberkuloza ...), danes pa so med najpogostejšimi vzroki smrti v razvitem svetu rak in kardio-vaskularna obolenja. V razvijajočem se delu sveta zaradi infekcij z mikroorganizmi še zmeraj 46% vseh smrtnih žrtev. Razlike so nastale zaradi odkritja antibiotikov in drugih zdravil ter cepiv, pa tudi zaradi boljših higienskih pogojev.

Pogosto jih uporablja v industriji (pri sintezi različnih produktov uporabljamo mlečnokislinske bakterije, osetnokislinske bakterije ...), v pivovarstvu (kvasovke), farmacevtski industriji (produkcija humanega inzulina, cepiv, antibiotikov...) ipd. V agronomiji so pomembne dušikove bakterije, ki vežejo zračni dušik in živijo v koreninskih nodulih metuljnic.

## BAZIČNE IN APLIKATIVNE VEDE

Bazične vede so tiste, ki služijo zgolj kot raziskovalno orodje in ugotovitve niso širše uporabne, čeprav to lahko postanejo. Bazične vede so: mikrobna taksonomija, fiziologija, biokemija, genetika, filogenija, virologija, molekularna biologija in biotehnologija.

Aplikativne vede so tiste, ki pomagajo reševati praktične probleme in so torej uporabne za širši krog ljudi. Aplikativne vede so: medicinska, akvatična, sanitarna, živilska, agronomska, industrijska, ekološka mikrobiologija in imunologija.

### • KOLIKO GENOV VSEBUJE TIPIČNA BAKTERIJSKA CELICA?

Primer: E. Coli vsebuje 3500 genov od tega 3000 kodirajočih.

## ZGODOVINA MIKROBIOLOGIJE

Prvi mikroskopi so omogočili prva opazovanja mikroorganizmov. Robert Hook je na usnju prvi videl plesni in je začetnik celične teorije. Antonie van Leuwenhoek je sestavljal prvi mikroskop z več lečami in je prvi opisal prokariote, zato se šteje za začetnika mikrobiologije. Z nadaljnjim razvojem mikroskopa in mikrobioloških tehnik barvanja in gojenja čiste kulture je mikrobiologija kot veda še napredovala.

### LOUIS PASTEUR (1822 – 1895)

Za življenja Pasteurja je vladala teorija o spontani generaciji življenja iz nežive snovi. Da je ta teorija napačna, je dokazal s steklenico z labodjim vratom. V steklenico je nalil mesno juho in jo prekuhal. Tako je steriliziral juho, para pa je sterilizirala še vrat. Kljub temu, da je steklenica ostala odprta, juha ni začela gniti, saj so mikroorganizmi sedimentirali v vrat steklenice. Tako je dokazal, da gnitje povzročajo mikroorganizmi in ne kakšna druga nevidna sila.

Pasteur je tako prvi uvedel:

- pasterizacijo – segrevanje hrane, ki ubije patogene organizme v njej
- sterilizacijo – uničevanje mikrobov (najprej samo s prekuhavanjem)
- fermentacijo – je prvi, ki s fermentacijo poveže mikroorganizme

John Tindall ugotovi, da tudi sterilizacija v določenih primerih ni uspešna in tako odkrije endospore.

### ROBERT KOCH (1843 – 1910)

Koch je bil prvi medicinski mikrobiolog, saj je uspel najti povezavo med boleznimi in mikroorganizmi. To povezavo je dokazal pri iskanju povzročitelja antraksa (vraničnega prisada).

Kochovi postulati:

- 1.) V oboleli živali moramo videti patogene, ki jih v zdravi živali ne moremo najti.
- 2.) Osumljenega patogena izoliramo na sterilno gojišče.
- 3.) Če ga inokuliramo v zdravo žival, mora ta zboleti za istimi znaki kot prva.
- 4.) Če vzorec nove živali vzgojimo na čisti plošči, se mora ujemati s prvim vzorcem.

Po odkritju povzročitelja antraksa, je našel tudi povzročitelja tuberkuloze, pri čemer je moral uporabiti diferencialno barvanje, zatem pa še povzročitelja kolere. Odkril je prednosti filtriranja vode in prvi uvedel mikrofotografijo.

### AGAR IN PETRIJEVKA

Za trdna gojišča so najprej uporabljali krompir, za patogene pa živalsko želatino, ki pa se je pri visoki temperaturi topila. Agar, ki je v takratne kuhinje ravno prišel za aspiko, je za trdna gojišča predlagala Fannie Hesse, žena Walterja Hessa, ki je bil Kochov sodelavec.

Prva gojišča so pred kontaminacijo zavarovali z lesenimi zaboječki, težavo pa je z odkritjem petrijevke rešil Richard Petri.

### VAKCINACIJA

Prvo vakcino je odkril Edward Jenner, ki je odkril cepivo proti črnim kozam. Povzročitelja ni poznal, saj gre za virus, vendar je ugotovil, da ljudje, ki so dobili kravjo obliko črnih koz (mylejša različica), niso zboleli za človeško obliko. Beseda vakcinacija izhaja iz besede vaca, ki pomeni krava, saj je Jenner prvo cepivo naredil iz kravjih ran. Pri cepljenju v organizem vneseš oslabljen patogen, ki sproži imunski odziv in tvorbo protiteles, ki omogočajo odpornost organizma.

Priprava cepiv poteka na različne načine:

- Mikroorganizme oslabimo s precepljanjem (staranje kulture)
- Z gojenjem pri mejni temperaturi
- S prehodom preko druge živalske vrste
- S sušenjem
- Danes pa večino cepiv že pridobivamo z genskim inženiringom

## **KEMOTERAPIJA**

Kemoterapija je zdravljenje bolezni z biološko ali kemično sintetiziranimi snovmi. Dolgo so poznali samo eno kemijsko zdravilo – kinin za zdravljenje malarije. Potem pa je Paul Erlich iskal snov, ki bi delovala inhibitorno samo na bakterijske celice in leta 1912 iznajde zdravilo za sifilis: salvarsan.

Gerhard J. Domagk odkrije snov, ki v telesu tvori sulfonamide, ki delujejo na streptokoke in ga poimenuje prontosil. Šele leta 1929 Alexander Fleming po naključju odkrije penicilin. Ker je penicilin sekundarni metabolit, ga je bilo težko pridobivati v večjih količinah, vse dokler niso patentirali bioreaktorjev in ga začeli množično proizvajati.

## **ODKRITJA IZ MIKROBNE EKOLOGIJE**

Martinus Beijerinck je odkril bakterija rosu Rizobium, ki živijo v nodulih stročnic. S tem povezano je bilo tudi njegovo odkritje o kroženju elementov v biogeokemijskih ciklih s pomočjo mikrobov. Odkril je tudi postopek obogatitvenih kultur. Sergej Winogradski je odkril nitrificirajoče bakterije.

## **MIKROSKOPIJA**

### **FIKSIRANJE PREPARATOV**

#### **BARVANJE PREPARATOV - RAZLIČNE TEHNIKE**

- ENOSTAVNA BARVILA
- DIFERENCIALNA BARVILA
- V KAKŠNEM PRIMERU JE NAJBOLJE UPORABITI:
- ENOSTAVNO BARVILO
- DIFERENCIALNO BARVILO
- NEGATIVNO BARVILO

- FLAGELARNO BARVILO
- ZAKAJ SE KATIONSKA BARVILA UPORABLJAJO ZA SPLOŠNO OBARVANJE MIKROBNIH CELIC?
- KAKŠNE BARVE JE GRAM NEGATIVNA BAKTERIJA PO BARVANJU PO GRAMU?
- NA ČEM TEMELJIJO RAZLIKE V OBARVANOSTI CELIC PO GRAMU?
- ZAKAJ ALKOHOL ZLAHKA RAZBARVA GRAM NEGATIVNE BAKTERIJE?
- KAKŠNEN JE NAMEN BARVANJA PREPARATOV PRI SVETLOBNI MIKROSKOPIJI?
- KATERE MIKROSKOPSKE TEHNIKE LAHKO VČASIH IZBOLJŠAJO RESOLUCIJO?
- RAZLOŽITE POJME RESOLUCIJA, NUMERIČNA APERTURA, POVEČAVA
- KATERA JE ZGORNJA MEJA LOČLJIVOSTI ZA SVETLOBNI MIKROSKOP?
- OPIŠITE NAČIN DELOVANJA FLUORESCENTNEGA MIKROSKOPA
- OPIŠITE NAČIN DELOVANJA FAZNOKONTRASTNEGA MIKROSKOPA
- OPIŠITE NAČIN DELOVANJA MIKROSKOPA S TEMNIM POLJEM
- OPIŠITE NAČIN DELOVANJA TRANSMISIJSKEGA ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA
- OPIŠITE NAČIN DELOVANJA VRSTIČNEGA (SCAN) ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA
- KATERE SO GLAVNE POMANKLJIVOSTI ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA V PRIMERJAVI S SVETLOBNIM?
- KATERE SO GLAVNE PREDNOSTI ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA V PRIMERJAVI S SVETLOBNIM?
- KATERI TIP MIKROSKOPA BI UPORABILI ZA OPAZOVANJE TRIDIMENZIONALNE STRUKTURE CELIC?
- KATERI TIP ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA BI UPORABILI ZA OPAZOVANJE BAKTERIJSKEGA NUKLEOIDA?
- KATERI TIP ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA BI UPORABILI ZA OPAZOVANJE BAKTERIJSKIH BIČKOV?
- KAJ JE ELEKTRONSKA MIKROGRAFIJA?
- GLAVNE ZNAČILNOSTI KONFOKALNE MIKROSKOPIJE

## FUNKCIONALNA ANATOMIJA PROKARIONTSKE CELICE

### MORFOLOGIJA PROKARIONTSKIH CELIC

Različne oblike bakterijski celic:

- koki (diplokoki, streptokoki, stafilokoki, sarricine)
- bacili (diplobacil, streptobacil, kokobacil)
- spirili
- filamenti
- spirohete
- bakterije z izrastki

## VELIKOST MIKROBNIH CELIC

Prokariotske celice: 0,1-50 $\mu$ m (izjeme: nanoarheje – 400nm, *E. coli* – 0,5 $\mu$ m)  
Eukariotske celice: 3-200 $\mu$ m (izjema: *Nanochlorum eucaryotum* – 1-2 $\mu$ m)

Manjša kot je celica, večje je razmerje med površino in volumnom ( $P/V=3r$ ).

## BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Pri G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup> bakterijah je osnovna enota celične stene glikotetrapeptid, sestavljen iz NAM (N-acetilmuraminske kisline) in NAG (N-acetilglukozamina), povezanih z  $\beta$ 1,4-glikozidno vezjo, ter prečnih tetrapeptidnih vezi med NAM.

