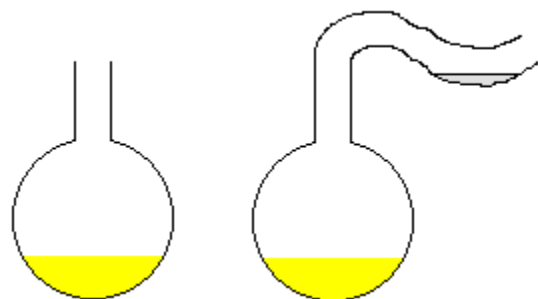


Literatura:

- M.T.Madigan, J.M.Martinko, J.Parker (2003), **Brock Biology of microorganisms**, 10th edition, Prentice Hall
 - G.J.Tortora, B.R.Funke, C.L.Case (2004), **Microbiology, an introduction**, 8th edition, The Benjamin Cummings Publishing Company
 - Skripta: M.Legiša, M.Benčina (2002) **Vaje iz mikrobiologije**
-

Zgodovina mikrobiologije

V antiki in srednjem veku, se ljudje še niso zavedali, da obstajajo v njihovi okolici in njih samih mikroorganizmi (MO). So jih pa uporabljali v prid sebi, pri izdelavi raznih jedi in pijač (vino, sir, kis, ...). Na kitajskem so ugotovili da osebe, ki so veliko časa preživele z obolenimi za črnimi kozami, so si pridobile imunost na črne koze. Prašiči, so imeli podobno bolezen črnih koz. Iz njih so vzeli hraste, jih posušili in zmleli. Ta prah so dali osebam, katere so kasneje okužili z črnimi kozami. Osebe so bile imune. Tiste čase je še med ljudmi obstajal zakon o spontanem obstoju bolezni in življenja. Pred zlato dobo mikrobiologije, je bila že postavljena teorija o nastanku celice. Robert Kuch, kateri je z mikroskopom, povsod, kjer je gledal, našel podobne škatličaste strukture – celice. Za njim je bil Levenhuk, ki je bil brusilec stekla. Tako je tudi sam izbrusil prve leče in naredil mikroskop, s katerim je kasneje prvi videl in opisal MO. Leta 1798 je Janer, zdravnik v Angliji, je opazil, da ljudje, ki imajo veliko opravka z govedmi ne zbolijo za boleznijo črnih koz. Tako je iz izcedka prašičjih ran pripravil cepivo, katerega je vbrizgal v sina. Od tod vakcinacija (vakca – krava, vakcinacija – pokravljenje). V prvi polovici 19. stoletja so z izpopolnjenimi mikroskopi že lahko opazovali MO. Leta 1835 je Baci opazil glive, kot parazite na sviloprejkah. Sviloprejke so bile takrat pomembna gospodarska panoga. Te glive, ki so se zaredile na njih, pa so povzročale izgube. Semelweis, madžar, je opazil da v bolnišnicah, v katerih imajo otroci otroško mrzlico, se ta bolezen hitro širi. Prenašalci so bili zdravniki, ker takrat še niso vedeli za razkuževanje. Semelweis je uvedel umivanje rok z raztopino solne kisline. Število obolenj se je zmanjšalo. Druga polovica 19. stoletja. Louis Pasteur, je bil kemik, ki je študiral nastanek vinske kisline. Zanimalo ga



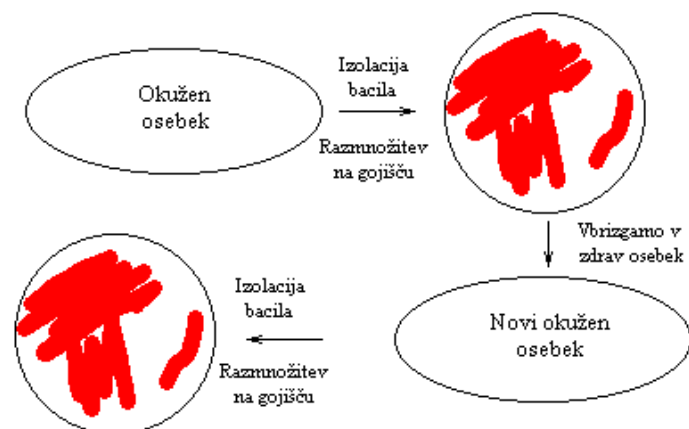
je tudi mnogo drugih stvari. Neki prijatelj ga je prosil, da naj dokaže da življenje ni spontano. Po tehtnem premisleku je pripravil v bučki bujon. To je voda, v kateri je bilo prekuhano meso in sol. Taka juha se je na zraku zelo hitro pokvarila. To se opazi če raztopina pomotni. Da se je to zgodilo, so morali od nekje priti MO. Prišli pa so lahko le iz zraka. Zato je za drug poskus pripravil

enako juho v bučko, s tem da je bučko zatalil v obliki črke S, juho pa prevrel, da jo je dezinficiral. Tako so MO, ki so prišli prej iz zraka v juho sedaj ostali na prvem zavoju, juha pa je ostala bistra tudi po štirinajstih dneh. Če je vsebino na prvem zavoju stresel v juho, je ta zelo hitro pomotnela. S tem je dokazal, da iz nič ne more nastati mikroorganizem. Kasneje se je odpravil na potovanja po različnih krajih sveta in opravljal enake poizkuse in dokazal, da je nekje več, nekje pa manj MO. S tem je dokončno ovrgel teorijo o spontanem nastanku bolezni. Pri ljudeh se je spremenila miselnost. Od takrat naprej so vedeli, da bolezen nastane, če se kdo okuži. To biogenezo je Pasteur postavil leta 1861. Uvedel je tudi sterilnost. Pri temperaturi 121°C odmrjejo vse oblike MO. To znanje je kasneje s pridom uporabil pri fermentaciji piva. Ko so slad piva zavreli, se je pivo pokvarilo, ker so z vretjem uničili dobre kvasovke, kasneje pa so se razvile tako imenovane divje kvasovke. Te divje kvasovke so fermentacijo piva peljale v napačno smer in zato se je pivo pokvarilo. Pasteur je pivo pregrel le do 60°C in ko se je to ohladilo, je vcepil novo kulturo kvasovk, ki so vodile fermentacijo v pravo smer. To se imenuje pasterizacija (1864). S tem uničimo mezofilne MO (to so MO, ki naseljujejo tudi naše telo kot tujki), notri pa

potem ostanejo samo MO, ki ne živijo pri sobni temperaturi pač pa pri temperaturi 37°C. Pozneje se je Pasteur lotil boleznimi sviloprejk. Svetoval je kmetom, da naj pregledajo samice in tiste ki so okužene, je treba zamenjati. Lotil se je tudi kolere. Vzel je kri mrtvega piščanca, ki je podlegel koleri in jo vbrizgal zdravemu piščancu. Zdravi piščanec je zbolel. Enkrat je pomotoma vzel kri, katera je pomotoma stala nekaj časa v laboratoriju. Ko je to kri vbrizgal piščancu je ta kazal vse znake bolezni, vendar je preživel. Nato je nadaljeval poskuse in ko mu je zmanjkalo piščancev, je začel uporabljati piščance, kateri so preživele eno cepljenje. Ugotovil je, da so imuni. Lotil se je tudi antraksa (antracis). Ta je nevaren samo za tiste živali, ki jedo travo, ker je bakterija prisotna normalno v zemlji. Poskus: vzel je oslabljen bacil, s katero je okužil čredo ovac in kasneje jih je okužil s serumom in te ovce so preživele. Te svoje preparate je pošiljal okoli kmetom, a so nekatere črede še vedno umirale. Preparat je poslal Robertu Kochu, kateri ga je opozoril, da je vzorec onesnažen. Poleg celic je še mnogo drugih dejavnikov prisotnih. Slava pa se mu je dvignila, ko je razvil cepivo za steklino. Inkubacijska doba za steklino je 2 meseca. K njemu je prišla mati otroka, katerega je ugriznil stekel pes. Prosila ga je naj mu pomaga. Pasteur je imel na voljo 2 meseca časa. Dečku je vbrizgal v telo oslabljen virus, kar je omogočilo telesu, da je ustvarilo imunost. Tako so začeli ljudje hoditi k njemu na zdravljenje. S tem je spremenil miselnost ljudi in dokončno ovrgetel misel o spontanosti bolezni. Bolezni se da ozdraviti s cepljenjem. Po Pasteurju je bil Charles Darwin, ki je napisal knjigo leta 1859 o razvoju nastanka vrst. Robert Koch je bil nemški zdravnik, ki je proučeval antraks. Uspelo mu je izolirati bacillus anthracis in ga gojiti zunaj osebka. Naredil je veliko poskusov, da je našel gojišče. Najprej je poskušal z bujoni, kasneje pa z trdim gojiščem. Uporabljal je rezine krompirja, katere je prekuhal. Na koncu mu je uspelo izpopolniti vse skupaj in naredil je želatino, katera je imela tališče nad 50°C. Današnji agar pa ima tališče nad 45°C. Tako je določil čiste kulture in postavil teorijo **klice**. Iz okužene živali je izoliral bacil, ga na gojišču razmnožil in s tem je zopet okužil zdravo žival. Iz te na novo okužene živali je zopet vzel bacil in ga razmnožil na gojišču. Če sta bili obe gojišči enaki, potem je ta bolezen infekcijska (če izpolnjuje te 4 pogoje). Leta 1876 so bila zaključena Kochova raziskovanja antraksa.

Neiser (1879) – opisal je povzročitelja govedoreje. Koch pa je nadaljeval z iskanjem povzročitelja tuberkuloze (*Mycobacterium tuberculosis*) in kolere (*Vibrio cholerae*).

Lister (1867) je prvi uvedel aseptično kirurgijo. Za razkužilo je uvedel fenol in s tem zmanjšal smrtnost.



molekule kot npr. H₂S.

Metchnikoff (1884) je v krvi opazil celice, ki so sposobne potovati na mesto infekcije. Tam pa požrejo bakterije. To je bil začetek imunske teorije. Prvi je opisal fagocitozo.

Ivanovski (1892) Ugotovil je prisotnost virusov.

Winogradsky (1829) je ugotovil, da ne uporabljajo virusi ravno ogljikove spojine za vir energije, lahko uporabljajo tudi anorganske

Leta 1893 so ugotovili, da lahko nekatere živali prenašajo bolezni(klopi). Opisali so babezozo in zoonozo.

Reed (1900) je opisal rumeno mrzlico. Zaradi nje je umrlo veliko ljudi, prenašajo pa jo komarji.

Bijerinsk (1899) je opisal virus tobačnega mozaika. Ni vedel, da je virus, ker ga ni videl, zato je govoril o topni obliki MO. Odstranil jih je s filtracijo.

Konec 19. stoletja se je razvijala kemijska industrija in s tem tudi razvoj barvil za MO. Ehrlich (1910) je stestiral veliko barvil in našel enega, kateri je vseboval arzenov derivat, vezalo pa se je na samo na bakterijo sifilisa (salvarzan). Pri vezavi ni uničilo človeških celic. Pojavil se je prvi kemoterapevtik (salvarzan).

Fleming (1928) opisal penicilin. Opazil je plesni penicilium, ki preprečujejo rast bakterij. To je razvoj β -laktamskih antibiotikov.

Waksman (1944) je odkril straktomicin, ki je bil uspešen za zdravljenje tuberkuloze. Od leta 1950 dalje govorimo o dobi antibiotikov.

Metabolizem:

Beijernick (1889) je opisal, da določene bakterije lahko vežejo dušik iz atmosfere.

Vinogradsky (1892) – nekatere bakterije lahko uporabljajo za vir energije anorganske molekule.

Kluyver in Donker (1926) sta ugotovila, da gre pri metabolizmu za prenos elektronov, ki niso prosti, pač pa so vezani na atom vodika.

1920-1940 so bile opisane vse metabolne poti

Krebs (1937) je opisal krebsov cikel.

Mitchell (1959) je postavil kemoozmatko teorijo.

Virusi:

Rous (1911) virusi povzročajo lahko tudi raka pri piščancih.

Twort, d'Hervelle (1915-17) ugotovila sta, da virusi lahko napadejo tudi bakterije.

Stanley, Nortrup, Surner (1935) so kristalizirali virus. Zaradi tega so predpostavili, da je iz proteinov.

Kulg (1982) je določil strukturo tega virusa

Enders, Weller, Robbins (1949) viruse lahko gojimo na človeških tkivnih kulturah

Hershey, Chase (1952) za razmnoževanje virusov ni potreben protein, pač pa DNA.

Temin, Baltimore (1970) so odkrili reverzno transkriptazo

Montainegre, Gallo (1983) so izolirali virus HIV

Molekularna biologija:

Griffith (1928) zdravnik, ki je delal poskuse s streptokoki in mišmi. Imel je dva seva streptokokov (dve pasmi, vrsti). Eni so povzročali bolezen, drugi pa ne. Če je miška okužil z virulentnimi streptokoki je miška umrla. Če jo je okužil z ne-virulentnimi streptokoki, je miška preživela. Če pa je naredil mešanico streptokokov, je miška umrla. Ugotovil je, da virulentni vplivajo na ne virulentne in jih naredijo virulentne.

Lederberg, Tatum (1946) gre za proces transformacije DNA. Dna enega streptokoka (virulentnega) je vstopila v drugega.

Beandle, Tatum (1941) postavila teorijo o prvem delu proteinov

Arrey, Maclead, McCarty (1944) nukleinske kisline so tista substanca, ki nosi informacijo.

Lederberg, Zinder (1952) prenos bakterije iz ene v drugo celico.

Watson, Crick, Wiliins (1953) DNA

Brenner, Jacob, Meselson (1961) odkritje m-RNA, proteini se sintetizirajo na ribosomih

Nierenberg, Matthael, Khoran (1965) ugotovili, kaj določa zgradbo proteina in določili s poskušanjem genski kod. Razumevanje prenosa dedne informacije.

Nothans, Smith, Arber (1971) restikcijski encimi, ki režejo dna, pojavijo se začetki genskega inženiringa

Bery, Boyen, Cohen (1973) so postavili temelje genskega inženiringa.

Gilbert, Sanger (1977) sta prvič sekvenirala celotni dendi material organizma

1980 je doba moderne molekularne biologije

Woese (1977) 16S identifikacija dna

Meclintock (1983) odkril transfezone

Bishop, Varmus (1989) sta opisala onkogene – povzročitelji raka

Venter, Smith Fraser (1995) mikrob influence sekveniran do konca.

Mikroorganizmi

So tisto prosto živeči organizmi, ki so na nivoju ene same celice sposobni izvajati vse osnovne življenjske funkcije. To so rast, sproščanje energije, reprodukcija,...

Celica je osnovna enota vsakega živega sveta. Od okolja jo loči celična membrana, ki loči zunanost od notranosti. Prisotna je jederna regija, ki je nosilec informacij za dedovanje in delovanje. Vse celice vsebujejo nukleinske kisline, proteine, polisaharide. Ta skupna sesava pa kaže na skupnega prednika.

Preko evolucije je prišlo do varijacije, tako da so nukleinske kisline, proteini prisotni še vedno pri vseh celicah. Celica je odprt dinamičen sistem, ki ostaja vedno enak.

Kaj loči celico od okolja?

- vse celice so sposobne samostojnega hranjenja, imajo svoj metabolizem, sprejemajo kemikalije iz okolja, jih predelujejo in izločajo izrabljene snovi.
- gre za samostojno replikacijo in rast. Pri tem se podvaja najprej dedna snov, nato pa še organeli. Potrebna je kontrola teh podvojitvev, nato pa se tvori še celica.
- Diferenciacija – pri mikrobnih celicah samo na nivoju ene celice, pride do spremembe delovanja celice. Te so povezane z različnimi cikli.
- Sposobnost komuniciranja s pomočjo kemijskih signalov. Tu je pojav teksija – pomeni, da celice, ki prejmejo nek signal, se lahko potem gibajo proti izvoru tega signala. Zmožne so tudi medsebojne komunikacije (ena celica prestreže signal in ga posreduje drugi).
- Celice se lahko spreminjajo. Prihaja do mutacij. Te mutacije pa omogočijo mikroorganizmom da lahko naselijo vse prostore na zemlji in takrat govorimo o evoluciji.

Vesolje teži k večjemu neredu (entropija narašča). V tem neredu so atomi in molekule popolnoma naključno porazdeljeni. Če pogledamo celico je obratno kakor pri vesolju. Če hočemo, da celica obstaja, morajo molekule biti organizirane. Žive celice presegajo naključno urejeno stanje, ki vlada v vesolju. Biološki sistemi niso v ravnovesju z okoljem. Celica je odprt sistem, kamor vstopa energija iz okolice za vzdrževanje tega reda.

Bistvena za delovanje je tudi celična struktura (membrana). Podvojevanje celice je možno samo iz že obstoječe celice. Struktura je izredno pomembna za delovanje celice, če pride do napake v strukturi, potem celica propade.

Sestava celice na atomskem nivoju se razlikuje od sestave okolja. V celici se pretežno nahajajo ogljik, dušik, vodik, kisik, fosfor in žveplo, medtem ko se v zemeljski skorji nahajajo predvsem silikati, magnezij, natrij in kalcij.

Kako so nastale prve celice?

Verjetnost je izredno majhna. Trajalo je milijarde let, da se je vzpostavila prva celica.

Na celico imamo danes dvojni pogled:

- kemijski stroj (metabolizem, razgradnja molekul, sinteza molekul, sproščanje energije (nosilci teh reakcij so encimi))
 - kodirni stroj, ki nosi zapis in podatke za kontrolo za vse te reakcije v celici.
-

Molekula m-RNA je tista, ki je bila prvotni nosilec informacij in delovale so tudi kot encimi. Iz RNA so se ustvarjali proteini in kasneje se je pojavila tudi DNA. DNA je bila bolj stabilna in z tem bolj primerna za shranjevanje informacije.

Vse te celice, so bile podvržene rasti, evoluciji, podvajanju. Pri podvajanju celice se najprej podvoji DNA in šele nato ostala celica. Podvajanje DNA poteka bolj natančno, ker so DNA polimeraze bolj natančne kot RNA polimeraze. To pomeni da DNA polimeraza dela manj napak pri podvajanju. Te napake pa pomenijo nastanek mutacij, ki onemogočijo preživetje mikroorganizmov. Mutacij je več tipov. Imamo take mutacije, ki nimajo bistvenega vpliva na delovanje in take, ki imajo večji vpliv. Če pride do boljšega delovanja encima, potem pride do naravne selekcije tega mikroorganizma in to je glavno gibalno evolucije. Tako lahko potem mikroorganizmi naselijo vse zemeljske niše.

Genski pogtencial bakterije *E.Coli*:

- 4700 kbp
- 4272 genov
- 3000 kodirnih genov
- stalno ima prisotnih 1900 proteinov, ne glede na koncentracijo (za ostale gene ne vemo kakšne proteine lahko sintetizirajo in kakšen je njihov pomen).
- 2,4 milijona proteinskih molekul

Minimalno število genov je 300-200 za obstoj ene same celice. S temi proteini bi celica lahko sintetizirala osnovne strukture za življenje.

Pri evkarjontih se nahaja 1000x več DNA in genov, kot pri prokarjontih, kar je povezano z evolucijo.

Razlike med evkarjontsko in prokarjontsko celico

Kateri mikroorganizmi so prokarjonti in kateri so evkarjonti?

Med prokarjonte štejemo bakterije in arheje. Med evkarjonte pa alge, praživali (protozoa) in glive (fungi).

Oblika prokarjontov:

Pri njih imamo enolično morfologijo. V glavnem imamo samo par tipičnih oblik:

- koki, sferična oblika, so okrogle
- paličaste, vse bakterije iz rodu bacillus so paličaste bakterije. Pri nekaterih, se te krajše združujejo v daljše, ki potem preidejo v nitke. To so filamentozne ali nitaste bakterije. Predstavniki so streptomicete. Ti dvoji(koki in paličaste) se lahko povezujejo v 2D ali 3D strukturo. 3D so kolonije, katere so karakteristične za posamezno vrsto. Kljub temu, da gre za kolonije, deluje vsaka celica zase.
- Spiralno zaviti paličaste bakterije ali spirili. Če se te bolj pogosto navijejo, so to spirohete. Nekatere imajo priveske, kar pomeni, da niso enakomerno oblikovane, pač pa imajo neki izraste, kateri jim služi za pritjevanje.

Glede velikosti so bakterijske celice bistveno manjše kot evkarjontske celice. Normalno so velikosti od 1 do 3 mikronov. Za primer *E.Coli* ima premer 2 mikrona. Zaradi te majhnosti jih je tudi težko opazovati pod svetlobnim mikroskopom. Ekstremi so veliki 0,1 mikron, to so najmanjše bakterijske celice, po drugi strani pa so lahko

nekatero ciano bakterije lahko velike tudi do pol milimetra. Velikost evkarjontskih celic je v povprečju med 5 in 10 mikroni, ekstremi pa so od 2 do 200 mikronov.

Kaj predstavlja ta razlika v velikosti za celico? Predvsem gre tu za razmerje med velikostjo in volumnom celice. Pri majhnih celicah je to razmerje večje, pri večjih celicah pa je to razmerje manjše. To veliko razmerje omogoča hitrejši vstop hranilnih snovi in ostalih substanc v celico in omogoča hitrejši metabolizem. Zaradi tega vzroka bakterijske celice hitreje rastejo. E.Coli se lahko podvoji v 20 minutah, pri evkarjotih pa je to 1-2h.

Celična membrana, plazmalema ali plazemska membrana

Plazmalema predstavlja mejo med zunanostjo in notranostjo celic. Kar se nahaja zunaj celice je neživo, kar je znotraj celice je živo. Membrane so debele približno 8nm in predstavljajo selektivno bariero med zunanostjo in notranostjo. Določene snovi gredo lahko skozi, določene pa ne. Skozi membrano lahko vstopajo z določenimi transportnimi mehanizmi, kjer gre lahko za olajšano difuzijo – na podlagi razlike v koncentracijah, lahko pa gre za skupinsko translokacijo. Te substance, ki vstopajo v celico se kemijsko spremenijo. Tipičen primer je vstop glukoze v bakterijsko celico. Pri vstopu se glukoza fosforilira (se kemijsko spremeni). Tretji tip prehoda je aktivni transport. Določene molekule ravno tako lahko vstopajo v celico preko proteinskih prenašalcev, vendar se pri tem porablja energija (ATP).

Kemijsko gledano, so membrane fosfolipidni dvosloj. Fosfolipid je sestavljen iz glicerolne molekule, na katero so vezane dve maščobni kislini in ena fosfatna skupina. Maščobne kisline so obrnjene proti notranji strani membrane in predstavljajo hidrofoben del. Dve skupini takih molekul tvorijo bilejer ali dvosloj. V membrane so vgrajeni tudi določeni proteini, kateri jih lahko prebadajo ali pa so samo vgrajeni in so samo noti ali samo zunaj. Membrane so dejansko tekoče strukture, v katerih ti proteini prosto plavajo. Pri evkarjontih se v membrani nahajajo tudi steroli, kateri so rigidne molekule in ojačajo membrane. Zaradi prisotnosti sterolov, so evkarjonti večji kot prokarjonti. Pri arhejah je situacija nekoliko drugačna. Ti so zelo arhajični mikroorganizmi, kateri se tekom evolucije niso bistveno spreminjali in naseljujejo najbolj odročne pokrajine tega sveta. Zakaj se tekom evolucije niso spreminjale? Vzrok tiči v razvoju zemlje. Ko se je zemeljska skorja ohlajala in ko se je voda začela kondenzirati, je bilo na zemlji okoli 75°C. Takrat so se pojavile arheje. Te imajo v lipidih namesto esterskih vezi med glicerolom in maščobnimi kislinami eterske vezi. Namesto maščobnih kislin je prisoten izopren. Monomera izoprena se lahko povezuje v dolgo razvejano molekulo. Te se lahko zopet povezujejo z glicerolom in tvorijo glicerol dieter. V nekaterih primerih pride do povezave teh izoprenskih molekul z glicerolom. To je diglicerolni tetraeter. Potem lahko ena sama taka molekula tvori membrano, takrat imamo fosfolipidne enosloje, kateri imajo drugačne lastnosti kot dvosloj. Ti so bolj obstojni na višje temperature, zato potem lahko arheje naseljujejo taka ekstremna področja, kot so toplotni vrelni,...