G<sup>-</sup> bakterije imajo skoraj vedno enako zaporedje aminokislin v tetrapeptidnih vezeh (L-Ala, D-Glu, DAP, D-Ala). Pri G<sup>+</sup> bakterijah pa najdemo še L-Lys (pogosto namesto DAP) in D-Glu-NH<sub>4</sub> (vlada večja variabilnost). Posebnost so tudi posebni aminokislinski mostički med glikotetrapeptidi iz 5 aminokislin, povezanih s peptidnimi vezmi. Mostički so iz glicina, treonina in aspartata.

## DELITEV CELICE IN IZGRADNJA NOVE CELIČNE STENE

Celica se pred delitvijo podaljšuje in vgrajuje nove dele celične stene. Ko podvoji kromosom, se začne zažemati in nastane septum. Sinteza nove celične stene poteka s pomočjo encimov avtozolinov. Nosilec sladkorjev UDP (uridin difosfat) se poveže z NAM, ki ima pripetih 5 aminokislin. Celotnemu kompleksu skozi membrano pomaga organski alkohol baktoprenol, ki molekulo začasno naredi hidrofobno. Na kompleks se veže še en NAM in pri G<sup>+</sup> bakterijah še mostiček iz 5 aminokislin. Zadnja (5.) aminokislina se uporabi kot energetska molekula pri transpeptidaciji.

Transpeptidacija je povezava novih glikotetrapeptidov v steno in je zadnji korak pri sintezi peptidoglikana. Poteka ob porabi energije, ki se sprosti pri odcepitvi pete aminokislinske skupine iz NAM. Encimi za transpeptidacijo se nahajajo v periplazmatski špranji. Na omenjene encime deluje penicilin, ki prepreči nastajanje nove celične stene.

## RAZLIKE MED EVBAKTERIJSKO IN ARHEBAKTERIJSKO CELIČNO STENO

Eubakterijska stena je peptidoglikanska ali mureinska, arhebakterijska pa je lahko psevdomureinska, lahko pa je glikoproteinska ali izključno iz polisaharidov oz. proteinov.

Pri psevdomureinski steni so vezi med sladkorji  $\beta$  1,3-glikozidne, NAM pa je zamenjan z N-acetil-taloza-minuronsko kislino. Poleg tega v aminokislinskih povezavah ni D oblik aminokislin.

## PERIPLAZMATSKI PROSTOR

Periplazmatski prostor oz. špranja je širok med 1 in 70 nm (ožji pri G<sup>+</sup> in širši pri G<sup>-</sup>) in se nahaja med steno in membrano. V špranji se nahajajo številni hidrolitični encimi, ki sodelujejo pri zunanji prebavi, vezni proteini, ki se vežejo na snovi in jih prenesejo so membrane, signalni proteini, ki v celici sprožijo niz reakcij. Pri G<sup>-</sup> je napolnjena z rahlim peptidoglikanskim



omrežjem, pri G<sup>+</sup> pa lahko v periplazmično špranjo segajo še teihonske ali lipoteihonske kisline.

### **KAKO LIZOCIM KOT PENICILIN POVZROČITA LIZO BAKTERIJSKE CELICE. OPIŠITE RAZLIKE V NAČINU DELOVANJA ENE IN DRUGE SNOVI.**

Penicilin deluje samo na rastočo celično steno, saj inaktivira encimi, ki sodelujejo pri transpeptidaciji, medtem ko lizocim deluje na  $\beta$  1,4-glikozidno vez in zato deluje tudi na že obstoječo celično steno (deluje samo na evbakterije).

### **NASTANEK IN LASTNOSTI PROTOPLASTOV**

Bakterijske protoplaste dobimo tako, da celice izpostavimo encimu lizocimu, ki cepi vezi med sladkorji in povzroči razgradnjo peptidoglikana. Zagotoviti moramo tudi osmotsko uravnoteženo okolje, drugače poteče liza celice.

### **ZAKAJ LAHKO SAHAROZA STABILIZIRA BAKTERIJSKO CELICO OBDELANO Z LIZOCIMOM IN PREPREČI NJENO LIZO?**

Saharoza kot topljenec lahko zagotovi izotonično okolje za protoplastirano celico in tako prepreči vdiranje vode in lizo celice.

### **OPIŠI NETIPIČNE CELIČNE STENE ARHEJ**

Arheje lahko imajo steno, lahko pa so tudi brez nje. Njihova stena je lahko izključno iz polisaharidov ali proteinov, lahko je glikoproteinska ali psevdopeptidoglikanska (rezistentna na lizocim). Poleg tega lahko imajo še kompleksno celično ovojnico (S-plast).

### **OPIŠI S PLAST**

S-plast je zelo urejena polisaharidna in proteinska struktura, ki jo najdemo pri arhejah in G<sup>+</sup> bakterijah. Lahko obdaja eno ali več celic skupaj. Značilna je za halofilne, metanogene in hipertermofilne mikroorganizme.

#### **• KAJ SO TEIHOIČNE KISLINE IN KJE SE NAHAJAJO?**

Teihonične oz. teihonske kisline so polisaharidi, ki jih najdemo samo pri G<sup>+</sup> bakterijah. Vgrajene so v celično steno, lahko segajo skozi steno in periplazmatski prostor vse do citoplazemske membrane – takrat jih imenujemo lipoteihonske kisline. Če so zelo tesno zbite, lahko na zunanji strani tvorijo kapsulo.

So negativno nabite in sodelujejo pri regulaciji prehoda ionov in delovanju avtolizinov. Shranjujejo rezervni fosfat in bakterijam dajejo antigensko specifičnost.

#### **• SESTAVA LIPOPOLISAHARIDNE PLASTI (LPS) V CELIČNI STENI GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJ**

Lipopolisaharidna plast je značilna samo za G<sup>-</sup> bakterije in na zunanji membrani nadomesti zunanji fosfolipidni sloj. Sestavljena je iz lipida A (ki je tudi endotoksin), na katerem so maščobne kisline pripete na disaharid-N-acetilglukozamin fosfat preko esteraminske vezi. Na lipid A je vezan osrednji polisaharid (stržen), sestavljen iz ketodeoksioktonata, ki je vezan na lipid A, nadaljuje pa se v heksoze ali heptoze. Čisto na koncu je plast O-polisaharida, ki v osnovni enoti vsebuje heksoze (glukoza, manoza, ramnoza, galaktoza) – pogosto je tudi razvejan.

#### **• RAZLIČNE FUNKCIJE LIPOPOLISAHARIDNE PLASTI (LPS) V CELIČNI STENI GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJ**

Funkcije: negativna nabitost, antigenska specifičnost, preprečitev fagocitoze, toksičnost-endotoksini, zaščita pred toksičnimi substancami (antibiotiki, detergenti, prebavnimi encimi,

lizocimi, težkimi kovinami...).

- **ENDOTOKSINI GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJ**

Ker so strukturni del membrane, se sprostijo šele pri poškodbi celice. Endotoksini so termostabilni, toksični v velikih dozah, so rahlo imunogeni in imajo splošno sistemski učinek.

- **KAKŠNA JE FUNKCIJA PORINOV IN KJE SE NAHAJAJO?**

Porini omogočajo prehod hidrofilnih snovi, akvaporini pa vodo. Lahko so specifični ali nespecifični in imajo premer okoli 1nm. Sestavljajo jih 3 transmembranske podenote. Nahajajo se v zunanji in notranji membrani bakterijskih celic.

- **GLIKOKALIKS PRI BAKTERIJAH - POMEN IN SESTAVA**

Glikokaliks je eden izmed zunanjih ovojev celice (EPS) in ima vrstno specifično sestavo: najpogostejši iz polisaharidov, lahko pa iz polipeptidov ali kombinacije obojega. Lahko tvori trdnejšo kapsulo, sluzno plast ali S-plast. Funkcije: pripenjanje na podlago, tvorba biofilmov ali pelikul, virulenca, zaščita (pred izsuševanjem, virusi, toksičnimi agensi, encimi, imunskim sistemom ...).

- **RAZLIKE MED EVBAKTERIJSKO IN ARHEBAKTERIJSKO MEMBRANO**

Pri arhejah je lahko na glicerol namesto maščobnih kislin vezan fosfat, sulfat ali ogljikovi hidrati. Vez je pri arhejah namesto estrska etrska, prav tako samo pri arhejah najdemo fitanil. Zlasti pri termofilnih arhejah najdemo lipidne monosloje.

- **GLAVNE ZNAČILNOSTI LIPIDOV V MEMBRANAH ARHEBAKTERIJ**

- **GLAVNE ZNAČILNOSTI LIPIDOV V MEMBRANAH BAKTERIJ**

- **KAKŠNO VLOGO IMAJO V MEMBRANAH MOLEKULE KOT SO STEROLI IN HOPANOIDI? PRI KATERIH ORGANIZMIH SE POJAVLJAJO?**

Steroli (pri evkariontih) in hopanoidi (pri prokariontih) so velike planarne, toge molekule, ki stabilizirajo membrane in jo naredijo manj fluidno. Hopanoidi se v nasprotju s steroli lahko sintetizirajo tudi v anaerobnih pogojih.

- **POSEBNOSTI CITOPLAZEMSKE MEMBRANE PRI MIKOPLAZMAH**

Mikoplazme so intracelularni paraziti in zato niso izpostavljeni osmotskemu nihanju. Zaradi tega nimajo celične stene, njihove membrane pa za razliko od drugih bakterij vsebujejo sterole. Mikoplazme sterole dobijo od gostitelja in z njimi zmanjšajo fluidnost lastnih membran.

- **ZAKAJ IONIZIRANE MOLEKULE NE PREHAJAJO ZLAHKA SKOZI MEMBRANO? KAKO JO PREIDEJO?**

Ionizirane molekule dobijo hidratacijski ovoj, zaradi česar težko prehajajo membrane. Prehajajo lahko torej le z aktivnim transportom, pri čemer sodelujejo posebni prenašalci in se porablja energija.

- **DELOVANJE MEMBRANSKIH TRANSPORTNIH PROTEINOV**

Transportni proteini delujejo pri aktivnem transportu. Lahko so integralni proteini, lahko so povezani še s perifernimi proteini ali ATPazo, lahko pa gre za cele serije proteinov. Integralni proteini so lahko uniformni, simportni ali antiportni in delujejo s pomočje energije pridobljene iz ATP ali protonskega gradienta ( $H^+$  ali  $Na^+$ ).

- **ZAKAJ SO POTREBNI TRANSPORTNI PROTEINI?**

Potrebni so za prenos snovi proti koncentracijskemu gradientu.

- **ZAKAJ CELICE NE MOREJO PRIDOBITI HRANIL SAMO S POMOČJO DIFUZIJE?**

- **KATERE SNOVI LAHKO PREHAJAJAJO V CELICO PASIVNO?**

Voda, plini, enostavni sladkorji in molekule topne v maščobah (alkoholi, maščobne kisline ...).

- **PREHOD SNOVI SKOZI CITOPLAZEMSKO MEBRANO - PRINCIPI**

- **RAZLIKE MED AKTIVNIM IN PASIVNIM TRANSPORTOM**

Pri aktivnem transportu gre za prenos snovi proti koncentracijskemu gradientu in je za to potrebna energija, pri pasivnem transportu pa topljenec prehaja iz visoke k nizki koncentraciji in dodatna energija ni potrebna.

- **OPIŠI SKUPINSKO TRANSLOKACIJO GLUKOZE**

Skupinska translokacija je oblika aktivnega transporta predvsem sladkorjev pa tudi pirinov in pirimidinov. Glukoza, ki se prenaša, se med transportom kemijsko modificira – fosforilira (fosfotransferazni sistem).

- **OPIŠI ABC TRANSPORTNI SISTEM**

ATP binding cassette (ABC) oz. ATP transporter je transmembranski protein, ki uporablja energijo hidrolize oz. cepitve ATP-ja za aktivni transport preko membrane. Značilen je predvsem za G- bakterije.

- **OPIŠI TRANSPORT SNOVI S PERMEAZAMI**

Permeaze sodelujejo pri pospešeni difuziji, kjer pasivno odprejo kanale in omogočijo pasiven prehod snovi. Med permeaze spadajo tudi porini.

- **GLAVNE STRUKTURNE KOMPONENTE TREH GLAVNIH TIPOV AKTIVNEGA TRANSPORTA SNOVI**

Skupinska translokacija – gre za celo kaskado med seboj povezanih proteinov, za energijo pa se porablja PEP.

Aktivni transport – sodelujejo prenašalci, ki imajo specifično vezavno mesto za substrat in proton (ta omogoča energetsko ugodnejši prenos). Energija prihaja iz ATP ali protonske gibalne sile.

ABC transport – sodelujejo transmembranski in periplazmatski proteini, ATP hidrolaza – porablja se ATP.

Do kemijskih sprememb snovi pride samo pri skupinski translokaciji, kjer se snov fosforilira.

## **VKLJUČKI BAKTERIJSKI CELIC**

Bakterijski vključki so le približni nadomestek evkariontskih celičnih organelov. Praviloma niso obdani z membrano, ali pa ta vsaj po zgradbi ni podobna celični membrani. Od evkariontskih organelov se razlikujejo tudi po tem, da v organelih večinoma poteka kakšna metabolna pot, prokariotski vključki pa so namenjeni predvsem shranjevanju založnih snovi in metabolnih produktov ter gibanju. Ločimo različne tipe vključkov:

- Volutinske inkluzije – rezerva fosfata, ki je potreben za sintezo ATP (so identifikacijski znak)
- Lipidne inkluzije – zaloga C in energetska rezerva (v obliki PHB – poli  $\beta$ -hidroksibutirinska kislina, ki spada med PHA)
- Žveplene granule – žveplo se akumulira znotraj celice ali v periplazmatski špranji
- Karboksisomi – metabolni vključki, saj v njih poteka Calvinov ciklus (pri fototrofi in kemolitotrofi)
- Polisaharidne granule – energetska rezerva v obliki škroba ali glikogena
- Plinske vakuole – omogočajo gibanje v vodnem stolpcu, zato jih najdemo samo pri akvatičnih mikroorganizmih; zgrajene so zelo kompleksno-obdane z rigidno membrano (ta je iz dveh vrst proteinov, GvpA, ki deluje kot vzmet in je prečno povezan z GvpC, ter nekaj polisaharidov)

- Magnetosomi – vsebujejo kristale magnetita in omogočajo magnetotaksijo (orientacija v magnetnem polju); imajo kompleksno membrano, morfologija pa je vrstno specifična

## BAKTERIJSKI KROMOSOM

V večini primerov je bakterijski kromosom krožen, kovalentno zaprt in ni povezan s histoni (arheje lahko imajo proteine, vendar ne histonov). Jedra ni, obstaja le jedrna regija (nukleoid) v kateri se nahaja kromosom. Prokarioti so zmeraj haploidni, zato se izrazi vsaka mutacija. Izjeme so nekatere bakterije, ki imajo linearni kromosom, nukleoid z dvema jedrnima membranama ali več kopij kromosomov.

Kromosom bakterij vsebuje superzavita območja, ki jih vzdržujejo posebni proteini. DNA je lahko zavita pozitivno (desnosučna) pri arhejah ali negativno (levosučna), ki je pogostejša. Encim za zasukanje pri bakterijah in arhejah je DNA giraza = DNA topoizomeraza II. Encim za odvijanje in zavijanje v desno je tako pri ev- kot pri prokariotih DNA helikaza = DNA topoizomeraza I. Odvijanje pozitivno zavutih DNA pri arhejah pa katalizira reverzna giraza. Skoraj vsa DNA pri prokariotih je kodirajoča (eksoni), intronov skorajda ni.

## GENETSKE IZMENJAVE PRI PROKARIONTIH

Pri prokariotih genetske izmenjave potekajo vedno enosmerno (od donorja do recipienta)-paraseksualni proces. Gre za fragmentaren proces (nikoli celotni kromosom). Tipi genetske izmenjave:

- Konjugacija je izmenjava dednine preko pilusa med dvema bakterijama. Recipientska celica dobi zmožnost rasti pilusa.
- Transdukcija je prenos dednega materiala z fakteriofagi (lizogenimi virusi), ki se vključijo v genom celice.
- Transformacija pa je privzem proste DNA iz okolja.

## BAKTERIJSKA ENDOSPORA

Endospora je diferenciacija bakterijske celice in je dormantna ter izjemno rezistentna struktura. Sposobnost sporulacije (tvorbe spor) imajo le G+ bakterije (20 rodov). Endospore lahko mirujejo tisoče let, dokler pogoji niso primerni za kalitev.

Spora je zgrajena iz sredice, ki je ostanek vegetativne celice, korteksa (podaljšana celična stena), spornega plašča (debel, nepropusten, iz več proteinskih plasti) in eksosporiuma (tanek, proteinski). Bakterija si s tvorbo endospore zagotovi preživetje v za vegetativno celico letalnih pogojih (izjemna odpornost na sevanje, kemijske agense, izsuševanje, visoke temperature ...). Človek se endospor lahko znebi z dvojno sterilizacijo na 120°C.

## SPORULACIJA

Proces, ki poteka v sporangiju se imenuje sporulacija. Pri tem procesu sodeluje okoli 200 genov. Sporogeneza poteče v 8-10 urah, če je celica izpostavljena subletalnim pogojem (takšnim, ki jo skoraj ubijejo). DNA se zgosti v aksialni filament, ki ga stabilizirajo SASP proteini (majhni v kislinah topni proteini), ki hkrati preprečujejo tvorbo timinskih dimerov. Citoplazmatska membrana se uviha in obda del celice, ki bo v spori – ta dobi dvojno membrano. Med

membranama se oblikujejo dodatne ovojnice. Vmes se odvija dehidracija s Ca-dipikolinatom (dipikolinska kislina, povezana s Ca), ki prav tako kondenzira in zaščiti DNA. Ko spora dozori, sporangij razpade v procesu avtolize. Pri tem se pH v celici zniža na okoli 5,5, spora pa vsebuje le še 10-20% vode vegetativne celice.

## **KALITEV ENDOSPORE**

Za aktivacijo kalitve je potrebna voda in dovolj visoka temperatura (ugodni pogoji). Endospora sprejme veliko vodo in nabrekne, tako da zunanji ovoj počni in se sredica sprosti. Celica tako izgubi rezistenco, razgradita se SASP in Ca-dipikolinat. Kot vir prve energije se porabijo prav SASP proteini. Poveča se metabolizem celice, celica raste in se začne deliti.

## **GIBANJE MIKROORGANIZMOV**

Bakterije se premikajo aktivno z bički in polzenjem ter s plinskimi vezikli, spirohete pa tudis pomočjo aksialnih fibril. Posebna oblika gibanja je rojenje, kjer bakterije na robu kolonije začasno dobijo zmožnost rasti bička, da se oddelijo od matične kolonije, nato pa bičke izgubijo.

## **RAZPOREDITEV BIČKOV**

Razporeditev bičkov je pomemben taksonomski znak. Ločimo:

- Monotriha – en biček na polu
- Amfitriha – en ali več bičkov na polih
- Lofotriha – šop bičkov
- Peritriha – bički po celotni celici

- **STRUKTURA BIČKOV PRI BAKTERIJAH**
- **KEMIJSKA SESTAVA BAKTERIJSKEGA BIČKA**
- **KAJ JE FLAGELIN IN KJE GA NAJDEMO?**

Flagelin je strukturni protein, ki sestavlja filament bička. Sinteza flagelina potek v citoplazmi, zato se biček ob poškodbi lahko regenerira.

- **KAJ JE ENERGETSKI VIR ZA DELOVANJE BIČKA?**

Vir energije je protonska gibalna sila  $H^+$ , pri čemer je za en obrat bička potreben prehod 1000 vodikovih protonov.

- **KAKO BAKTERIJSKI BIČEK PREMICA CELICO NAPREJ?**

Tako da Mot proteini ob porabi energije vrtijo notranji par obročev okoli svoje osi, zaradi česar se premika celotni biček. Če je bičkov več, delujejo usklajeno. Smer spreminjajo Fli proteini z nagibom bička glede na celico.

## **TAKSIJA**

Bakterije se gibljejo temporalno, tako da se naključno premaknejo v eno smer, se na enake časovne intervale ustavijo in s posebnimi receptorji (termoreceptorji, kemoreceptorji,

fotoreceptorji ...) zaznajo spremembe v okolju.

Taksija je usmerjeno gibanje k atraktantu (npr. hranilni snovi) ali proč od repelenta (npr. toksičnih snovi). Poznamo več vrst taksij: kemotaksija, fototaksija, osmotaksija, skotofobotaksija, aerotaksija ...

## **FOTOTAKSIJA**

Premikanje k ali v stran od svetlobe določene valovne dolžine – odvisno je od vrste pigmenta, ki ga vsebuje bakterijska celica.

## **KEMOTAKSIJA**

Odziv na kemijski dražljaj. Ta je lahko pozitiven – atraktant je npr. hrana, ali negativen – repelent je npr. kakšna toksična substanca.

## **PILI IN FIMBRIJE**

Pili in fimbrije so večinoma prisotni pri G- bakterijah. Pili so vedno nameščeni na polih, so tanjši in daljši od fimbrij (do 10 nm). Bakterija ima le enega do dva pilusa, ki sta namenjena predvsem povezavi med celicama – glavna funkcija je prenos dednega materiala. Ta poteka vedno od celice s pilusom do recipientske celice brez pilusa, ki pa po prevzemu konjugativnega plazmida dobi sposobnost rasti pilusa. Pili lahko služijo tudi za premikanje – npr. IV pili pri *Myxococcus xanthus* za povlek naprej. Pili so tudi vstopno mesto za bakteriofage.