Vsi mikroorganizmi imajo celične stene. Te predstavljajo zunanjo zaščito in dajejo celici oporo, zato je to tudi ekso-skelet. Ta je bolj očiten pri rastlinskih celicah. Bistvena je razlika med evkarjontsko in prokarjontsko celično steno. Pri prokarjontski celični steni poznamo dva tipa. Najprej je Gram ugotovil, da se celične stene razlikujejo po barvanju in da se drugače obarvajo, če jih barvamo z barvali kristal violetom in safraninom. Tako razdelimo vse bakterije na gram pozitivne in gram negativne bakterije. Gram pozitivne se z to metodo barvajo in gram negativne se s to metodo ne barvajo. Kar se obarva je peptidoglokan. Gram pozitivne bakterije imajo

debelo steno peptidoglikana na zunanji strani. Pri gram negativnih bakterijah, pa imamo zelo tanko plast peptidoglikana, kateri je potem še obdan z dvoslojem in tako dodatno zaščiten pred tem, da bi barvilo prišlo do njega. Za peptidoglikan je starejše ime murein. To je najbolj rigidni del celične stene in daje celicam tisto odpornost. Osnovni gradbeni element je glikotetrapeptid, kateri je sestavljen iz N-acetilglukozamina in N-acetilmuronske kisline. Povezana sta med sabo z β 1,4 vezjo. Na mureinsko kislino so vezane aminokislino (alanin, D-alanin, glutaminska kislina, lizin ali diamino pimelinska kislina (to je prekursor pri sintezi lizina)). Tej štiri ostanki tvorijo tetrapeptid. Ta pa je z drugimi molekulami povezan še z vmesnimi mostički, sam glikan pa je povezan v dolgo verigo. Tako da imamo osnovno os kjer so N-acetilglukozamin in N-acetilmuronska kislina. Med temi so potem še druge vezi, ki to strukturo stabilizirajo. Tu lahko sodelujejo aspartat, lizin in treonin. V peptidoglikan je lahko vcepljena tekoča kislina. Ta je nek kisli polisaharid, kateri daje negativni naboj celotni površini bakterijske celice. Glicerol ali inositol fosfatni ostanki, so vgrajeni v ta sklop. Lipotične kisline pritrjujejo celotni sloj peptidoglikana na površino. Pri arheji imamo parakristalinični sloj, kjer so prisotne molekule sulfata in to je tako imenovan S sloj. Tu imamo določene proteine (glikoproteine) v določeni simetriji (haksagonalni simetriji). Pri metanogenih arhejah (tiste ki izločajo glikan) imamo enako prisoten N-acetilglukozamin, namesto N-acetilmuronske kisline imamo N-acetil talozaminuronično kislino. Nikoli ni pimelinske kisline (prekursor lizina) ampak je vedno lizin. Nekatere arheje so brez psevdo peptidoglikana tu so prisotni glikoproteini ali proteini.

Pri gram negativnih bakterijah imamo za plazmalemo tanek sloj peptidoglikana, ki je tanjši, na zunanji strani pa imamo še eno membrano, ki ima svoje značilnosti. Ta del ima dva dela. Na zgornjem delu so tako imenovani polisaharidi skorje in čisto na vrhu so o-polisaharidi. Ta polisaharidna plast je pritrjena v membrano z lipidom A. Spodaj je lipoprotein, ki zunanji dvosloj pritrjuje na peptidoglikan. V zunanji membrani so posebne proteinske strukture. To so porini, ki omogočajo nemoten pretok snovi v periplazmatsko režo, kjer se lahko nahajajo določeni encimi, določeni receptorji. Periplazmatski prostor je vedno prostor pri vseh organizmih med celično membrano in celično steno. Ta lipopolisaharidna plast je izredno toksična (zunanji del membrane). Ob razpadu bakterij povzroča nastanek endotoksinov, ki lahko zmotijo človeški metabolizem. Če smo okuženi z gram negativnimi bakterijami (salmonela), lahko ta propad bakterije povzroči hude okvare v našem metabolizmu. Če gre za hudo infekcijo povzroči ta infekcija smrt. Infekcija z gram negativnimi bakterijami je včasih vprašljiva, če se jo splača zdraviti z antibiotiki (ker sprostimo endotoksine v kri).

Evkarjontska celična stena, ki jo najdemo pri glivah, rastlina

Gre za prisotnost celuloze. Ti ostanki so povezani z β 1,4 glikozidno vezjo, lahko imamo tudi hemi celulozo. Celuloza je izredno težko razgradljiva, škrob pa je lahko razgradljiv (ima α 1,4 vezi). Kot taka je celuloza precej rigidna. Poleg celuloze in hemi celuloze je lahko še pektin (galakturonska kislina je monomer). Pri glivah je tudi hitin (polimer kjer je monomer N-acetilglukozamin). Pri nekaterih algah lahko dobimo še nekatere ksilane, malane, fucinske kisline. Nekatere alge lahko anorganske snovi odlagajo v teh celičnih stenah (silikati). To so diatomejske alge.

Pri bakterijah imamo tako imenovane flabele (bičke) ki so drugače sestavljeni kot bički pri evkarjontih. Omogočajo gibanje celicam. To je približno 20nm debela

struktura in ni viden pod svetlobnim mikroskopom. Bički so lahko različno porazdeljeni po površini celic. Lahko jim imamo okoli cele celice. Struktura bička (polarno flabiliran) je sestavljena iz flavilina. To so proteinske molekule, ki tvorijo to strukturo bička ki gleda ven iz celice. Na dnu bička imamo nekakšen pritrjevalni mehanizem, ki pritrji biček v peptidoglikan in v plazmalemo. Biček je ukrivljena struktura, kateremu krivine se ne da spreminjati, lahko pa se vrtili okoli svoje osi. Pri evkarjontih pa se ta rkvina oz. kot lahko spreminja. V predelu plazmaleme je par proteinskih molekul ki tvorijo motor bička. Ta motor poganja protonski koncentracijski gradient. Za en obrat bička je potrebnih tisoč protonov. To je ekvivalentno 330 ATP-jem. Hitrost samih bakterij je prav zavirljiva. V eni sekundi lahko naredi 50 do 60 svojih dolžin. To je bistveno več kot lahko naredi najhitrejša žival. Gepart lahko naredi 25 svojih dolžin v 1s.

Kdaj bakterija potrebuje biček?

Pri kemotaksiji. Bakterija lahko prepozna prisotnost določenih snov v okolici in če gre za pozitivno kemotaksičnost, bo bakterija plavala proti večji koncentraciji snov. Snovi, ki privlačijo bakterijo so antaktanti, snovi, ki odbijajo bakterijo so referenti.

Kakšni so flageli pri evkarjontih?

So cilije ali migetalke so krajše, struktura je podobna, biček ali flagela pa je daljši. V tem primeru imamo dva samostojna tubulna, okoli pa je devet mikrotubulov. Zraven je še ena molekula dineina, ki deluje kot ATP-aza. To se nadaljuje v samo celico, kjer je bazalno telesce, tu pa ni teh centralnih mikrotubulov. Pri parameciju imamo od 10000 do 15000 cilij na površini.

Obstaja tudi ameboidno gibanje. To je možno samo takrat, ko je celica pritrjena na trdo podlago. Ustvarja se citoplazemski tok, pri katerem citoplazma prehaja iz sol stanja v gel. Ustvarijo se psevdopodije s katerimi se mikroorganizem premika oz. leze po podlagi. Pri pretakanju teh struktur po celici sodeluje aktin.

Pri nekaterih bakterijah se nahajajo še nekateri drugi izrastki, kateri se imenujejo pili in ne sodelujejo pri gibanju. So proteinske strukture, ki so podobne bičkom, ampak so krajše. Služijo predvsem za pritrjevanje na podlago. Pili pa so velikokrat receptorji za bakteriofage. Preko teh pilov lahko molekula nukleinske kisline preide iz ene v drugo. Veliko bakterij lahko naredi okoli svoje celice glikokaliks (sluzast ovoj). Tu gre predvsem za polisaharide in velikokrat ti služijo za pritrjevanje bakterijskih celic na podlago. V inkluzijskih telescih bakterije služijo rezervne snovi. Enako je z polihidroksi butiratom, kateri je pri bakteriji alkaligns. Podobno strukturo ima kot plastične mase. Danes lahko določene plastične mase pridobivamo iz polihidroksi butiorata, ki so razgradljive. Bakterije ga uporabljajo kot zalogo energije. Pri drugih pa so ta zaloga glikogen, polisulfate (zaloga sulfatov) celo elementarno žveplo, nekatere lahko iz njega pridobivajo energijo (kromatipn, vedžetoo). Značilnosti nekaterih bakterij so plinski vezikli. Predvsem pri cianobakterijah. To so vodni mikroorganizmi, ki so sposobni fotosinteze. Te imajo te mehurčke, ki omogočajo lebdenje v vodi in ti povzročijo cvetenje jezer. Velikost veziklov je relativno majhna 300-700nm. Tipično je da so ločeni od citosola s proteinsko membrano in ne z fosfolipidnim dvoslojem. Nekaterne bakterije lahko tvorijo endospore. Te so pri rodu bacillus. So zelo odporne na visoko temperaturo in šele 121 stopinj jih uniči. Sinteza teh endospor je komplicirana. Značilna je dipikolisnka kislina.

DNA pri prokarjontih ni ločena z membrano od ostalega dela. Pri bakterijah je DNA skoraj vedno v obliki cirkularnega dela. Raztegnjena DNA pri E.Coli ima 4000 kbp, raztegnjena struktura pa je velika le 1mm. V bakteriji je ta struktura super zvita

molekula in je tako velika samo 2 nm. Pri bakterijah imamo določene proteine, ki to zvitje strukture kontrolirajo. Pri E.Coli jih imamo petdeset takih struktur. Poleg teh molekul imamo lahko še plazmide. Pri evkarjontih je 1000x več DNA kot pri prokarjontih. Pri evkarjotnih imamo jedro in imamo nukleus, ki je bogat z m-RNA. Tu se sintetizira tudi velika in majhna podenota ribosomov, združujejo pa se v samem citosolu. Na nivoju genov imamo introne (nekodirajoče) in eksone (kodirajoče regije). Prilagoditev oz. izrezovanje tega se izvrši na m-RNA. Kromosomi so stabilizirani s histoni, ki se povežejo na molekulo DNA in omogočijo pravilno zvijanje te molekule. Pri E.Coli imamo en sam kromosom. Delitev celice je pri evkarjotnih drugačna kot pri prokarjontih. Imamo mikrotubule, ki sodelujejo pri tvorbi delitvenega vretena. Kromosomi velikokrat nastopajo v diploidnem stanju. Poleg teh osnovnih struktur, najdemo pri evkarjontih različne organele (kloroplaste,...).

Mikrobna rast

Za bakterijsko celico je značilno, da je potrebno za podvojitev dva tisoč različnih kemijskih procesov. Najprej se podvoji DNA, nato se razdelijo kromosomi in na koncu pride do binarne fizije. Velja, da iz ene celice dobimo dve celice. Pri virusih lahko nastane iz enega samega virusa več sto.

Rastna hitrost je sprememba števila celic na hitrostno enoto. Generacijski čas je, ko se količina bio-mase podvoji. Te časi so zelo relativni. Pri prokarjontih so krajši, pri evkarjontih so daljši. Tako se npr. *E.Coli* podvoji v 20 minutah, glivine celice pa se podvojijo v šestih urah pri optimalnih pogojih. *Tuberkolosis* ima npr. generacijski čas 12 ur.

Rastna krivulja, ki velja za zaprti sistem:



V fazi lag se v začetku, ko damo celico na gojišče ne dogaja nič. Kasneje, ko celica zazna, kje je, začne rasti, ampak zelo počasi.

V drugi fazi, je rast celici eksponencialna. Zato se ta faza tudi imenuje eksponencialna faza ali trofofaza. Tu se začne optimalna sinteza proteinov, DNA molekul,...

Rastni parametri

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

N_0 ... začetno število celic

n ... število generacij

če zgornjo enačbo logaritmiramo in preračunamo, dobimo

$$n = 3,3 \cdot (\log N - \log N_0)$$

n ... naklon premice na semilogaritemskem grafu

$$\text{Generacijski čas } g = \frac{t}{n}$$

Primer:

$$N = 10^8 \quad N_0 = 5 \cdot 10^7 \quad t = 24$$

$$n = 3,3 \cdot (\log(10^8) - \log(5 \cdot 10^7)) =$$

$$3,3 \cdot (8 - 7,96) = 3,3 \cdot (0,301) = 1$$

$$\text{Generacijski čas } g = \frac{t}{n} = \frac{24}{1} = 24 \text{ h}$$

Konstanta hitrosti rasti:

$$k = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,693}{g} \left[\frac{1}{h} \right]$$

k ... število generacij na določeno časovno enoto

V zaprtem sistemu prej ali slej zmanjka hranila in rast celic se ustavi. Pri tem preidemo v stacionarno fazo ali idio fazo, kjer je število celic konstantno. Pri nekaterih mikrobih se v tej stopnji začnejo izločati sekundarni metaboliti (antibiotiki), ki omogočajo mikrobu preživetje v borbi za življenje (v teh kriznih situacijah). Pri bakterijah se v tej fazi začno tvoriti spore. Pri *E.Coli* pride do kritične rasti. Aktivirajo

se SUR geni (survive = preživetje), ki ji omogočajo preživetje v teh izrednih situacijah.