Tako pilus kot fimbrija sta sestavljena iz proteina pilina. Fimbrije omogočajo bakterijam, da se pritrdijo na podlago, tvorijo biofilme, zato so krajše in so lahko razporejene po celotnem telesu. Fimbrije lahko imajo tako G+ kot G- bakterije.

## **METABOLIZEM**

Metabolizem so vsi kemijski procesi, ki se odvijajo v celici. Delimo ga na anabolizem ali biosintezo, pri kateri se energija porablja za sintezo osnovnih celičnih sestavin. Pri razgradnji ali katabolizmu se energija proizvaja iz kompleksnih energetske bogatih snovi s cepljenjem vezi med molekulami.

### **RAZLIČNI TIPI METABOLIZMA**

Delitev glede na vir ogljika:

- Avtotrof (veže anorganski ogljik – CO<sub>2</sub> v organskega) – alge, cianobakterije, rastline
- Heterotrof (vir ogljika je organski) – človek, glive, protozoji

Delitev glede na vir energije:

- Fototrof (vir energije je svetloba) – alge, cianobakterije, druge fotosintetske bakterije
- Kemotrof (vir energije je kemični) – človek, živali, glive

Delitev glede na vir H<sup>+</sup>:

- Litotrof (vir ionov je anorganski) – železove bakterije, žveplo-oksidirajoče bakterije
- Organotrof (vir ionov je organski) – večina nefotosintetskih bakterij

Miksotrof je organizem, ki lahko uporablja različne energijske vire in vire ogljika. Miksotrofi so torej lahko fakultativni foto- ali kemotrofi in avto- ali heterotrofi, lahko pa so celo fakultativni lito- ali organotrofi.

## FOTOSINTEZA

### FOTOSINTETSKI PIGMENTI

V procesu ATP sinteze s pomočjo svetlobe pri vse fototrofnih organizmih sodeluje transport elektronov po elektronski transportni verigi. Fotosintezo omogoča prisotnost pigmentov, občutljivih na svetlobo, ki jo sprejmejo v obliki energetskih kvantov – to je prisotnost ene izmed oblik klorofila.

Klorofil je porfirinski obroč (enako kot citokromi), ki v svojem centru vsebuje molekulo Mg. Na porfirinski obroč je vezana še molekula organskega alkohola – fitola, ki omogoča vezavo klorofila v hidrofobno lipidno membrano. Klorofil a, ki ga najdemo pri rastlinah in cianobakterijah, je zelen, zato ker absorbira rdečo in modro svetlobo, odbija pa zeleno. Bakterije v katerih poteka proces anoksigene fotosinteze imajo bakterioklorofile, ki absorbirajo svetlobo v drugem delu spektra kot klorofil (800-925nm).

Klorofil se nahaja v fotosintetskih membranah, ki so pri evkariontih v tilakoidah kloroplasta, pri prokariotih pa so lahko v kromatoforah (invaginacijah zunanje membrane), v zunanji membrani in/ali v klorosomih. Cianobakterije imajo razvite celo posebne tilakoidne membrane.

Fotosintetski organizmi vsebujejo še številne druge pigmente. Dve skupini akcesornih pigmentov sta karotenoidi in fikobilini. Karotenoidi so rumene, rdeče, rjave ali zelene barve in so trdo vključeni v membrane. Sestavljeni so iz dolgih verig ogljikovodikov. Absorbirajo svetlobo v modrem delu spektra, delujejo kot fotoprotektivni agensi, pri halobakterijah pa generirajo ATP.

Fikobilini so pogostejši pri morskih organizmih v večjih globinah, kjer je svetlobe malo. Združeni so v agregatih, imenovanih fikobilisomih in sodelujejo z antenskimi kompleksi (omogočajo večji izplen svetlobe). Fikobilini so modri – fikocianini (620nm) in rdeči – fikoeritrini (550nm).

### ANOKSIGENA FOTOSINTEZA

Anoksigena fotosinteza je fotosinteza, pri kateri ne nastaja O<sub>2</sub>. Fotosintetski aparat je sestavljen iz štirih pigmentnih kompleksov in ATPaznega kompleksa, ki protonsko gibalno silo pretvarja v energijo za sintezo ATP-ja.

Pigmentni kompleksi so:

- Reakcijski center, ki je sestavljen iz 3 proteinov, ki ohranjajo njegovo strukturo in iz fotosintetskega dela (tega sestavljata 2 molekuli bakterioklorofila – poseben par, še dodatni 2 molekuli bakterioklorofila, 2 molekuli bakterofeofitina in 2 karotenoidni molekuli).
- Antenski kompleksi – center za izplen svetlobe I, center za izplen svetlobe II in citokromski bc1 kompleks (ta je skupen tako respiraciji kot fotosintezi) – lovijo svetlobo in jo prenašajo v reakcijski center ter delujejo kot fotoprotektivni agensi.

Fotosinteza se prične, ko kvant svetlobe pade na poseben par v reakcijskem centru in s tem močno zniža njun redukcijski potencial (postaneta donorja  $e^-$ ). Reduciran bakterioklorofil preda elektrone bakteriofeofitinskima molekulama, te pa naprej številnim drugim prenašalcem (serija Fe-S proteinov in citokromov). S prehodom elektronov med prenašalci in izrinjanjem  $p^+$  preko membrane se ustvarja protonska gibalna sila, ki jo ATPaza pretvarja v energijo, ki jo uporabi za kemiosmotsko sklapanje  $ADP + P \rightarrow ATP$ . Serija reakcij je zaključena, ko zadnji prenašalec citokrom  $bc_1$  preda elektrone citokromu  $c_2$ , ki jih prenese nazaj na začetek na poseben par. Opisan proces se imenuje **CIKLIČNA FOTOFOSFORILACIJA**.

Za redukcijo  $CO_2$  v glukozo v Calvinovem ciklu pa je potreben tudi NADPH. Elektronski donorji za redukcijo  $NADH^+$  v  $NADP^+$  so različni:  $H_2S$  (hidrogensulfid), S,  $S_2O_3^{2-}$  (tiosulfat) ali  $Fe^{2+}$ . Citokromi oksidirajo elektronske donorje, elektroni pa potujejo proti termodinamičnemu gradientu do  $NADH^+$ . Omenjen energetsko potrošen proces se imenuje **REVERZEN TRANSPORT ELEKTRONOV**.

Bakterijska fotosinteza je najbolje proučena pri škrlatnih bakterijah (G-), ki vsebujejo t.i. superoperone, ki se prepišejo v enotno mRNA, saj so produkti v interakciji. Glavni regulatorni signal za prepis superoperonov je prisotnost ali odsotnost  $O_2$ .

## **OKSIGENA FOTOSINTEZA**

Oksigeni fototrofi v nasprotju z anoksigenimi uporabljajo svetlobno energijo tako za sintezo ATP kot NADPH, kot stranski produkt pa nastaja  $O_2$ . Svetlobne faze se odvijajo v dveh sistemih: fotosistemu I (klorofil P700) in fotosistemu II (klorofil P680). Tok elektronov pri oksigeni fotosintezi se imenuje **Z SHEMA**. Fotosistem II v svojem reakcijskem centru sprejme kvant svetlobe. Vmes poteka energetsko neugoden proces razpada vode v  $2O_2$  in  $2H^+$ , pri čemer se kisik sprosti kot stranski produkt. Elektroni iz fotosistema II potujejo preko prenašalcev do plastocianina (ki ima v centru vezan Cu), ki preda elektrone fotosistemu I, ta pa je že pred tem absorbiral kvant svetlobe. Elektroni od fotosistema I potujejo do  $NADP^+$ , ki se reducira v NADPH. Generacija ATP-ja pri oksigeni fotosintezi se imenuje **NECIKLIČNA FOTOFOSFORILACIJA**, saj se elektroni ne vrnejo v reakcijski center, temveč se porabijo pri redukciji  $NADP^+$ .

## **CALVINOV CIKEL**

Calvinov cikel v številnih mikroorganizmih poteka v vključkih, imenovanih karboksosomi. V Calvinovem ciklu poteka fiksacija  $CO_2$  v organsko snov ob porabi NADPH in ATP, nastalih v svetlobnih reakcijah fotosinteze. Pri reakcijah temotne faze sodelujeta dva pomembna encima: ribuloza bifosfat karboksilaza (rubisCo) in fosforibulokinaza.

Prva faza cikla je faza karboksilacije pri kateri rubisCo katalizira sintezo dveh molekul fosfoglicerinske kisline iz  $CO_2$  in ribulaze-1,5-bifosfata. Sledi faza redukcije, kjer se porabi prvi ATP, pri čemer fosfoglicerinska kislina pridobi dodaten P. Oksidira se tudi prvi NADPH, vodik pa se porabi za sintezo gliceraldehid-3-fosfata. Del nadaljuje metabolno pot, drugi del pa se regenerira. V naslednji fazi – fazi regeneracije dobimo ribulozo-5-fosfat. V proces vstopi encim fosforibulokinaza, ki ob porabi ATP, ki fosforilira ribulozo-5-fosfat in nastane ribulozobifosfat. Tu se Calvinov cikel zaključuje.

Za eno molekulo sladkorja heksoze je potrebnih 6 molekul  $CO_2$ , 12 NADPH in 18 ATP.

## **KEMOLITOTROFIJA**



Kemolitotrofi kot energijski vir uporabljajo anorganske kemijske snovi, večina pa je tudi avtotrofnih (kar pomeni, da so sposobni vezati CO<sub>2</sub> iz zraka). Generacija ATP-ja je v principu podobna kot pri kemoorganotrofnih, le da je elektronski donator anorganski. ATP sinteza je torej združena z oksidacijo elektronskega donorja. Viri anorganskega elektronskega donorja so lahko geološki (npr.: vulkanska aktivnost prispeva H<sub>2</sub>S), biološki ali antropogeni (npr.: rudarjenje, kmetijstvo, izgorevanje fosilnih goriv ...). Reducirajočo moč lahko kemolitotrofni organizmi dobijo direktno iz anorganske snovi ali pa z reverznim transportom elektronov.

### **OKSIDACIJA VODIKA**

Oksidacija vodika poteka pri aerobnih vodikovih bakterijah (nekateri lahko namesto kisika oksidirajo tudi CO). Oksidacija H<sub>2</sub> z O<sub>2</sub> povzroči nastanek protonske gibalne sile in posledično generacijo ATP. Reakcijo, pri kateri iz vodika in kisika nastane voda, katalizira encim hidrogenaza. Reducirajoča moč za NAPH<sup>+</sup> pride direktno od H<sub>2</sub> in poteka z reverznim transportom elektronov. Mnogi kemolitotrofi, ki oksidirajo vodik, lahko delujejo tudi kot kemoorganotrofi (kjer je vir vodikovih protonov organski).