Zadnja faza je faza odmiranja. Po določenem času v stacionarni fazi celice začno odmirati. Odmiranje je hitrejše od rasti. Je eksponencialna. Ni pa tako hitro odmiranje, kot je hitra rast v eksponentni fazi. Tu pride do lize celice. Celica sama sebe razgradi. Če govorimo o zaprtem sistemu, govorimo o šaržni rasti. Pri tej rasti ne dotekajo nova hranila. Sestava gojišča se med rastjo zaradi porabe hranila in izločanja snovi stalno spreminjajo. Koncentracija hranil vpliva na hitrost rasti, zraven pa vpliva tudi na rastni prinos (izkoristek). Če imamo gojišče z nizko koncentracijo hranil, potem lahko vplivamo z spremembo koncentracije hranila na hitrost rasti. Če pa imamo koncentracijo zadosti veliko, potem več ne vplivamo na hitrost rasti, ker imamo maksimalno hitrost.

Kot nasprotje zaprtemu sistemu je odprti sistemu. Pri tem sistemu gojišče stalno meamo, dodajamo novo hranilo in odvajamo odvečno hranilo. Volumen gojišča je pri tem konstanten. To delamo v kemostatu.

$$D = \frac{F}{V}$$

D ... je hitrost razredčevanja

F ... hitrost pretoka

$$\frac{dX}{dt} = kX \quad \text{diferencialna enačba rasti}$$

$$\frac{dX}{dt} = kX - DX \quad \text{enačba rasti v kemostatu}$$

V začetku je $k > D$. takrat imamo stanje ravnovesja $k = D$, $\frac{dX}{dt} = 0$

$$D_c = k_{\max} \cdot \left(\frac{S_R}{R_S - S_R} \right)$$

D_c .. kritična hitrost redčenja

S_R ... koncentracija hranila v rezervoarju

R_S ... koncentracija hranila, kjer je $k = \frac{1}{2} k_{\max}$

Če povečamo pretok hranila, začne mikroorganizem hitreje rasti, pri tem se generacijski čas zmanjša. Če jo zmanjšamo, se hitrost rasti mikroorganizma zmanjša. Če hitrost pretoka hranila preveč povečamo, začnemo mikroorganizem spirati iz kemostata. Število mikroorganizmov v kemostatu se začne zmanjševati.

Rast in sinteza makromolekul

Če imamo uravnoteženo rast, se v tem sistemu vsi celični elementi sintetizirajo z relativno enako hitrostjo. To je v ekponencialni rasti.

Če imamo pri mikroorganizmu neuravnoteženo rast, gre najprej za spremembo hitrosti sinteze RNA, ribosomov, sledi pa še sprememba v sintezi DNA in proteinov. Hitrost sinteze proteinov je vedno konstantna. To velja, če prenašamo mikroorganizme iz enega gojišča v drugo, pri čemer mikroorganizme najprej prepoznati gojišče in snovi v njem.

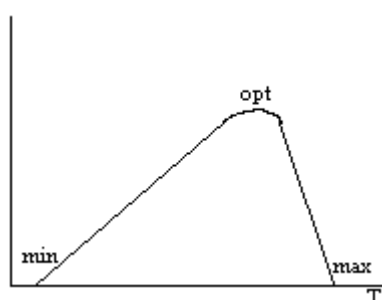
Če vzamemo mikroorganizem iz eksponencialne rasti in ga damo v novo vendar enako gojišče, se faza, v kateri je mikroorganizem ne spremeni. Se pravi, da je še vedno v ekponencialni rasti.

Če npr. *E.Coli* vzamemo iz gojišča brez fosfata in damo v gojišče z fosfatom se pojavi indukcija osemdesetih genov. Ti se začnejo podvojevati v m-RNA ta pa naprej. Pri dušiku je enako, samo da se tu izrazi 40 genov.

V laboratoriju lahko gojimo zelo malo mikroorganizmov:

- 0,001 – 0,01% morskih mikroorganizmov
- 0,25% sladkovodnih mikroorganizmov
- 0,3% zemeljskih mikroorganizmov
- 1-15% mikroorganizmov iz oživiljenega blata (blato iz čistilnih naprav)

Rastne krivulje, so pri optimalnih pogojih, katerih v naravi ni. Vsi mikroorganizmi se nahajajo v stacionarni fazi. Včasih, ko so pogoji boljši, preidejo začasno v eksponentno rast. Mikroorganizmi so zelo variabilni, zato tudi lahko naseljujejo večino zemeljskih niš. Odnos mikroorganizmov do različnih temperatur:



Kardinalne temperature so minimum, maksimum in optimalna temperatura. Minimum je pri mikroorganizmih vezan na fluidnost membrane. Maksimum je vezan na denaturacijo proteinov. Normalni razpon med minimumom in maksimumom je 30 – 40°C. To velja za vse ostale organizme. Pri mikrobih razdelimo to na štiri skupine:

- min pod 0°C, max ~ 20°C, to so psihofilni m.o.
- min 12°C, max 45°C opt od 30-38°C, to so mezofilni m.o.
- min 40-45°C, max 65-70°C, opt ~ 60°C to so termofilni m.o.
- T > 65 °C opt ~ 100 °C ali več (največ do sedaj znana je 113°C) so hipertermofilni

Psihofilni mikroorganizmi so v naravi predvsem v polarnem svetu (na snegu). Nekateri m.o. živijo pri -30°C, ampak si morajo izločati metabolite (glicerol), da spremenijo ledišče vode. Nekateri pa živijo tudi pri - 140°C. Te lahko zamrznemo z N₂. poleg teh imamo tudi psihotolerantne mikroorganizme. Te preživijo nižje temperature, jih pa ne ljubijo. Optimalna temperatura za njih je 30°C. V membranah psihofilnih mikroorganizmov imamo veliko nenasičenih maščobnih kislin, ki omogočajo fluidnost membran. Mezofilni mikroorganizmi imajo optimalno temperaturo pri 30 – 40 °C. Vsi patogeni mikroorganizmi, ki nas napadajo, so mezofilni. Ti ne preživijo temperature 70°C in zato so živila (mleko, sokovi,...) pasterizirana. Pri termofilnih mikroorganizmih imamo več nenasičenih maščobnih kislin, katere jim omogočajo večjo stabilnost membran pri višjih temperaturah. Pri njih so tudi proteini drugačni (so krajši,...). Če se pri proteinu spremeni ena aminokislina, pride lahko do večje obstojnosti pri višji temperaturi. V membranah pa se nahajajo molekule diglicerol etra, kateri tvori monosloj.

Optimalne temperature organizmov	Zgornja meja
Ribe in vodni vretenčarji	38°C
Žuželke	47°C
Raki	49°C
Višje rastline	
Mahovi	45°C

Evkarjontski mo	50°C
Protozoa	
Alge	56°C
Glive	57°C
Prokarjonti	61°C
Bakterije	
- Cianobakterije	72°C
- kemoorganotrofne bakterije	90°C
Arheje	
- hipertermofili metanogeni	110°C
- žveplovi hipertermofili	113°C

Če gledamo to tabelo, je tako potekal razvoj od spodaj navzgor.

Za kaj so hipertermofilni mo uporabni?

Če DNA segrejemo na 90°C, se dvojna vijačnica razpre. Potem to zmes ohladimo na 70°C, kjer uporabimo tag-polimerazo. Ta mora biti obstojna pri tej temperaturi.

Kislost

pH je negativni logaritem H^+ ionov. Večinoma so mo nevtrofili. To pomeni, da uspevajo v pH 5-9. Acidofilni mo so rajši v bolj kislo okolju (nekatero glive). Mikrobi pa lahko funkcionirajo, če je citosolni pH=7. Nad pH 7 imamo alkalofilne mo. To so predvsem bakterije, katere imajo rade pH 10-11.

Vodna aktivnost

Je razmerje med parnim pritiskom, ki je v ravnotežju z snovjo v raztopini in pralnim pritiskom vode pri enaki temperaturi. Vodno aktivnost podamo v skali, ki ima vrednost od 0 do 1. V zemlji imamo vodni potencial 0,9-1, v morju pa 0,88. Ta razlika onemogoči živeti slanovodnim organizmom v sladki vodi.

Osmotski pritisk

Število raztopljenih delcev na določen volumen.

Difuzija je prehod snovi skozi membrano iz mesta z višjo koncentracijo, na mesto z nižjo koncentracijo. MO se prilagodi na okolje z nižjo aktivnostjo tako, da poveča osmotski tlak. Kako to naredi? Začne sintetizirati ozno regulatorje, ki so nizko molekularne interne substance, ki lahko dosežejo koncentracijo do 100mM. Take molekule so glicero, nekatere aminokislino (pro, glu) in poliol (sorbitol, ribitol, manitol), trehalozo, saharozo. To spremembo aktivnosti s pridom uporabimo pri vlaganju, sušenju (tu zmanjšamo aktivnost in mo težje uspevajo).

Kako mikroorganizme delimo glede na vodno aktivnost?

Pri morski vodi so halotolerantni mikroorganizmi (to so tisti, ki lahko živijo v višjih koncentracijah soli, lahko živijo v sladki in slani vodi). Halofilni mo pa nujno potrebujejo za življenje Na^+ ione, tako da lahko živijo le v morski vodi. Ekstremni halofili živijo v zelo velikih koncentracijah soli (npr. v solinah). Sorodni so osmofili, ki lahko rastejo pri povečani koncentraciji sladkorja in še kserofili, ki lahko živijo v bolj sušnih območjih (pjuščava).

Kisik

Je pomemben kemijski element. Pojavil se je izredno pozno. Pojavil se je kasneje kot končni produkt cianobakterij. Vsi mikrobi so bili do razvoja kisika anaerobni. Danes delimo mo v več skupin:

- aerobni (nujno rabijo kisik)
- obligatni anaerobi (rastejo v okolju brez kisika)
- fakultativni aerobi (lako rastejo ob kisiku ali brez)
- mikroaerofili (rastejo ob nižjih koncentracijah kisika)
- aerotolerantni (kisik jim nič ne predstavlja)

Obligatni anaerobi so tisti, ki so se razvili v zgodovini najprej. (*Clostridium*-tetary njene spore so odporne na kisik).

Zakaj so obligatno anaerobni? Ker nimajo encimov, ki bi uničili določne derivate kisika, ki so toksični. Ti so:

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ superoksid, nastane po redukciji O_2

$O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ vodikov peroksid, nastane po redukciji superoksida

$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^-$ hidroksidni radikal, nastane po redukciji vodikovega per.

$OH^- + H^+ + e^- \rightarrow H_2O$

Ti mikroorganizmi so potem imeli encime:

- katalaza
 $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
- peroksidaza
 $H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2H_2O + NAD^+$
- superdizmutaza (deluje v kombinaciji)
 $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
 $4O_2^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O + 3O_2$

Ko so mo pridobili gene za te encime, so lahko preživeli v prisotnosti kisika. Anaerobni mo obstajajo še vedno. Vedeti je treba, da je topnost kisika v vodi majhna (8mg/1L H_2O). Zato v vodi lahko hitro pride do anaerobnih pogojev. Anaerobni pogoji so tudi v vampu govedi.

Bakteriostatična sredstva – preprečimo razmnoževanje bakterij, število pa ostane nespremenjeno.

Bakteriocidna sredstva – ubijemo bakterije, vendar jih ne razgradimo. Ostanejo notri.

Bakteriolitična sredstva – tu jih ubijemo in jih tudi razgradimo.

Sterilizacija – Uničenje vseh živih celic in virusov v nekem sistemu. Če imamo v zaprtem sistemu sterilno snov, ta ostane sterilna, če tega sistema ne izpostavimo okužbam. Najpogosteje uporabljamo za sterilizacijo povišanje temperature. Imamo več načinov:

- z mokro vročino – denaturacija proteinov, encimov, ki izgubijo svojo aktivnost (121°C)
- z suho vročino - oksidacija proteinov in ostalih celičnih molekul (160-170°C)

Pri sterilizaciji gre za eksponentno odmiranje celic. Hitrost odmiranja pa je odvisna od temperature.