### **OKSIDACIJA ŽVEPLOVIH SPOJIN**

Žveplove spojine oksidirajo t.i. »brezbarvne« žveplove bakterije, ki kot elektronski donator uporabljajo vodikov sulfid (H<sub>2</sub>S), elementarno žveplo ali tiosulfat (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Končni produkt vseh oksidacij je v večini primerov sulfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Eden izmed produktov oksidacije žvepla je H<sup>+</sup>, kar povzroči znižanje pH medija. Drug takšen produkt je H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ki prav tako zniža pH v okolici.

### **OKSIDACIJA ŽELEZA**

Nekateri bakterije v aerobnih pogojih oksidirajo Fe<sup>2+</sup> v Fe<sup>3+</sup>, kar daje le malo energije in zato energijsko gledano ni preveč ugoden proces. Mnoge železove bakterije hkrati oksidirajo tudi žveplo (so obligatorni acidofili), saj z nizkim pH-jem preprečijo samodejno oksidacijo Fe<sup>2+</sup> v Fe<sup>3+</sup>, ki poteka pri nevtralnem pH-ju. Protonska gibalna sila je naravno prisotna zaradi razlike v pH-ju med intra in ekstracelularnim okoljem. Elektronska veriga poteka preko citokromov in rusticianina v periplazmatskem prostoru, ki vsebuje Cu. Reducirajoča moč izhaja iz reverznega transporta elektronov.

### **OKSIDACIJA AMONIJA IN NITRATA**

Najpogostejša elektronska donatorja med anorganskimi dušikovimi spojinami sta amonijak (NH<sub>3</sub>) in nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), ki ga oksidirajo nitrificirajoče aerobne bakterije. Ena skupina bakterij (Nitrosomonas) oksidirajo amonij v nitrit (vir C je CO<sub>2</sub>), druga skupina (Nitrobacter) pa oksidirajo nitrit v nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – vir C je organski. V anoksičnih pogojih poteka oksidacija amonija v procesu ANAMMOX – ta proces se uporablja tudi pri čiščenju odpadnih vod.

## **ORGANOTROFIJA ALI RESPIRATORNI METABOLIZEM**

### **FERMENTACIJA**

Začetni korak je glikoliza, ki poteka v citoplazmi. Za fosforilacijo glukoze v glukoza-6-fosfat se v začetni fazi porabi en ATP. Zatem nastane glukoza-6-fosfat, ki se fosforilira v fruktozo-1,6-difosfat. Ta se razcepi na dva gliceraldehida-3-fosfata. Ko se nanju pripne še lementarni fosfat nastane 1,3-difosfoglicerinska kislina, pri čemer se reducira NAD<sup>+</sup> in nastane ATP. Končni produkt glikolize je piruvat, ki nastane iz fosfoenol piruvata.

Pri glikolizi gre večinoma za encimske reakcije, edina oksidoredukcijska je pretvorba gliceraldehida-3-fosfata v 1,3-difosfoglicerolno kislino, pri čemer se  $\text{NAD}^+$  reducira v NADH. Izkupiček glikolize sta 2 ATP, 2 NADH in 2 piruvata.

Pri fermentaciji se sprost majhen delež potencialne energije, saj so C atomi le delno oksidirani, H iz NADH pa se naloži v nek intermediat, ki ima še zmeraj veliko energije. Razlika v redukcijskih potencialih med glukozo in intermediatom je majhna.

Intermediati so pri različnih organizmih različni:

- Kvasovke iz piruvata proizvajajo etanol in  $\text{CO}_2$
- Klostridiji proizvajajo 2-propanol
- Mlečnokislinske bakterije proizvajajo mlečno kislino

Vse to so za organizme odpadni produkti, a so dobri biokemijski indikatorji.

### **AEROBNA RESPIRACIJA**

Pri respiraciji je v nasprotju s fermentacijo prisoten zunanji akceptor elektronov –  $\text{O}_2$ , oksidacija substrata pa je popolna (do  $\text{CO}_2$ ), zato je izplen energije maksimalen.

Respiracija se prične povsem enako kot fermentacija, piruvat pa kasneje vstopi v cikel citronske kisline ali Krepsov cikel. V Krepsovem ciklu se piruvat najprej dekarboksilira, pri čemer nastane en  $\text{CO}_2$ . Nastane acetil, ki vstopi v acetil koencimski A cikel. Nastane tioestrna vez in dobimo acetil CoA. S tem se poveže oksaloacetna kislina, da se odcepi CoA in nastane citronska kislina. Preko več zaporednih dekarboksilacij dobimo oksaloacetno kislino,  $\text{CO}_2$ , NADH,  $\text{FADH}_2$  in GTP.

NADH in  $\text{FADH}_2$  se prenesejo na elektronsko prenašalno verigo, v kateri se pri mikrobih prenašalci pojavljajo v različnih kombinacijah in vrstnih redih. Nekateri so čvrsto pripeti v membrane, drugi pa lahko difundirajo skozi membrano. Prvi prenašalec, ki sprejme vodik od NADH je NADH dehidrogenaza, ki elektrone prenese naprej na FLAVOPROTEINE. Ti se izmenično reducirajo in oksidirajo, nato pa prenesejo elektrone na Fe-S proteine. Do citokromov potem elektrone prenesejo KINONI (najpomembnejši je ubikinon ali koencim Q). Obstaja veliko različnih vrst citokromov, ki na koncu predajo elektrone terminalnemu akceptorju elektronov, ki se s tem reducira.

Med prehajanjem med prenašalci se  $\text{p}^+$  izrinjajo v zunanost in povzročijo nastanek protonske gibalne sile. Encim ATP sintaza nato protonsko gibalno silo pretvarja v ATP v procesu imenovanem OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA.

### **ANAEROBNA RESPIRACIJA**

Pri anaerobni respiraciji se na mesto kisika pojavljajo drugi terminalni elektronski akceptorji (odvisno, kaj je na razpolago). Nastaja manj energije, sistem za prenos elektronov pa je pri obligatornih anaerobih nekoliko drugačen. V okolje se izločajo različni produkti, ki lahko okolje kemijsko spreminjajo ali pa so celo vir za kemolitotrofne organizme.

Pri redukciji anorganskih snovi ločimo:

- Disimilativne procese – procesi anaerobnega dihanja, kjer se snovi izločajo v okolje (samo pri bakterijah)
- Asimilativne procese – procesi anaerobnega dihanja, pri katerem se molekule, ki nastajajo, porabijo v procesih anabolizma (bakterije, glive, evkarionti)

## REDUKCIJA NITRATA

V okolju je favorizirana.

## REDUKCIJA SULFATA

## METANOGENEZA, ACETOGENEZA

- **KAKO LAHKO PROKARIONTI V ANAEROBNEM OKOLJU PRIDOBIVAJO ENERGIJO? KAKO NASTAJA ATP?**
- **KOMPONENTE SISTEMA ZA PRENOS ELEKTRONOV**
- **PROTONSKA GIBALNA SILA IN OKSIDATIVNA FOSFORILACIJA**
- **OPIŠI REVERZNI TOK ELEKTRONOV IN ZAKAJ JE POTREBEN?**
- **ZAKAJ LAHKO REČEMO, DA STA PROTONSKA GIBALNA SILA IN ATP RAZLIČNI ENERGETSKI OBLIKI, KI LAHKO PREHAJATA ENA V DRUGO?**
- **KAKO TRANSPORT ELEKTRONOV PREKO PRENAŠALNIH PROTEINOV POVZROČI PROTONSKO GIBALNO SILO?**
- **KATERA STRUKTURA V CELICI PREVEDE PROTONSKO GIBALNO SILO V ATP?**
- **NASTAJANJE IN FUNKCIJA ATP PRI BAKTERIJAH**
- **BAKTERIJSKA FIKSACIJA OGLJIKA**
- **KAJ JE VIR C PRI AVTOTROFNIH ORGANIZMIH?**
- **POMEN KISIKA KOT TERMINALNEGA AKCEPTORJA ELEKTRONOV ZA AEROBNE IN ANAEROBNE BAKTERIJE**
- **ZAKAJ SE PRI AEROBNI RESPIRACIJI SPROSTI VEČ ENERGIJE KOT PRI DENITRIFIKACIJI?**
- **PRIMERJAJ NITRIFIKACIJO IN DENITRIFIKACIJO KAR SE TIČE VPLETENOSTI MIKROBOV, POGOJEV V OKOLJU, KI FAVORIZIRAJO POSAMEZEN PROCES IN SPREMEMBE V DOSTOPNOSTI HRANIV, KI SPREMLJAJO POSAMEZEN PROCES**
- **KOLIKO MOLEKUL CO<sub>2</sub> IN H<sub>2</sub> SE SPROSTI NA PORABLJEN ACETAT MED CIKLOM CITRONSKE KISLINE?**
- **KATERI SKUPNI VLOGI IMATA GLIKOLIZA IN CIKEL CITRONSKE KISLINE?**
- **ZAKAJ LAHKO MED GLIKOLIZO NASTANE 8 ATP MED FERMENTACIJO PA SAMO 2?**
- **KOLIKO ATP NASTANE MED CIKLUSOM CITRONSKE KISLINE?**
  
- **EKOLOGIJA**
- **KAJ JE MIKROBNI HABITAT?**
- **RAZLOŽI POJME POPULACIJA, HABITAT, ZDRUŽBA, EKOSISTEM**
- **KATERI PARAMETRI DEFINIRAJO NIŠO POSAMEZNEGA MIKROORGANIZMA?**
- **KAKO MIKROBI SPREMINJAJAJO KEMIJSKE IN FIZIKALNE**

## **KARAKTERISTIKE OKOLJA?**

- **KAJ JE KOMETABOLIZEM? NAVEDI PRIMER.**
- **BAKTERIJSKI BIOFILMI - NASTANEK IN POMEN V ZDRAVSTVU IN TEHNOLOGIJI**
- **BAKTERIJSKI BIOFILMI - NASTANEK IN POMEN V NARAVI**
- **MIKROBNE ODEJE**
- **FIKSACIJA DUŠIKA**
- **EKOLOGIJA FOTOSINTETSKIH BAKTERIJ**
- **METODE ZA UGOTAVLJANJE BIODIVERZITETE MIKROORGANIZMOV V NARAVI**
- **METODE ZA UGOTAVLJANJE VELIKOSTI BAKTERIJSKE POPULACIJE V NARAVI**
- **PRIMERJAJ RAST BAKTERIJ V LABORATORIJU IN V NARAVI**
- **EKOLOŠKE MERITVE MIKROBNE AKTIVNOSTI Z RADIOIZOTOPI**
- **KATERE SO GLAVNE PREDNOSTI METOD, KI TEMELJIJO NA UPORABI RADIOIZOTOPOV, ZA DOLOČANJE MIKROBNE AKTIVNOSTI? KAKŠNO VRSTO KONTROLE JE POTREBNO VKLJUČITI V POSKUS INKORPORACIJE  $^{14}\text{CO}_2$  PRI FOTOTROFNIH BAKTERIJAH ALI PA REDUKCIJE  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  PRI SULFAT REDUCIRAJOČIH BAKTERIJAH?**
- **KAKO NAM LAHKO SESTAVA OZ. RAZMERJE  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  V NEKI SNOVI POVE ALI JE SNOV BIOLOŠKEGA ALI NEBIOLOŠKEGA IZVORA?**
- **ZAKAJ SO SULFIDI PO IZVORU IZ MESECA PO IZOTOPSKI SESTAVI TEŽKI?**
- **OPIŠI PRINCIP DELOVANJA FISH METODE**
- **OPIŠI UPORABO FLUORESCENTNIH BARVIL ZA DOLOČITEV ŠTEVILA IN VRSTNE SESTAVE MIKROORGANIZMOV V NARAVNEM VZORCU**
- **ALI JE DOLOČANJE POPULACIJE MIKROORGANIZMOV Z OLIGONUKLEOTIDNIMI SONDAMI ENAKO NATANČNO KOT GOJENJE MIKROORGANIZMOV V LABORATORIJU? KAKŠNE SO PREDNOSTI IN POMANKLJIVOSTI TE METODE V PRIMERJAVI Z GOJENJEM?**
- **MERITVE Z MIKROELEKTRODAMI**
- **LASERSKA PINCETA - OPIS IN NAČIN UPORABE**
- **OBOGATITVENA KULTURA - PRINCIP IN PRIMER**
- **BAKTERIJE V RUDARSTVU**
- **KAJ JE BIOGEOKEMIJSKI CIKLUS ELEMENTA V NARAVI?**
- **RAZLIKA MED MINERALNIMI TLEMI IN ORGANSKIMI TLEMI**
- **ZAKAJ LAHKO IZ ISTEGA TALNEGA VZORCA IZOLIRAMO OBLIGATNO ANAEROBNE BAKTERIJE KOT TUDI AEROBNE BAKTERIJE?**
- **OPIŠI PRINCIP KOLONE PO WINOGRADSKEM. ZA OBOGATITEV KATERIH MIKROORGANIZMOV JO PREDVSEM UPORABLJAMO?**
- **KAKO LAHKO UPORABIMO WINOGRADSKI KOLONO ZA PROUČEVANJE RAZGRADNJE KSENOBIOTIKOV?**
- **KAJ SO KSENOBIOTIKI IN ZAKAJ JIH MIKROORGANIZMI VEČINOMA TEŽKO RAZGRAJUJEJO?**

## **RAST MIKROORGANIZMOV**

### **• DEFINIRAJ MIKROBNO RAST**

Bakterijske celice rastejo le do določene velikosti, nato pa se delijo. Zato bakterije ne rastejo v velikost, temveč bolj v število.

### **• KAJ JE BINARNA FISIJA?**

Binarna fisija je način delitve bakterijskih celic. Kromosom se pripne na membrano in se podvoji, hkrati pa se začne tvorba septuma – nastajata nova celična stena in membrana. Pri binarni fisiji nastaneta genetsko enaki hčerinski celici – kloni.

### **• ZAKAJ SE MORA BAKTERIJSKI KROMOSOM PODVOJITI PRED BINARNO FISIJO?**

Kromosom se mora podvojiti, zato da hčerinski celici prejmeta vsaka svoj kromosom. Replikacija poteka pred delitvijo, da celica zagotovi pravilno podvojen kromosom in da lahko v vsako nastajajočo celico razporedi eno kopijo kromosoma.

### **• HITROST RASTI MIKROORGANIZMOV**

Meri se v spremembi števila celic oz. celične mase na časovno enoto. Rast mikrobov je eksponentna.

### **• DEFINIRAJ GENERACIJSKI ČAS**

Generacijski čas je čas, ki ga potrebuje celica ali celotna populacija, da se podvoji.

### **• RASTNI CIKLUS BAKTERIJSKE POPULACIJE V ZAPRTEM SISTEMU**

V zaprtem sistemu ločimo 4 faze rasti. Prva t.i. LAG faza je faza v kateri se celice prilagajajo na novo gojišče in se zato še ne delijo. V eksponentni fazi se prične intenzivna rast celic in intenzivno podvojevanje, zato se število celic hitro večja. Eksponentna faza preide v stacionarno, ko je število celic v okolju maksimalno, zato se število celic ne spreminja več. Stacionarna faza nastopi zaradi pomanjkanja hranil, kopičenja toksičnih metabolitov v okolju, zmanjka kisika ipd. Zadnja faza je faza odmiranja, ko se začne število celic hitro manjšati.

### **• KDAJ OBIČAJNO NE PRIDE DO LAG FAZE?**

Do LAG faze ne pride, če celice prenesemo na enako gojišče, kot je bilo prejšnje in se zato celice ne rabijo prilagajati.

### **• V KATERIH EKSTREMNIH OKOLJIH ŽIVIJO PROKARIONTI? KAKO PRIDOBIVAJO ENERGIJO?**

Mikroorganizmi naseljujejo skoraj vse ekološke niše. Živijo v izjemno vročih okoljih (termofili, hipertermofili), pri nizkih temperaturah (psihrofili), pri nizkem in visokem pH-ju (acidofili, alkalofili), pri visokem tlaku (barofili) in nizki vodni aktivnosti (osmofili, kserofili).

Mikroorganizmi pridobivajo energijo s kemotrofijo ali fototrofijo.

### **• FIZIKALNOKEMIJSKI POGOJI, KI VPLIVAJO NA RAST MIKROORGANIZMOV**

Na rast mikroorganizmov vpliva temperatura, pH, tlak, vodna aktivnost in prisotnost oz. odsotnost kisika. Seveda na rast vplivajo tudi hranilne snovi (makro in mikronutrienti ter elementi v sledovih).

### **• VPLIV DEJAVNIKOV OKOLJA NA RAST MIKROORGANIZMOV – TEMPERATURA**

Temperatura vpliva na makromolekule v celici (proteini npr. pri visoki temperaturi denaturirajo, prav tako nukleinske kisline), zato morajo imeti le-te prilagojene na posebne temperature. Membrane pri visokih temperaturah postajajo preveč fluidne, pri nizkih pa rigidne, zato transport čez membrano ni več mogoč. Prilagoditev membrane se dogaja predvsem na ravni nasičenosti in

dolžine maščobnih kislin.

- **V ČEM SE HIPERTERMOFILNI MIKROORGANIZEM RAZLIKUJE OD PSIHROFILA?**

Hipertermofilni mikroorganizmi imajo encime, ki najbolje delujejo pri visokih temperaturah, psihrofili pa encimi z optimumom pri nizkih temperaturah. Hipertermofili imajo v membranah več nasičenih maščobnih kislin, arheje tudi fitanil, psihrofili pa več nenasičenih, da povečajo fluidnost membran.

- **KATERE SO PRIBLIŽNE KARDINALNE TOČKE PSIHROFILOV, MEZOFILOV, TERMOFILOV IN HIPERTERMOFILOV?**

Kardinalne točke so optimum, minimum in maksimum.

Psihrofili: opt. = 10°C, min. = -10°C, max. = 20°C

Mezofili: opt. = 20-40°C, min. = 10°C, max. = 45°C

Termofili: opt. = 60°C, min. = 25°C, max. = 80°C

Hipertermofili: opt. = 80°C, min. = 65°C, max. = 118°C

- **V KATERIH OKOLJIH LAHKO PRIČAKUJEMO PSIHROFILE? KAKŠEN JE NJIHOV BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL?**

Psihrofile lahko najdemo na dnu oceanov, na Arktiki in Antarktiki, v hladilniku in v gorah. Njihova proučevanje pomagajo pri procesih zamrzovanja v živilski industriji.

- **KAKO SE PSIHROTOLERANTEN ORGANIZEM RAZLIKUJE OD PSIHROFILNEGA?**

Psihrofili imajo optimum rasti pri nizkih temperaturah, medtem ko so psihrotoleranti pri nizkih temperaturah zgolj sposobni preživeti, ker imajo širši temperaturni obseg, ki jim še omogoča preživetje.

- **V KATERIH OKOLJIH LAHKO PRIČAKUJEMO TERMOFILE IN HIPERTERMOFILE? KAKŠEN JE NJIHOV BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL?**

Termofile najdemo v tleh, v kompostu, hipertermofile pa v vročih vrelih, fumarolah, podmorskih vročih vrelih ...

V biotehnologiji so zanimivi predvsem encimi teh organizmov, saj delujejo tudi pri zelo visokih temperaturah. S pomočjo teh encimov bi lahko dvignili delovne temperature nekaterih postopkov.

- **STRUKTURNE PRILAGODITVE MEMBRAN HIPERTERMOFILNIH ARHEJ**

- **PRILAGODITVE HIPERTERMOFILOV NA PROTEINSKEM NIVOJU**

- **V KATERIH OKOLJIH LAHKO PRIČAKUJEMO BAROFILE?**

- **MOLEKULARNE PRILAGODITVE BAROFILNIH MKROBOV**

- **SIMBIOZA MED BAKTERIJAMI IN G. POGONOPHORA**

- **ADAPTACIJE MIKROORGANIZMOV NA RAST V VELIKIH MORSKIH GLOBINAH, OB TEKTONSKIH ŠPRANJAH IZ KATERIH IZHAJA MAGMA**

- **VPLIV NIZKEGA OZ. VIŠKEGA PH OKOLJA NA RAST MIKROORGANIZMOV. NAŠTEJ NEKAJ TIPIČNIH HABITATOV**

- **HELIOCOBACTER PYLORI**

- **VPLIV VODNE AKTIVNOSTI OKOLJA NA RAST MIKROORGANIZMOV. NAŠTEJ NEKAJ TIPIČNIH HABITATOV**

- **KOMPATIBILNI TOPLJENCI V CELICAH - KATERE TIPE POZNAMO IN ZAKAJ SO POTREBNI?**

- TOKSIČNI RADIKALI KISIKA IN ENCIMI, KI JIH INAKTIVIRAJO
- BAKTERIJE IN NJIHOV ODNOS DO KISIKA
- KAKO SUPEROKSID DIZMUTAZA ŠČITI CELICO?

## KAJ MORAJO VSEBOVATI GOJIŠČA ZA GOJENJE MIKROORGANIZMOV V LABORATORIJSKIH RAZMERAH?

Za rast mikroorganizmov so potrebni:

- Makronutrienti: C, H, N, O, P, S
- Mikronutrienti: K, Na, Mg, Fe, Ca
- Elementi v sledovih: Mn, Zn, Co, Cu, Mo
- Rastni faktorji: aminokislina, vitamini, purini, pirimidini

Mikronutrienti so potrebni v majhnih a pomembnih količinah in so udeleženi kot kofaktorji v številnih encimih in celičnih strukturah.