Decimalni redukcijski čas – čas, kjer se koncentracija mikroorganizmov zmanjša na eno desetino začetne vrednosti v določenem času in pri določeni temperaturi. Ta je neodvisen od začetne koncentracije celic. Ti časi so pomembni v prehrabeni

industriji. Če imamo termofile organizme, so temperature višje in časi daljši kot pri mezofilnih mikroorganizmih. V praksi imamo več mikroorganizmov in je pomemben čas popolnega odmrtja celic. Ta je odvisen od začetne koncentracije celic v sistemu. Za uničenje endospor je čas 4-5 min pri temperaturi 121°C, medtem ko za uničenje vegetativnih celic iste vrste pa potrebujemo 0,1-0,5min pri 65°C. Če se celice nahajajo v eksponencialni fazi razvoja, so bolj občutljive na temperaturo kot v stacionarni fazi razvoja. Ni vseeno tudi, v kakšnem gojišču se nahajajo. Če je visoka koncentracija soli v okolju, to pospeši odmiranje celic. Zato je suhe substrate težje sterilizirati kot mokre substrate. Ker je sterilizacija predraga, je dosti če odstranimo samo mezofilne mikroorganizme. (pasterizacija 30min pri 65°C). Če imamo šaržno pasterizacijo (segrevamo, ohlajamo, segrevamo,...) to povzroči spremembo v hrani, zato se v živilski industriji uporablja pasterizacija 170°C za 10s. To poteka kontinuirno, zato ni spremembe v živilu. Najbolj popolna sterilizacija je tindalizacija (3x segrejemo na 100°C in ohladimo v presledku 24h). Pri tem odmrejo vsi mezofilni mikroorganizmi in večina termofilnih mikroorganizmih. Pri sporah pa se inducira kaljenje. Potem te spore naslednji dan s segrevanjem uničimo. To je najbolj varen način, ni pa uporaben v industriji. Naslednji tipi sterilizacije so:

- ionizirajoče sevanje ali mikrovalovi
- UV svetloba od 220 – 300nm, povzroči v strukturi DNA nastanek timisnkih dimerov, kar pri prepisu pripelje do točkovnih mutacij.
- alfa, β in γ žarki → nastanejo ioni in nevarne molekule (H^+ , OH^+ ,...) ki lahko uničijo polimerne molekule.

Prokarjonti so bolj odporni kot evkarjonti. Za bakterije je smrtna doza 200 grejev, pri človeku je 10 grejev. Imamo tudi ekstreme – *Claustidium butilidum* – 3300 grejev.

Mikroorganizmi, ki so v puščavi so bolj odporni na radiacijo kot mikroorganizmi, ki živijo v drugih nišah sveta. Ionizirajoče sevanje se uporablja tudi v medicini.

Filtracija – pore 0,22mikro metra s tem lahko odstranimo vse bakterijske celice iz filtrata. Tipi filtrov so:

- membranski filtri so porozni in delujejo kot sito (celulozni, nitratni)
- globinski filtri – fibrozni nitasti materiali, delci se lovijo v globini tega filtra. Služijo kod predfiltri (npr. vatast zamašek)
- nukleacijski filtri → polikarbonati film obsevajo z ionizirajočim sevanjem. Ti žarki povzročijo okvaro določenih mest, film dajo v raztopino, luknje se povečajo in ko reakcijo ustavijo, dobijo specifične velikosti por.

Dezinfektiki – uporabljamo jih na neživih stvareh ker so toksični za človeka

Antiseptiki – za zmanjševanja števila bakterij. Lahko se uporablja tudi na človeku.

Tu gre za hladno sterilizacijo. Snovi so alkoholi, fenoli, krezol, Cl, I, Hg, Ag, Cu, kristal violet, detergenti, mila, aldehidi, formaldehid, peroksid.

Kemoterapevtiki se uporabljajo za zdravljenje bolezni pri ljudeh (infekcijskih boleznih). Kemoterapevtike moramo zaužiti in so za notranjo uporabo. Mora biti selektivno toksičen (prizadeti morajo samo bakterijsko celico in ne človeške). Prvi sistem kemoterapevtikov, ki so jih našli so bili sulfonilamidi. To so analogi rastnih

faktorjev. Analogi so esencialne snovi v gojišču, ki jih potrebuje nek mikroorganizem za normalno delovanje. Analogi so strukturno podobni, funkcijsko pa ne. Sulfonil amid je strukturno zelo podoben p-amino benzojski kislini, ki se vgrajuje v folno kislino. Tako ta molekula ni več funkcionalna in bakterija odmre. Človek mora folno kislino pridobiti z hrano, sulfonil amid mu tako ne škodi. Analoge imamo lahko tudi za baze (timin 5-bromo). Spremenimo lahko tudi aminokislino, vitamine, piridine in pirimidine. Kemoterapevtiki so antibiotiki in so dejansko strupi mikrobnega izvora.

Toksiki – strupi abiogenega izvora

Toksini – strupi biološkega izvora

Sekundarni metaboliti – idiociti

Pri mikroorganizmih, ki jih najdemo v zemlji je izredno močan boj za obstanek. Preživijo samo tisti mikroorganizmi, ki izločajo sekundarne metabolite, za katere je značilno:

- gre za nastanek pod standardnimi pogoji v stacionarni fazi rasti, ko vsaj eden nutrient ni prisoten v dovolj veliki koncentraciji. Za njih je značilna majhna molekulska masa do 2000 Da. Spadajo med različne kemijske skupine in velikokrat ni razpoznavne uporabe za producenta. Danes jih je opisanih le 10000, predvidevajo pa da je to le del vsega. Samo nekaj od teh ima antibiotske lastnosti.

Od kod prekurzorji za sekundarni metabolizem?

Lahko so iz sladkornega metabolizma, lahko so karboksilne spojine ali amino kisline, nukleotidi. Potem so se tudi pojavili encimi, ki so združili posamezne metabolite med seboj.

Penicilin je aminolipidna kislina, ki ima β laktamski obroč – to je osnova.

Eritromicin – ta nastane iz karboksilnih spojin. Najprej se tvorijo poliketoni, ki se potem združijo.

Od vseh metabolitov, jih lahko samo 1% uporabljamo za človeka. Antibiotiki širokega spektra delujejo na gram pozitivne(imajo peptidoglikan) in na gram negativne bakterije. Antibiotiki ozkega spektra pa samo na eno vrsto bakterij (gram pozitivne ali gram negativne) ali pa samo na določen rod bakterij. Gram pozitivne bakterije so bolj občutljive na antibiotike kot gram negativne, ker imajo gram negativen še eno membrano. Dandanes imamo veliko umetnih antibiotikov.

Tarče delovanja antibiotikov:

- celična stena
Penicilin, β -laktamski antibiotiki, producirajo streptomocete in so inhibitorji transpeptidaze, katera povezuje z peptidno vezjo glikopeptidne enote v peptidoglikane. Na sintezo celične stene vplivajo še bacitracin, vanlomycin, cikloserin in fostomicin.
- druga tarča je celična membrana
Valinomycin povzroča nastanek por v membrani, ciklosporin. Cerulin inhibira sintezo peptidov. Inhibitorji sinteze prekurzorjev so azaserin(moti sintezo encimov).

- inhibitorji sinteze nukleinskih kislin
Poznamo tri različne skupine, ki se vrinejo v strukturo nukleinskih kislin in tako spremenijo zapis. To so interkalatne substance (aktinomycin, akridini). Te substance se lahko kovalentno vežejo z DNA (bleomicin, mitomicin). Inhibitorji polimeraz (rifampicin).
- naslednji so inhibitorji proteinske sinteze. Puromicin ustavi sintezo m-RNA, streptomycin povzroči napačno branje iz m-RNA. Kloran fenikol pa inhibira nastanek peptidne vezi (uporaba za rejo živine).

Kakšni so mehanizmi rezistence?

Mirkoorganizem je rezistenten, če nima strukture, ki jo napada antibiotik (mikoplazme nimajo celične stene, zato si s penicelinom ne moremo kaj dosti pomagati in so rezistentne na β -laktamske antibiotike).

Membrane so nepropustne za antibiotike. Pri gram negativnih bakterijah ne bomo nič dosegli z prvo skupino antibiotikov (β -laktamski antibiotiki).

Lahko pride do genske spremembe tarče, ki jo napada antibiotik, lahko pa pride do genske spremembe metabolnih poti. Mikroorganizem ima lahko tudi transportne sisteme za izčrpavanje antibiotikov.

MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). Ta je odporen na vse antibiotike, zato za te iščejo bakteriofage. Za rezistentnost je kriva predvsem množična uporaba antibiotikov. Uporabljali so jih tudi v agronomiji, ker nekateri pospešujejo rast nekaterih živali. Geni za rezistentnost so večinoma na plazmidih in zato so r-plazmidi (resistance). Ti plazmidi so sposobni prehajati iz ene celice v drugo. Lahko prehajajo iz ene vrste v drugo vrsto. To je horizontalni prenos genov. Kako preprečujemo širjenje rezistence? Tako, da so v tabletah dva ali več vrst antibiotikov, ker se redkokdaj zgodi, da bi imel mikroorganizem rezistenco na en in drug antibiotik. Pri β -laktamskih antibiotikih moramo dodajati inhibitorje β laktamaz, zato, da jih organizem ne more razgraditi (antibiotike). Klavolenska kislina je sekundarni metabolit in inhibitor β laktamaz. Tretji način je da se uporaba antibiotikov za nekaj časa umakne, v tem času se ravnovesje med rezistentnimi in nerezistentnimi mikroorganizmi premakne v korist nerezistentnih. Potem lahko zopet začnemo uporabljati antibiotik.

Glive so lahko prav tako patogene, napadejo epidermis v koži. Pri njih je ergosterol namesto holesterola in imajo celično steno iz hitina. Težje je pri virusih, ker je njihov metabolizem odvisen od gostiteljske celice. Kljub temu, azidotimidin je substanca, ki zavira razvoj retrovirusov.

Pomembne je tudi interferon, ki preprečuje nastanek virusne m-RNA. Celica, ki je obkrožena z virusom, da signal naprej drugim celicam in tako telo samo začne sintetizirati interferon.

Mikotoksini – med sekundarnimi metaboliti so tudi tisti, ki škodijo človeškemu organizmu. Te producirajo predvsem glive *asparagilus clarices*. Ti mikotoksini so problematični predvsem v prehranski industriji zato, ker lahko rastejo te glive na senu, žitih. Eden najbolj razširjenih je aflatoksin (*asparagilus flagus*). Ta povzroča transformacijo človeških celic v rakaste celice. Se kopiči v našem telesu in ne razpada. Ta raste predvsem v tropskih in subtropskih podnebjih. Drugi je tulin, ki je kancerogen in tudi nekateri alkaloidi.

Merilenin lovastatin – te spadajo v skupino statinov (*asparagilus peruus*). So tipični metaboliti in jih lahko uporabljamo za zniževanje holesterola v krvi.

Kaj je taksonomija?

- Je razvrščanje organizmov v določene skupine sebi sorodnih organizmov.
- Je veda o identifikaciji, klasifikaciji in nomenklaturi organizmov, kjer so ti organizmi uvrščeni v nek sistem glede na sorodnost z drugimi organizmi. Ta sorodnost običajno temelji na evolucijskih osnovah.

Kaj je to vrsta?

- je skupina med seboj podobnih organizmov, ki se med seboj lahko spolno razmnožujejo in imajo potomce, ki so sposobni spolnega razmnoževanja.
- Je skupek sevov, pri katerih so vse osnovne lastnosti enake, vendar se v eni ali več lastnostih razlikujejo od drugih sevov. Tu je 60% genov sorodnosti in manj kot 3% razlika v sekvenci 16 SR DNA (ribosomska DNA).

Kaj je to sev ali klon?

- je populacija gensko identičnih celic, ki izvirajo iz ene same celice. Imajo enako sekvenco 16 SR DNA)
- sev je tudi stabilen mutant (vsaka mutacija predstavlja nov sev)

Vrsta je edina taksonomska enota, ki temelji na biološki definiciji. Vse ostale (rod, družina, deblo,...) so umetne tvorbe.

Vrsta je najnižja enota, nad katero se nahaja rod. V rod ali genus sodijo sorodne vrste, katerim je skupno vsaj 20% genov. Več rodov skupaj je družina ali familija. Nad družino je potem red ali ordo, nad redom je deblo ali filum. Kot najvišja taksonomska enota pa je domena. Vsa živa bitja so razdeljena v tri domene:

- bakterije
- arheje
- evkarjonti

Najboljše orodje za določevanje vrst bi bila celotna sekvenca DNA, vendar to ni mogoče, ker določenih delov DNA ni možno sekvenirati, zato temelji določanje vrst na sekveniranju 16 SR DNA. Na podlagi razlike se določi evolucijska razdalja med organizmi. Večja, kot je variabilnost, bolj sta si dva osebka evolucijsko oddaljena.

Genotip – skupek vseh podedovanih lastnosti

Fenotip – skupek vseh morfoloških in fizioloških lastnosti organizmo, ki jih določa genotip.

Binomalna nomenklatura je v taksonomiji taka, da vsak organizem nosi ime rodu in vrste. Primer:

Esherichica coli
 Rod = *Esherichica*
 Vrsta = *coli*
Aspergillus niger
 Rod = *Aspergillus*
 Vrsta = *niger*

Ime organizma ponavadi pišemo poševno (Italic – računalniško). Kadar pišemo okrajšano, okrajšamo samo ime rodu, ime vrste pa ne smemo krajšati. Pri tem ime rodu vedno pišemo z veliko začetnico, ime vrste pa vedno z malo.

Po novem pišemo za

Bakterije → Bacteria

Arheje → Archea

Prokarioti

Eukarioti

CH₄, CO₂, H₂O, CO, NH₃, H₂ – tej spojine so prevladovale v prvotni zemeljski atmosferi, ko je bila še žareča krogla. Pri sprostitvi energije (strela, toplota, meteoriti), so se začele tvoriti določene organske molekule (purini, pirimidini, maščobne kisline, aminokisline,...). Ker je bila takrat zemlja še abiotski svet, so se te spojine začele kopičiti. Takrat se je zemlja že začela ohlajevati in skorja se je začela strjevati. Ker so spojine imele trdno podlago, so se lahko začeli tvoriti polimeri, pri katerih se je odcepljala voda. Tako so se začeli tvoriti preprosti peptidi,... Po tem je prišlo do tvorbe prvih primitivnih enoceličnih organizmov. Starost življenja na zemlji je ocenjena na 4 milijarde let. Pri nastanku življenja, pa je bil še en pogoj: utekočinjenje vodne pare. To lahko opazimo iz kamnin, ki so 3,8 milijarde let stare, so že vsebovale kapljice vode, kar nakazuje na to, da so takrat že bili oceani. Najstarejši fosili, stomatoliti, ki so stari 3,6 milijarde let, so že vsebovali filamentozne bakterije, ki so bile fototrofne. Prve celice pa naj bi bile kemolitotrofne. Primer primitivnega načina, ki naj bi bil pri njih:

Železov sulfid v zunanosti celice reagira z vodikovim sulfidom in dobimo pirid in molekulo vodika. Elektroni iz vodika potujejo preko primitivnih dehidrogenaz v notranjost celice, kjer pride do redukcije v vodikov sulfid. Protoni, ki pri tem ostajajo na zunanji strani celice, pa ustvarjajo koncentracijski gradient protonov, ki se potem preko primitivne ATP-aze prenesejo v notranjost celice, pri tem pa se tvorijo molekule ATP-ja.

Ti primarni mikroorganizmi še niso vsebovali citokroma, kar pomeni, da še ni bilo dihalne verige. Čez čas so se razvili še porfirini, ki so zgrajeni iz štirih pirollovih obročev. Če se je med te ciklično povezane obroče vezalo železo, potem razvili citokromi, ki so bili sposobni bolj učinkovite izrabe energije. Pri nekaterih arhejah je v porfirinu Ni ali Co in so bile sposobne acetogeneze ali metanogeneze. Pri tistih, ki so imele vgrajen Mg ion, pa so bile sposobne odtrgati elektrone iz molekule vode, zato so sodelovale pri fotosintezi.

Kot vir ogljika so celice uporabljale CO₂, ki ga je bilo takrat v atmosferi dovolj. Nekatere pa so že uporabljale organske spojine, ki so vsebovale C-atome. Pri presnovi ogljikovih hidratov, pa je bilo potrebno že nekoliko več encimov, kot terminalni akceptor elektronov pa so bili CO₂ in SO₄²⁻. Bistveni korak naprej pa je bila druga svetlobna reakcija (razvoj klorofila, ki je lahko odtrgale elektrone iz vode). To je bil bolj učinkovit sistem, kjer se je tvoril ATP in NADPH, kot stranski produkt pa se je sproščeval v atmosfero O₂. Delež kisika se je tako večal v atmosferi, dokler ni dosegel današnje vrednosti ~ 20 %. Za to sta bili potrebni 2 milijardi let. Za ta delež kisika so bile krive predvsem ciano bakterije (modro-zelene). Ta kisik, ki se je začel zadrževati v ozračju, je povzročil nastanek ozonske plasti in tako zaščito zemlje pred UV žarki. Ko so organizmi začeli uporabljati kisik kot terminalni akceptor elektronov je

to omogočilo razvoj višjih organizmov. Pri tem gre namreč za boljšo izrabo energije. Med evolucijo so se iz prokariotov razvili evkarionti. Pri tem se je količina DNA povečala. Organizmi, ki so imeli nukleinske kisline v jedru, so pridobili simbiote, ki so se kasneje pretvorili v mitohondrije in kloroplaste. Tako so postali energetsko bolj samostojni in učinkoviti zaradi kisika kot terminalnega akceptorja elektronov. Ta pridobitev in prisotnost kisika je povzročila »bum« v razvoju in do tega hitrega razvoja je prišlo v zadnjih 900 milijonih let. Kisik pa se je začel izločati v ozračje pred tremi milijardami let in bilo je potrebnih 2 milijarde let, da je prišel do koncentracije 20%. DNA, proteini,... so še dandanes zelo variabilni.

Razvoj genoma

Najprej je bila RNA tista, ki je nosila dedne informacije. Po drugi strani pa je lahko tudi biokatalizator (ribocim). Primitivni mikroorganizmi so imeli le RNA kot makromolekulo, vendar katalitičnost RNA molekule ni dovolj specifična. Kasneje so vlogo katalize prevzeli encimi, ki so bistveno bolj sposobni in specifični, DNA pa je prevzela nosilko informacij, ker je DNA polimeraza bolj natančna pri podvajanju njene verige. Končno so obstali organizmi, ki so imeli DNA kot nosilko informacij in encime, ki so vodili vse kemične reakcije.

Sorodnost organizmov se določa z sekveniranjem 16 S DNA in 18 S DNA pri evkariontih. RNA ima enako funkcijo v vseh organizmih. Je univerzalna in relativno konverzibilna molekula po strukturi. To pomeni, da je prišlo do malo sprememb. Relativno lahko jo je izolirati in z PCR namnožiti. V vsaki celici so tri različne RNA molekule:

- 5S RNA, ki ima 120 n.k.
- 16S RNA, ki ima 1500 n.k.
- 23S RNA, ki ima 2300 n.k.

16S RNA je najbolj uporabna. Dovolj je dolga, da s temi sekvenatorji zajame takšen del sekvence, ki nam da reprezentivne rezultate (800-900 n.k.). Ima jedro, ki je doživelo malo sprememb in variabilni konec, ki je doživel večje število sprememb. Kako poteka ta proces? Najprej izoliramo DNA ali RNA. Če je to RNA, jo moramo najprej z reverzno transkriptazo pretvoriti nazaj v DNA. Potem je treba dobiti pravilni segment, ki nosi informacijo o genu. To določimo z PCR. Pomnožimo ravno ta del RNA in dobimo ven samo 16S DNA, ki jo sekveniramo. Pri tej metodi ne potrebujemo živih celic. Dovolj je da vzamemo vzorec prsti. S tem lahko tudi približno ocenimo koliko različnih vrst mikrobov imamo v vzorcu.

Taksonomija bakterij

Bakterije so se pred 3,5 milijardami let odcepile v svoje deblo. Druga veja se je razvila v arheje in evkarionte. Arheje so bolj sorodne evkariontom kot pa bakterijskim organizmom. Bakterije delimo v 16 debel. Pri bakterijah se za določevanje še vedno uporablja Bergerjev priročnik, kateri loči bakterije na osnovi dihonomnih ključev.

Primer določitve po Bergerjevem priročniku:

Izoliramo E.coli iz črevesja živali in dobimo čisto kulturo, ki jo najprej barvamo po gramu. Če je gram negativna, potem pod mikroskopom določimo, če je v obliki paličic. V nadaljevanju naredimo test kisika. Če je fakultativni anaerob, potem gremo z testom dalje. Če lahko fermentira lahkozo in izloča kisik ali pline in če določimo pozitivne substance (metil rdeče) in negativne na citrat, pridemo do E.coli.

To je način, ki je v zdravstvu v široki uporabi. Pri bakterijah imamo le 4 morfološke oblike (paličaste, koki, spirile in spirohete), zato je potrebna še fenotipska klasifikacija. Dela se barvanje po gramu, zahteva po različnih hranilih, ali so litotrofi, fototrofi ali gamatrofi, pogleda se prisotnost enkluzijskih telesc oz. njihova tvorba, prisotnost določenih pigmentov, zmožnost uporabe različnih virov ogljika, dušika in žvepla. Sposobnost tvorbe določenih fermentativnih produktov. Anaerobi, aerobi, toleranca na temperaturo, pH, občutljivost na antibiotike in tudi patogenost oz. simbiotski odnosi, imunološke karakteristike in habitat (iz kje jih izoliramo). Bergerjev priročnik zahteva vse te teste. Na ta način so jih razporedili v dihonomni ključ.

V znanstvene namene se uporablja samo 16SR DNA, razen takrat, ko z njo ne dobimo dovolj informacij se sekvenira še 23SR DNA oziroma pri evkarjontih 28SR DNA. Na osnovi teh podatkov so jih razdelili v tri domene (arheje, bakterije, evkarionti). Pri bakterijah imamo 16 debel ali filumov.

- *Aquifex*, *Hydrogenobacter*. Preko evolucije se je malo spreminjala. Zato so to še vedno hipertermofilni in kemolitotrofni mikroorganizmi. So anaerobni organizmi, ki oksidirajo vodik ali reducirajo vodikov sulfid.
- *Nitrospira*, *Defferibacter*. Nastala je malo kasneje. O njej vemo zelo malo. So kemolitotrofne bakterije oz. organotrofni mezofilni oz. termofilni m.o. Sposobni so fiksirati dušik iz atmosfere. Podobna lastnost kot pri nitrifikacijskih bakterijah, samo da med njimi ni sorodnosti. Nitrospira ima enak habitat kot proteobakterije.
- *Thermotoga/Thermosipha*. Gre za termofilne bakterije. Nahajajo se v geotermalnih segmentih. To je habitat na dnu oceanov. Je anaerobna bakterija, ki raste med 50 in 90. stopinjami celzija. Za njih je značilno, da imajo dolgoverižne maščobne kisline v membrani, stena pa že vsebuje peptidoglikan.
- *Chloroflexus* (zelene nežveplave bakterije). Predstavnik je *Chloroflexus*. So še termofilno mikroorganizmi, niso pa hipertermofilni mo. To pomeni, da so se razvili kasneje, ko so se oceani že ohladili.
- *Deinococcus* – *Thermusaquaficus* So gram pozitivne bakterije. So rezistentni na radioaktivnost. *Thermusaquaficus* je gram negativen, je organotrof. Za obe skupini je značilno, da namesto diaminopikolinske kisline uporabljajo arnitiin.
- Spirohete. To so prostoživeče bakterije. Predstavniki so *Spirochaeta*, *Borrelia* (klop → borelijoza), *Treponema*. Vsi tej mikroorganizmi niso bili patogeni. To pridobili s časom. Za vse tej predstavnik je značilna enotna morfologija in način premikanja /z bički).
- Zelene žveplave bakterije. Predstavnik je *Chlorobium*. So fototrofne, ki imajo samo en fotosintezni sistem. Tu gre za anoksigeno fotosintezo. Kot donor elektronov ni voda, ampak je vodikov sulfid. Za *Chlorobium* so značilni pigmenti za absorpcijo svetlobe. To dokazuje, da se je fotosinteza razvila 3,6 – 3,7 milijonov let nazaj.
- Cytophaga – so obligatni aerobi. To so paličaste bakterije, ki se premikajo z drsenjem. Predstavnik je *sporo cytophaga*. Ta lahko tvori mikrociste. Ima sposobnost določene stopnje diferenciacije, ki ji omogoča preživeti neugodne razmere. Habitat je zemlja in voda. Imajo že celulaze oziroma encime, ki razgradijo agar. Zaradi teh encimov, jih ne moremo gojiti na gojiščih iz agarja.
- *Flavobacterium*. To so gram negativne bakterije. Za to skupino je značilna *Bacteroides*, ki so obligatni anaerobi, ki se nahajajo v črevesju našega telesa. So najbolj številni predstavnik našega prebavnega trakta. V membrani imajo namesto glicerola sfingozin. *Flavobacterium* živi predvsem v vodnih habitatih.

Značilno za njih je da imajo pigment rumene barve in uporabljajo glukozo kot vir ogljika.