Ločimo kompleksna ali nedefinirana gojišča, kjer ne poznamo natančne sestave gojišča, vendar vseeno vsebuje vsa hranila, ki jih celice potrebujejo in definirana gojišča, ki pa vsebujejo točno določene koncentracije čistih kemikalij. Gojenje mikrobov na definiranim gojišču je lahko zelo zahtevno, saj nekateri (npr. mlečnokislinske bakterije) potrebujejo tudi do 60 različnih sestavin. Količino kemikalij v gojišču izračunamo z numerično-statističnimi računalniškimi analizami.

## OGLJIK

Ogljik predstavlja okoli 50% celice, saj se v celici uporablja kot gradbeni element in kot vir energije. V naravi ga avtotrofni organizmi dobivajo kot CO<sub>2</sub>, heterotrofni pa iz aminokislina, sladkorjev, maščobnih kislin, dušikovih baz ...

V gojišča ga dodajamo v obliki glukoze, malata, acetata, piruvata, kvasnega ekstrakta ali peptona. V industrijske namene mora biti vir cenovno ugoden, saj je potreben v velikih količinah: melasa, sirotka, odpadna celuloza, CSL ...

## DUŠIK

V celici ga je med 12 in 15%, saj je sestavni del proteinov, nukleinskih kislin, peptidoglikana ipd. V naravi je omejujoč faktor. Organski vir so aminokislina in nukleinske kisline.

V gojišča ga lahko dodajamo v anorganski obliki kot NH<sub>2</sub>Cl, KNO<sub>3</sub>, prepričovanjem gojišča z N<sub>2</sub> ali v organski obliki kot sečnino, aminokislina, dušikove baze ...

V industrijski proizvodnji ga dodajamo v obliki CSL, sojine, kostne moke ...

## VODIK IN KISIK

V celice prihaja predvsem z vodo. V definirano gojišče moramo dodajati destilirano vodo, pri aerobnih organizmih pa moramo gojišče še prezračevati.

## FOSFOR

V celici je sestavni del nukleinskih kislin in fosfolipidov. V naravi ga celice pridobivajo v

anorganski obliki kot  $\text{PO}_4^{3-}$  ali v organski obliki kot organski fosfati.  
V gojišče ga dodajamo v obliki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ali  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

## **ŽVEPLO**

V celici predstavlja gradnike pri nekaterih aminokislinah (cistein, metionin) in pri vitaminih (tiamin, biotin, koencim A). V naravi ga mikrobi pridobivajo v obliki sulfata, vodikovega sulfida ali v obliki kovinskih sulfidov.

V gojišče ga dodajamo v obliki  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  in  $\text{Na}_2\text{S}$ .

V industrijska gojišča ga dodajamo v obliki cisteina in jajčnih emulgatov.

## **KALIJ**

V celici je potreben kot kofaktor v številnih encimih, ki sodelujejo pri sintezi beljakovin, halofilne arheje pa ga potrebujejo tudi za uravnavanje turgorja. V naravi je v anorganski obliki dostopen kot K v raztopini ali v K soleh.

V gojišče ga dodajamo kot KCl in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

## **MAGNEZIJ**

V celici stabilizira ribosome, membrane in nukleinske kisline. Vpliva tudi na aktivnost encimov, ki prenašajo fosfat, pri  $G^+$  bakterijah pa sodeluje pri sintezi endospore. V naravi se nahaja v anorganski obliki kot  $\text{Mg}^{2+}$  v raztopini.

V gojišče ga dodajamo v obliki  $\text{MgCl}_2$  in  $\text{MgSO}_4$ .

## **ŽELEZO**

V celici kot sestavni del citokromov in Fe-S proteinov sodeluje pri celičnem dihanju. V naravi se nahaja v anorganski netopni obliki, kot fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ali feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ter v železovih soleh.

V gojišče ga dodajamo v organski obliki kot pepton ali kvasni ekstrakt ali v anorganski obliki ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ).

## **NADZOR RASTI MIKROORGANIZMOV**

- **KAJ POMENI STERILNO? KAJ BI SE ZGODILO, ČE GOJIŠČA NE BI BILA STERILIZIRANA?**
- **FIZIKALNE METODE ZA NADZOR RASTI MIKROORGANIZMOV**
- **KEMIJSKE METODE ZA NADZOR RASTI MIKROORGANIZMOV**
- **RAZLOŽI POJME STERILIZACIJA, DEZINFEKCIJA IN PASTERIZACIJA**
- **RAZLOŽI RAZLIKO MED DEZINFEKTANTOM IN ANTISEPTIKOM IN NAŠTEJ NEKAJ PRIMEROV**
- **STERILIZACIJA S TOPLOTO - MEHANIZEM DELOVANJA**
- **STERILIZACIJA Z IONIZIRAJOČIM SEVANJEM IN KATERE VIRE UPORABLJAMO**
- **TIPI FILTROV, KI SE UPORABLJAJO ZA STERILIZACIJO**



- **MERJENJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**
- **RAZLOŽI POJME BAKTERIOCIDEN, BAKTERIOSTATIČEN IN BAKTERIOLITIČEN AGENS**
- **RASTNI ANALOGI - PRINCIP DELOVANJA IN PRIMER**
- **BIOKEMIJSKE OSNOVE POGlavITNIH TIPOV REZISTENCE PROTI ANTIBIOTIKOM**
- **GENETSKE OSNOVE POGlavITNIH TIPOV REZISTENCE PROTI ANTIBIOTIKOM**
- **PRENOS REZISTENCE ZA ANTIBIOTIKE**
- **KAKŠEN NAJ BI BIL IDEALEN ANTIBIOTIK?**
- **MEHANIZMI DELOVANJA POGlavITNIH SKUPIN ANTIBIOTIKOV**
- **DELOVANJE BETA LAKTAMSKIH ANTIBIOTIKOV**
- **DELOVANJE GLIKOZIDNIH ANTIBIOTIKOV**
- **ANTIBIOTIKI, KI ZAVIRAJO SINTEZO CELIČNE STENE**
- **RAZLOŽI RAZLIKO MED ŠIROKOSPEKTRALNIM IN OZKOSPEKTRALNIM ANTIBIOTIKOM IN NAVEDI PRIMER**
- **NADZOR RASTI VIRUSOV**
- **ZAKAJ NE POZNAME ANTIVIRUSNIH ANTIBIOTIKOV?**
- **INTERFERONI**
- **ZAKAJ OBSTAJA LE MALO KLINIČNO USPEŠNIH ANTIGLIVNIH ANTIBIOTIKOV?**

## VIRUSI

Virusi po nekaterih značilnostih ustrezajo definiciji živega, po drugih pa spet ne. Znaki življenja so razmnoževanje (v celicah), prenos določenih značilnosti naslednjim generacijam (dedovanje), razvoj in izpopolnjevanje po naravni selekciji (mutacije), imajo podobne agregate kot druge žive celice in RNA ali DNA.

Od živih celic se razlikujejo po tem, da so zunaj celice metabolno inertni, njihovo razmnoževanje je popolnoma odvisno od gostiteljske celice, imajo tudi preprosto acelularno zgradbo in le eno izmed nukleinskih kislin. Poleg naštetega se virus nikoli ne giblje sam temveč samo pasivno, pri čemer je stik z gostiteljsko celico naključen.

## ZGRADBA VIRUSOV

Virusi so zgrajene iz nukleinske kisline (DNA ali RNA) in beljakovinske kapside, lahko pa vsebuje še ovojnico iz lipidnega sloja. Kompleksni virusi – bakteriofagi imajo na kapsido pripet še vrat z bazalno ploščo in repnimi filamentami.

### KAPSIDA

Virusna kapsida je sestavljena iz ponavljajočih se podenot ene ali več vrst proteinskih molekul, ki se imenujejo kapsomere. Kapsomere imajo zmožnost samosestavljanja in zaradi nekovalentne povezanosti zlahka razpadejo. Kapsido kodira le nekaj genov. Skupaj z nukleinskimi kislinami tvori nukleokapsido.

Kapsida je lahko ikozaedrična, ki je prostorsko najvarčnejša oblika. Sestavljena je iz 20 enakostraničnih trikotnikov. Kapsomere sestavljajo 3 pentamere in 9 heksamer, ki so sestavljene iz protomere. Ikozaedrična kapsida ima kroglasto simetrijo.

Druga oblika kapside je paličasta ali nitasta kapsida, ki je sestavljena iz protomere heliks, ki v vijačnico spletejo tudi nukleinsko kislino in ima vijačno simetrijo.

Nekateri virusi imajo na kapsidi še lipidno ovojnico, ki jo privzamejo med brstenjem iz gostiteljske celice. Če je ovojnica vezana na kapsido, imajo virusi stalno obliko, v nasprotnem primeru so pleomorfni.

### KOMPLEKSNI VIRUSI - BAKTERIOFAGI

Kompleksni virusi se pojavljajo samo med bakteriofagi. Imajo glavo, ki je ikozaedrična, lahko pokrita z ovojnico ali ne, repni filament, ki ima vijačno simetrijo in bazalno ploščo, na katero so pripeti repni filamentami. Z njimi se virus pripne na gostiteljsko celico.

Bakteriofag je virus, ki napada bakterijske celice. Večinoma imajo kompleksno zgradbo, v celico pa injicirajo samo nukleinsko kislino (kapsida in ostali deli ostanejo zunaj celice). Označujemo jih z imenom glavnega gostitelja, ki mu dodamo še črko in številko (alfanumerično) – npr. T4 E. Coli.

### VIRUSNE NUKLEINSKE KISLINE

Virusi se delijo v DNA in RNA viruse. Nukleinska kislina je lahko linearna ali krožna. Eni ali drugi lahko imajo enojno (ss) ali dvojno (ds) vijačnico, ki je lahko orientirana pozitivno ali negativno. Pozitivna orientacija pomeni, da je nukleinska kislina zavita v isto smer kot mRNA. Nukleinske kisline imajo lahko nase vezane tudi polipeptide ali aminokisline. Geni se med seboj prekrivajo, tako da mutacije na enem mestu lahko povzročijo mutacije večih genov. Pri nekaterih

virusi (npr. pri HIV) je nukleinska kislina segmentirana v več molekul.  
Virus z ss RNA + se lahko direktno uporabi kot mRNA pri transkripciji.  
Virus z ss RNA – se najprej prepíše v komplementarno verigo +.  
Virus z ds RNA + ali – deluje kot DNA in se v mRNA prepíše le ena veriga.  
Virus z ss DNA + ali – se najprej podvoji v dvojno verigo in nato deluje normalno kot DNA.  
Virus z ds DNA + deluje kot normalna DNA.  
Virusi ss RNA + (retrovirusi) delujejo po principu reverzne transkripcije. RNA se najprej prepíše v DNA z od RNA odvisno transkriptazo. Ko nastane DNA se RNA razgradi.

Virus preusmeri metabolizem gostiteljske celice v izgradnjo novih virusnih komponent (nukleinske kisline, kapside). Lizogeni virusi se vključijo v genom celice in ne povzročajo nobenih vidnejših sprememb, lahko pa prinesejo nov dedni material od prejšnjega gostitelja (transdukcija) in celica dobi nove lastnosti.