- Naslednje so *Verrucomicrobia*. Gre za sladko, slano vodne in telestične (zemlja) bakterije. Imajo specifične bradevičaste izrastke na membrani. Imajo peptidoglikan, zato so gram pozitivne bakterije. So aerobi, lahko tudi fakultativni aerobi.
- Naslednja skupina so *Planctomyces* z glavnim predstavnikom *Pirella*. Za njih so značilne brsti. So brez peptidoglikana in so obligatni aerobi. Rastejo le v zelo razredčenem gojišču. Značilno za njih je, da so celice pritrjene na podlago.
- Naslednja skupina so *Chlamydia*. So obligatni intracelularni organizmi. Celična stena je brez peptidoglikana in značilen je enostaven metabolizem. *Chlamydia psittacis* povzroča bolezen pri pticah. Pri človeku povzroča slepoto *C.tirahomatis*. *C.pneumoniae* povzroča pljučnico.
- Ciano bakterije. Pri njih se prvič pojavi klorofil A kot pigment. Ta je v fotosinteznem sistemu II. Tak klorofil A je tudi izvor nastanka kloroplastov.
- Gram pozitivne bakterije. Gre za paličice ali koke. To skupino delimo na tri podskupine:
 - 1.sk. nizek procent G in C
 - 2.sk. visok procent G in C
 - 3.sk. visok procent A in T

V prvo skupino spadajo *Clostridium* (obligatni anaerobi, ki povzročajo tetanus), *Bacillus*, *Acetobacterium*, *Streptococcus* (to so sorodovi)

V drugo skupino spadajo *Staphylococcus*, *Mycoplasma* (sorodna *Clostridium*, samo nima stene. Povzroča pljučnice), *Lactobacillus* (srečujemo jih v prebavni industriji) 3.sk. *Actionomyces* (so v zemlji), *Streptomyces* (filamentozne (nitaste) paličaste bakterije. Izločajo mlečno kislino in sec. Metabolite), *Nocardia*, *Corynebacterium* (te dve imajo prav tako sec. Metabolite), *Mycobacterium*, *Cellulomonas*, *Brevibacterium*, *Heliobacterium* (je fotosintetska).

- So še škrlatne fototrofne bakterije ali proteobakterije. So najobširnejša in najbolj raznolika skupina bakterij, ki so izvorno fotorofi. Kasneje so nekateri postali organolitotrofi. Razdelimo jih v pet skupin.

α – *Rhizobium*, *Nitrobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*. To so vsi organotrofi. Dva sta fototrofa \rightarrow *Rhodobacter* in *Rhodospila*. So terestični mo.

β – *Spirillum*, *Nitrosomonas*, *Rhodocyclus* je fototrofna bakterija. So še *alcaligenes* in *Bordetella*.

γ – *Beggiatoa*. *Legionella*, *Azotobacter*, *Vibrio*, *Chlorobium* so enterične bakterije. Nekateri so patogeni. *Legionella* povzroč legionarsko bolezen. Vezana je na vodni vir. *Vibrio collera* – povzroča kolero.

δ – so proteobakteria – tipični organotrofi. Sem spadajo *Desulfovibrio* in *Desulfomonas*.

ϵ – so *Campylobacter* in *Helicobacter*. So organotrofi.

Arhaea

So samo tri poddebla. Tipično za njih je da so se težje prilagajale spremembam v okolju, zato so večinoma ekstremofili. So ali anaerobni in s tem butanogeni (izločajo butan) ali pa so halofili (uspevajo v visoki koncentraciji soli). Večinoma so halofili obligatni aerobi.

- *Crenarchaeota* – predstavnik je *Thermococcus* in *Pyrodictium*. So hiper termofilni mikroorganizmi. Imamo membrano, kjer imamo izopren.
- *Euryarchaeota*. Tu so dve podskupini
 - Metanogeni
 - Methanococcus*
 - Halofilne bakterije
 - Halobacterium*, *Thermoplasma*, *Metanopyrus* (hipertermofilni mikroorganizem in je kemolitotrofen).
- *Korarchaeota* – so hipertermofilni organizmi. Za njihov obstoj vemo samo zaradi obstoja 16SR DNA. Teh ne znamo gojiti v laboratoriju in jih ne moremo razviti v čisti kulturi. Samo iz termalnih vrelcev so lahko izolirali DNA.

Evkarionti

Za evkarionte je značilno, da je njihov nastanek pogojen z nastankom kisika v atmosferi. Primitivni evkarionti so bili brez organelov. Kloroplasti in mitohondriji so se pojavili pred 1,5 milijardami let. Mitohondriji so bolj sorodni bakterijam kot arhejam. Po 16SR DNA so podobni agrobakterijam. Tudi evkarionte delimo glede na DNA sekveco. Le da jih tu delimo glede na 18SR DNA. Delimo jih v šest skupin:

- Diplomonade (obligatni paraziti) (*Giardia*)
- Microsporidiae (obligatni paraziti) (*Encephalitozoon*)
- Trichomonade (hidrogenosom(izloča H₂ in CO₂)) (*Trichomonas*)
- Flagelates (*Mastigophora*)
- Myxomycetes (glive sluzavke) (*Dictyostelium*)
- Ostali (vsi ostali; živali, rastline,..)

Trichomonade so izredno primitivne evkariontske celice, ki so brez organelov (golgijev aparat, endoplazmatski retikulum, mitohondrij). Imajo relativno majhen genom. Jedra imajo že jederno membrano in večje število kromosomov.

Alge

Vsebujejo klorofil in so sposobne oksigene fotosinteze (imajo dva fotosistema). Filagenetsko so precej heterogene. So večinoma obligatni fototrofi. Nekatere lahko izgubijo kloroplaste in postanejo organotrofi, zato jih lahko prištevamo na mejo med alge in praživali.

Alge delimo v enocelične organizme, ali pa tvorijo makroskopske kolonije, ki dosežejo velikost do nekaj deset metrov. Značilno za alge je da vse vrste vsebujejo predvsem klorofil A malo tudi klorofil B in nekatere druge kromatofore kot so fikociani, santofili, karoten. To so pigmenti, ki sprejemajo svetlobo določene valovne dolžine in jo posredujejo klorofilu A. za posamezne vrste alg so značilni različni polimeri (škrobi), lipidi (paralumilon) in značilna je tudi celična stena (celuloza, pektin, silan, manan). V nekaterih primerih je celična stena ojačana s kremenom (silikati). Celična stena ima 3-5nm velike pore, skozi katere vstopajo manjše molekule. Pri algah ne more priti do fagocitoze. Nekatere vrste imajo bičke in se premikajo. Migetalk ponavadi nimajo. Alge so večinoma vezane na vlago oz. vodne habitate. So tudi ekstremne vrste, ki živijo v suhem okolju in okolju z nizkim pH.

Skupine alg:

- *Chlorophyta* ali zelene alge. Pri njih je klorofil A in malo klorofila B. Večinoma so enocelične, čeprav lahko nastopajo v obliki lista. Kot zaloga snovi je škrob. Celuloza je prevladujoča v celični steni.
- *Euglenophyta* predstavnik je evglena-enocelična alga, ki je bolj sorodna protozoam. Lahko zgubi kloroplaste in postane organotrofa. Je brez celične stene.
- *Chrysophyta* ali zlato rumene – rjave alge. Tipični predstavniki so diafomeje ali kremenaste alge. So enocelični mikroorganizmi, kjer je stena prepojena z silikati (kremen). Pomembna je predvsem diatomejska plast, ki se je v preteklosti nabrala v zemeljski skorji in je bogata z fosili.
- *Phaeophyta* ali rjave alge. Poleg klorofila A imajo pigment ksantofil. Značilno je, da so večcelične filamentozne (tvorijo nitaste oblike). Nekatere vrste so rastlinam podobne steljke.
- *Pyrrophyta* so dinoflagalati. Imajo dva bička, ki sta pravokotno nameščena drug na drugega.
- *Rhodophyta* ali rdeče alge. Poleg klorofila A je fikocian in fikoeritrin kot pigment.

Druga velika skupina evkariontov so protozoa. Te nimajo celične stene, nimajo klorofila in lahko se premikajo. Ne tvorijo plodišč, hranijo se z fagocitozo. Vezani so na vse vodne habitate. Lahko so tudi paraziti.

- *Mastogophora* (bičkarji), so sladkovodni organizmi in paraziti pri živalih in tudi pri človeku. Predstavniki: *Trypanosoma*, je povzročiteljica spalne bolezni, ki se prenaša z CC-muho in *Euglena*, ki je podobna bičkarjem, še posebej, če izgubi kloroplaste. Ni parazit.
- *Sarcodina* – predstavniki so ameba – so brez celične stene in zato se lahko gibljejo na ameboidni način (citosol se pretvori v sol-gel stanje). So sladkovodne, precej je parazitov. Predstavniki so Foraminifore (CaCO_3) in Radiolarije (SiO_2). So mikroorganizmi, ki imajo diferencialno celično steno, ki je okrepljena z silikati ali kalcijevim karbonatom. Živijo v plitvih morskih vodah. Iz njihovih sedimentov, naj bi se dvignila gorovja iz vode ☺).
- *Ciliophora* (migetalkarji) Cilio – migetalkarji; phora-nositi. Migetalke so enake bičkom po zgradbi, po številu pa jih je veliko več. Predstavniki Paramecium. Pri teh je že večja diferenciacija. Imajo makro nucleus, kjer poteka sinteza m-RNA in mikro nucleus, kjer se nahaja DNA. Paramecij je prostoživeči mikroorganizem, ki je vezan na vodno okolje, nekaj je parazitov. Nahajajo se v vampu živali.
- Sporozoa So obligatni paraziti (*Plasmodium vivax* – malarija). Pri njih so faze razvoja vezane na sporozoido. To je neugodna oblika alge. Te sporozidije se v telesu razvijajo v aktivno obliko celice. Odrasle celice niso gibljive. Adsorbirajo tekočo hrano skozi membrano. Nekatere (kokcidia) so paraziti na pticah.

Glive slizavke ali liposomicete so na meji med praživalimi in glivami. Pri njih je spolno razmnoževanje s porangiji, ki imajo vlogo pri spolnem razmnoževanju. V neugodnih razmerah so v sklerociju. Po morfologiji jih delimo na:

- celična oblika. Te tvorijo ameboidne kolonije, ko ob določenih pogojih preidejo v tvorbo plodišč
- plazmodi, ki so podobni veliki amebi.

Glive

Za glive je značilno, da so brez klorofila in so gibljive. So oragnotrofi. V glavnem živijo samo v prsti, nekaj malega pa jih živi tudi v vodi. Imele so pomembno vlogo pri razkroju organskih substanc v prsti, povzročajo mineralizacijo in so zato bogate z encimi, ki so sposobni razgrajevati polimere. Zaradi teh encimov, so zanimive za biotehnoške raziskave. Nekaj jih je patogenih. Celična stena je iz hitina. Poleg hitina imajo še galaktane, glikane. Arhitekturno je celična stena podobna rastlinskimi, vendar pri rastlinah prevladuje glukoza, zato so biokemijsko različne. Primarni metabolizem je podoben višjim organizmom. Pri glivah je določena morfološka različnost, glede na katero jih delimo v:

- plesni
- kvasovke
- gobe

Plesni so filamentozne nitaste celice, ki jim pravimo hife. Rastejo samo na vrtu. Pri višjih glivah imamo septe, katere lahko prehajajo skozi pore. Preplet hif je micelij in je ponavadi bele barve. Pri glivah je lahko precej kompleksen razmnoževalni cikel, kjer se izmenjujejo diploidna in haploidna stanja. Pri določenih glivah dobimo cenocitičen micelij, kar pomeni, da ima več jeder.

Glive delimo v štiri skupine:

- *Oomycetes* – so najpreprostejše
- *Zygomycetes*

Pri obeh imamo cenocitičen micelij, v hifah pa ni sept (so dolge nitke, ki niso pregrajene z pregradami). Predstavnike *oomycetes* najdemo v vodi. Predstavniki je *Allomyces*. Pri *zygomycetes* je *Mucor*, ki jo dobimo na kruhu, drugi predstavnik pa je *Rhizopus*. Glive se nespolno razmnožujejo s sporami, če gre za spolno razmnoževanje, so ravno tako spore, samo da je proces bolj kompliciran. Glede na te spore jih delimo na:

- *Ascomycetes* (zaprtotrosnice, plodišče je askosin)
- *Basidiomycetes* (prostotrosnice)

Pri *ascomycetes* je *saccharomyces* (kvasovka) *cerevisiae* je v pekovskem kvasu, vino.

Kvasovke se nespolno razmnožujejo z brstenjem. Kvasovke so okrogle celice. Pri nekaterih glivah raste gliva najprej v obliki filamentoznih celic, nato pa v obliki kvasnih celic. Pri prehodu iz ene oblike v drugo je pomembno sprejemanje signala. *Basidiomycetes* (plodišča bazidiji), spore so prosto izpostavljene okolici. Tipični bazidiji so gobe. Za njih je značilno, da rastejo v sožitju z višjimi rastlinami – mikoliza. Simbioza poteka preko koreninskega sistema.