## **RAZLIKA MED VIRUSOM IN PLAZMIDOM**

Virus ima nukleinsko kislino spravljeno znotraj kapside, medtem ko je plazmid le ekstrakromosomski genski element in nima izvencelične oblike. Plazmid za celico ni škodljiv, virusna nukleinska kislina v celici pa je za celico uničujoča.

## **PROFAG**

Profag (temperirani fag) je genom bakteriofaga, ki se je vključil v DNA bakterije. To je latentna oblika virusa, ki v takem stanju celici ne povzroča škode. Po indukciji profaga, ki jo lahko sprožijo določena temperatura, UV sevanje, kemikalije ipd. gre virus skozi litični cikel in se sprosti iz celice.

### **• ZAKAJ VIRUSI LAHKO OKUŽIJO LE SPECIFIČNE CELICE?**

Če ima virus na površini enega ali več proteinov, ki delujejo na principu specifične vezave na receptorje, se lahko tak virus veže samo na specifične celice, ki te receptorje imajo. Receptorji so lahko proteini, polisaharidi ali lipoproteinski-polisaharidni kompleksi.

### **• UČINKI VIRUSNE INFEKCIJE NA GOSTITELJSKO CELICO**

Smrt celic se zgodi zaradi same lize celice, inhibicije gostiteljeve DNA ali sinteze proteinov, zaradi poškodbe (prelomov) kromosomov ... Učinki so lahko tudi nevidni, ker gre za spremembe v funkcijah gostiteljske celice (potuhnjeni virusi).

### **• PRIMERJAJ PRIPENJANJE KOMPLEKSNIH VIRUSOV (FAGOV) IN ŽIVALSKIH VIRUSOV**

Fagi se na bakterijsko celico (na pilus, flagele ali sestavine celične ovojnice) pripnejo s pomočjo repnih filamentov, z lizocimom razgradijo celično steno, nato pa v celico injicirajo samo nukleinsko kislino. Živalski virusi lahko v celico prav tako prehajajo preko specifičnih receptorjev, lahko pa kar pasivno in nespecifično s fagocitozo. Pri živalskih virusih ta vedno vstopi v celico cel, kapsida pa se potem s pomočjo gostiteljske celice razgradi.

### **• KAJ SE DOGAJA V POSAMEZNI FAZI REPLIKACIJSKEGA CIKLA ŽIVALSKEGA VIRUSA OZ. BAKTERIOFAGA?**

Najprej poteče specifična ali nespecifična adsorbcija na površju celice – virus se torej pripne na celico. Potem poteče penetracija celega virusa (živalska celica) ali zgolj njegove nukleinske kisline (bakterija). Takoj ko virusna nukleinska kislina vstopi v celico, se najprej prepíšejo

zgodnji virusni proteini oz. del nukleinske kisline, ki sodeluje pri prepisovanju. Sledi biosinteza ali eklipsa, pri čemer je gostitelj metabolizem preusmerjen v izdelavo novih virusnih komponent. Po dozorevanju virusov (sestavljanju kapsomer ipd.) sledi brstenje virusov iz celice ali sprostitvev virusov z lizo celice.

- **KAJ DEFINIRA LATENTNO OBDOBJE?**

Virusna nukleinska kislina je vključena v bakterijski genom, zato kliničnih znakov okužbe ne moremo opaziti.

- **KAJ DEFINIRA EKLIPSO?**

Eklipsa je del liznega cikla, v katerem nastajajo nove virusne komponente.

- **KATERE VRSTE ENCIMOV VSEBUJEJO VIRUSI?**

Vsebujejo nekaj encimov, ki so povezani s prepisovanjem (npr. DNA oz. RNA polimerazo), encime za vstop v celico (npr. lizocime, nevraminidaze), retrovirusi še reverzno transkriptazo ipd.

- **KOLIKO ENCIMOV VSEBUJEJO VIRUSI?**

Virusni genom kodira od 3 pa do 100 proteinov (encimov).

- **KAKŠNE SO GLAVNE LASTNOSTI RETROVIRUSOV?**

Vsebujejo encim reverzno transkriptazo, ki sodeluje pri reverzni transkripciji – prepisu ss RNA + v DNA in šele nato v mRNA. So prva skupina virusov, za katere so ugotovili, da so lahko onkogeni (rakotvorni). So kompleksni, veliki in imajo nekaj lastnosti tako od RNA kot od DNA virusov. Evolucijsko gledano bi lahko bili pobegli transpozicijski elementi transpozoni.

- **KAJ POMENI “PREKRIVANJE GENOV” PRI VIRUSIH?**

Geni pri virusi se prekrivajo, kar pomeni, da se naslednji gen začne še v zapisu prejšnjega in je torej en nukleotid del različnih genov, le da je pomaknjen v drug bralni okvir. Prekrivanje genov omogoča hitrejše mutacije in je posledica varčevanja z informacijami.

- **KAJ JE ZNAČILNO ZA GENOM VIRUSA GRIPE? ZAKAJ JE TEŽKO PRIDOBITI USTREZNO CEPIVO PROTI GRIPI?**

Virus gripe spada v družino Orthomyxovirade in ima segmentiran genom. Pri virusih gripe je pogost antigenski preskok, kjer različni sevi virusov zamenjajo segment genoma, pri čemer nastane nov genotip z mešanico antigenov obeh izhodnih genotipov. Ker so antigenski preskoki pogosti, cepivo pa vsebuje protitelesa proti hemaglutininu, je težko predvideti, kakšna oblika virusa se bo pojavila v prihajajoči sezoni gripe. Drug razlog hitrih mutacij pa je tudi dejstvo, da so to RNA virusi, ki za prepisovanje potrebujejo RNA polimerazo, ki nima zmožnosti popravljanja napak, zato se mutacije ne odpravljajo sproti.

- **FUNCIJA RESTRIKCIJSKIH ENCIMOV V BAKTERIJSKIH CELICAH**

Restriksijski encimi v bakterijskih celicah omogočajo razrez virusne nukleinske kisline glede na specifične sekvence, ki jih prepoznajo. Lastno DNA zaščitijo z metiliranjem, tega ukrepa pa se poslužujejo tudi virusi, ki poleg metiliranja, nukleinsko kislino lahko tudi glikolizirajo ali pa vsebujejo celi inhibicijske proteine za restriktaze.

- **TEMPERIRANI BAKTERIJSKI VIRUSI - LIZOGENI CIKLUS**

Lizogenega ciklusa so sposobni samo bakteriofagi, tako da svoj genom v obliki profaga vključijo v genom bakterijske celice. Ta se potem podvaja skupaj z delitvami bakterijske celice in se tako prenaša na naslednje generacije. Represijski mehanizem preprečuje delovanje virusa in šele ko so ti inaktivirani virus lahko začne razmnoževanje in formacijo novih vironov, ki se sprostijo iz celice.

## **ONKOVIRUSI IN ONKOGENI**

Okoli 10-20% virusov je onkovirusov, kar pomeni, da lahko transformirajo celice do te mere, da z nekontroliranim množenjem celice nastajajo rakaste tvorbe. Vse celice vsebujejo protoonkogene – to so normalni geni, ki pa z mutacijo lahko postanejo onkogeni. Večina tako spremenjenih celic gre v proces apoptoze, včasih pa tudi ne. Mnogi onkogeni potrebujejo še dodaten agens za aktivacijo: mutagene kemikalije, UV, ionizacijski sevanje, mnoge pa aktivirajo tudi onkovirusi. Tumorji, ki nastanejo z nekontrolirano delitvijo celic (saj imajo te manj kompleksne hranilne zahteve) so lahko benigni (niso nevarni) ali maligni.

## **RASTLINSKI VIRUSI**

Rastlinski virusi so relativno slabo preučeni (skoraj samo na agronomskih rastlinah). Rastline so s celično steno precej dobro zaščitene pred virusi, vendar virusi vseeno najdejo mesto za vstop. Ko so enkrat v rastlini, se po njej gibajo pasivno s pomočjo floema.

## **TAKSONOMIJA VIRUSOV**

Stare definicije so bile simptomatske in zaradi prekrivanja simptomov pri različnih boleznih neustrezne. Nove definicije so deskriptivne (npr. HIV). Ločimo 73 družin virusov (višje taksonomske kategorije ni) glede na naravo gostitelja, značilnosti nukleinske kisline, simetrijo kapside ter premer in struktura kapsomer, glede na prisotnost ovojnice in občutljivost na eter, imunoloških lastnosti, lokacije virusne replikacije v celici ter glede na način prenosa in klinične znake, ki jih povzročajo.

## **GOJENJE ŽIVALSKIH VIRUSOV V LABORATORIJU**

Določene lahko gojimo samo v živih živalih, nekatere gojimo v embrijih v jajcih ali v organil (nova tehnologija). Pogosto je gojenje v tkivni kulturi (primarna ali permanentna celična linija).

- **PRIMERJAJ KOLONIJO IN PLAQUE**

Kolonija je populacija celic, ki nastane iz ene same materinske celice in je vidna s prostim očesom.

Plaque ali razbistritev je čistina v bakterijski kulturi, ki nastane kot posledica lize celic zaradi delovanja virusa.

- **KAJ JE “PLAQUE FORMING UNIT”?**

S številom razbistritev lahko kvantificiramo viruse. Z njo opredelimo tudi infektivnost virusa.

## **VIROIDI**

Viroidi so zelo infektivni delci v obliki kratkih, krožnih in dvovijačnih RNA molekul, ki so rezistentne proti nukleazam. Nimajo proteinske kapside, nukleinska kislina pa kodira le 1 do 2 majhna proteina. Povzročajo bolezen krompirja.

## **VIRUSOIDI**

Virusoidi so satelitne molekule RNA v kapsidah nekaterih virusov. Strukturno so podobni viroidom, vendar niso infektivni. Replikirajo se skupaj s preostalim virusom.

## **PRIONI**

Prioni so infektivni delci, ki jih sestavlja le protein (iz okoli 250 aminokislin). Organizem vsebuje DNA za zapis proteina, ki je podoben prionu. Prion v gostiteljski celici modificira te proteine v sebi enake – to je način razmnoževanja prionov.

Sicer pa prioni povzročajo nekatere počasi napredujoče bolezni osrednjega živčevja pri ljudeh in živalih (dedna nespečnost, kuru, Kreutzfeld-Jakobova bolezen ...).

## **INTERFERONI**

So proteini, ki jih proizvajajo in sproščajo limfociti kot odgovor na prisotnost patogena (virus, bakterija ...). Interferoni so gostiteljsko specifični (npr. v živalskih celicah te sproščajo alfa, beta in gama levkociti in fibroblasti). Nastanejo po infekciji z malo virulentnimi virusi in jih onesposobijo, tako da preprečujejo sintezo virusne nukleinske kisline in proteinov. Vendar so virusi razvili številne mehanizme, da se izognejo delovanju interferonov.