Glive rjava trohnoba lahko razgrajujejo celulozo. Pri razgradnji nastaja lignin, kateri je rjavkaste barve. Pri beli trohnobi je enako, le da imajo te glive še litične encime, kateri razgrajujejo lignin. Predstavniki bazidiomicet so amanita (mušnica), boletus (jurčki), agaricus (biscalus – šampinjoni). Nekatere *basidiomycetes* lahko umetno gojimo, če niso v mikolizi z višjimi organizmi.

- *Deuteromycetes* (fungi in perfekti) pri njih ni spolnega razmnoževanja, razmnožujejo se samo z sporami, ki nastanejo na sporozocju oziroma kandioforu. Sem sodijo nekatere vrste rodu *aspergillus* in *penicillium*.

Virusi

Nimajo lastnega metabolizma. To je ekstracelularni štadij. Njihov metabolizem in razmnoževanje so vezani na evkariontsko celico. Pri virusih gre predvsem za virusni genom, ki je RNA ali DNA, obdaja pa jo samo proteinski plašč. To dvoje je virusni partikel ali virion. Pri intracelularnem štadiju pa vstopi DNA ali RNA v gostiteljsko celico in uporabijo mehanizem te celice za pomnoževanje svoje nukleinske kisline. Določeni virusi imajo svoje lastne proteine, ki se sintetizirajo v okuženi celici in ti okužijo celico. Nukleinska kislina se zapakira v proteinski plašč in v zadnji fazi pride do lize gostiteljske celice. Ti novi virusni partikli se izločijo in napadejo nove celice.

Viruse delimo na RNA in DNA viruse. Genom v virionu je lahko dvojna vijačnica DNA, enojna vijačnica DNA ali pa dvojna ali enojna vijačnica RNA. Pri retrovirusih (HIV) imamo v virusu RNA, ki se pri procesu replikacije prepíše v DNA. Za tvorbo proteinov pa še vedno velja centralna dogma (najprej DNA → m-RNA → protein). Virusi so veliki od 0,02 do 0,3 mikrometrov. So manjši od najmanjših bakterij. Imajo malo dednega materiala (minimalno 5 genov). Običajno imajo od 5 do 150 kbp. Okoli genoma je proteinski plašč ali kapsida, ki je sestavljena iz kapsomer. Te sestavljajo večje strukture in te ustvarjajo ta plašč.

Nukleokapsida – proteinski plašč in genom. Te imajo značilne simetrije. Pri tobačnem mozaiku jih nastopa 2130. pri ostalih pa nastopa oblika ikozoedra, to je telo, ki je sestavljeno iz dvajset trikotnih proteinov. Naslednje stabilno število je 60, ki pa ni več tako stabilno. Pri nekaterih imamo lahko okoli še membranski ovoj. Ti virusi so predvsem pri sesalčnih vitusih.

Virusi imajo še nožice, s katerimi se prisesajo na površino celice. Nekateri pa imajo tudi encime že v samem virionu.

Pri tistih virusih, ki imajo ovoj, na nukleinske kisline odpade samo 1-2% mase. Pri itstih brez ovoja pa ta delež naraste na 25-50%. Pri retrovirusih je lahko več molekul nukleinskih kislin. Pri HIV so dve. Pri virusih influence (povzročitelji gripe) pa jih je 8 različnih. Glavne značilnosti reprodukcije so:

Najprej se mora virus pritrditi na membrano celice. Pritrdi se na receptorje, ki so proteini ali pa glikoproteini. Če celica nima teh receptorjev, potem je virus ne more napasti. Po pritrditvi se nukleinska kislina prenese v citosol. Pri bakteriofagih pri tem procesu sodeluje lizozin (razgradi celično steno). Pri sesalcih pa se lahko prenese s pomočjo fago-ginocitoze (zlitje membran in vsebina se sprosti v citosol = vezikli). Restriksijski encimi razgrajujejo nukleinske kisline na mestu določenega zaporedja. Virusna DNA pa je metilirana in s tem je zaščitena pred restriksijskimi encimi. Tudi virusi imajo svojo zaščito (glikozilacija, metilacija). To zaščito omogoča gostiteljska celica. Ko pride nukleinska kislina v citoplazmo, sledi zgodnja stopnja replikacije, sintetizirajo se specifični virusni encimi glede na to, katera vrsta informacije je vstopila v celico. Vedno pa mora nastati m-RNA. Po tem sledi replikacija nukleinskih kislin, ki poteka drugače. Tu je replikacija kotalečega se kolesa. DNA polimeraza vedno prepisuje iz 5' → 3' koncu. Sinteza ribosomov pa obratno. v cirkularni DNA nastane zarez, kamor se začne ta nukleinska kislina navijati in kjer začne podvajati DNA polimeraza. Ko imamo večkrat podvojeno vijačnico (enojno), se morajo gor vezati še primerji, kateri omogočijo nastanek komplementarne. Tak način podvojevanja omogoča vedno večjo reprodukcijo nukleinskih kislin, ki se razcepijo in

spakirajo v nove virione. Potem sledi pozna sinteza proteinov. To vse poteka pri bakterijah od 20-25 minut, medtem ko pri živalih od 8-40h. (graf: najprej imamo fazo, ko se virus vseli v celico in se podvaja. Nato imamo razpust in tako se količina okuženih celic nenadoma dvigne. Nato se vse to ponavlja, samo da so skoki večji.) Edina obramba je imunski sistem.

Temparatni bakteriofagi. Te se ločijo od virulentnih → ti uničijo celico takoj po infekciji.

Temparatni → pride do vgraditve DNA v bakterijski genom. Dobimo profag. Represorski encim se veže na DNA polimerazo in onemogoči podvojevanje RNA sekvence, ki je vključena. Pod UV pogoji lahko ta represorski encim razpade in se razvije litična pot. DNA se začne podvojevat. Večina bakterijskih celic je lizogenih, kar pomeni, da imajo v genomu bakteriofag. Viruidi so nukleinske kisline, ki lahko nastopajo brez proteinskega ovoja. To je krožna enojna RNA, ki je sposobna replikacije. Prioni so majni proteini, ki so sposobni indukcije lastne replikacije.

Mutacije

Mutacija je podedovana sprememba v sekvenci nukleotidov nekega organizma. Ta sprememba mora biti stabilna. Predvsem so mutacije bile tiste, ki so omogočile nastanek novih rodov. Lahko je prišlo do prenosa celih genov iz enega organizma v drugi organizem. To je šlo lahko s transformacijo, kjer gre za prenos DNA brez vektorja. Ko celica razpade, se sprostijo kosi DNA in ti lahko vstopajo v novo celico. S tem pride do prenosa iz ene celice v drugo celico, ki pa ni nujno, da je sorodna. Naslednji prenos je s transdukcijo, kjer gre za prenos določenih genov s pomočjo bakteriofagov. Tretji način prenosa je konjugacija. Gre za prenos genov preko neposrednega stika dveh bakterijskih celic. Tu lahko preidejo samo plazmidi (izvenkromosomski deli DNA). Če sta gensko različni, potem ta bakterija dobi nove gene, katere prej ni imela (rezictenco,...)

Plazmidi – se lahko samostojno podvojujejo, lahko vstopajo v tuje celice na osnovi transformacije. Imamo še transfozone, ki so mobilni deli DNA molekule, ki se izrežejo in vgradijo v drugi del DNA, kjer povzročijo mutacijo. Po vsem tem mora slediti še genska rekombinacija. To je zamenjava med homolognimi deli DNA sekvence, ki omogoča vezavo v genom.

Mutacije:

Mutacija je podedovana sprememba v sekvenci nukleotidov nekega organizma. Ta sprememba mora biti stabilna. To pomeni, da se mutant razlikuje od starševskega genotipa, lahko se ali pa ne razlikuje v fenotipu.

Divji tip je iz narave izoliran sev

Avksotrof je mutant, ki za rast potrebuje snov, ki je sam ne more sintetizirati.

Prototrof je avksotrof, ki ponovno pridobi lastnost divjega tipa.

Nomenklatura:

Gen pišemo z malimi, poševnimi črkami. Črka pomeni zaporedje, kateri po vrsti je ta gen (*pfkA*)

Proteine pišemo vse z velikimi črkami ali pa samo prva črka z veliko in vedno pokončno. PFK ali Pfk.

Mutante označimo z malimi črkami, označimo gen in mesto mutacije z številko.

Fenotip označimo podobno kot proteine, z + ali -, kar pomeni da je sposoben sintetizirati histidin (His+) ali pa da ni sposoben -.

Mutacije pomenijo spremembo v genomu, ki ima lahko pozitiven, negativno ali pa sploh nima vpliva. Tako lahko govorimo o selekcijskih mutacijah (če mikroorganizme pridobi rezistenco na nek antibiotik). Če gre za mutacijo, ki povzroči samo spremembo pigmenta, je to neselekcijska mutacija (mikroorganizem ne pridobi nobene lastnosti za lažje preživetje). V evoluciji so bile mutacije spontane zaradi ionizirajočega sevanja, zaradi UV svetlobe in radioaktivnega sevanja, lahko pa zaradi napak pri podvojevanju dednega materiala. DNA polimeraza je manj zmorljiva in ima frekvenco napak 1/10 000 000 000. Pri tem pride do točkovnih mutacij, kjer pride do zamenjave ene same baze. Te so lahko tihe, če to zaporedje oz. triplet kodira enako aminokislino. Lahko se citozin zamenja z gvaninom in dobimo stop kodon (če je to na zaporedju TAC). Dobimo nonsens mutacijo, kjer se tvori dosti krajši protein kot bi se moral. Tretja mutacija je da se timin zamenja z adenino. Tako dobimo namesto tirozina arginin. Če je to v aktivnem mestu, potem se temu proteinu spremeni aktivnost. To je missence mutacija.

Drugi tip mutacij je premik bralnega okvirja, ki ga povzroči insercija ali delecija (vgraditev ali izguba). S tem se spremeni bralni ovir. Pri tem lahko nastane uporaben ali neuporaben protein. Te pogosto nastajajo kot napake pri genski rekombinaciji. Te delecije ali insercije so lahko nevarne, če nastopajo na področju kodirajoče regije, če pa so na promotorskih regijah, potem se RNA polimeraza ne veže z enako afiniteto, kar povzroči spremembo prepisa, ker je količina proteina odvisna od intezivnosti vezave. Če se RNA polimeraza močno veže, to pomeni, da se bo velikokrat vezala in da bomo imeli veliko proteina, če je pa obratno potem pa imamo malo proteina. Promotorske regije so tiste, ki se nahajajo pred strukturnimi regijami, kamor se veže RNA polimeraza.

Skozi evolucijo so se razvili mehanizmi za popravilo mutacij. Tako imamo revertante – s ponovno mutacijo povzroči premik mutiranega proteina nazaj v divji tip (fenotipsko in genotipsko). Lahko pa mutacije umilimo z mutacijo na drugem mestu. (protein se zopen normalno zviije). Supresorske mutacije – z njimi lahko dobimo fenotip divjega proteina, medtem ko genotip ostaja spremenjen. Poleg mikroinsecij in mikrodelecij pa lahko pride tudi do makro. Lahko se vstavi celoten gen ali pa se izbije. Tu niso možne supresorske mutacije, ni možno popravilo z točkovno mutacijo pač pa lahko popravimo z rekombinacijo. Lahko pride tudi do translokacij. Celotni predeli DNA molekul se lahko zamenjajo ali pa pride do inverzije, kjer se del DNA izreže, zavrti in ponovno vstavi notri.

Poleg supresorskih mutacij imajo predvsem še evkarionti mehanizme, ki popravljajo mutacije in tam delujejo specialni encimi. Ti so s.o.s. mehanizmi in so učinkoviti samo dokler se DNA ne podvoji. Pri popravilu takih napak pomaga komplementarna vijačnica, kjer ti encimi opazijo, da je prišlo do napačne vezave in to popravijo. Ti encimi pa niso zanesljivi in lahko sami povzročajo mutacije in napake. Pogostost

mutacij je lahko glede na sekvenco različna. Imamo lahko tako imenovana vroča mesta, za katera je večja verjetnost da bo prišlo do mutacije kot za druga mesta. Te spontane mutacije nastopajo v sekvenci ena proti milijon, pri transpoziciji pride do mutacij 1 proti 10000. Nonsense mutacija je ena na 100 milijonov. Bolj zavzeta za mutacije RNA kot pa DNA. Kar 1000x bolj, ker je RNA polimeraza manj natančna in pri RNA ni popravljalnih mehanizmov. Ta fenomen je predvsem pomembne pri RNA virusih. Ti bistveno hitreje mutirajo kot DNA virusi in se lahko hitreje privadijo in prehajajo iz nevirulentne v virulentno stanje (SARS, HIV,...)

Pri genski rekombinaciji pride do združitve dveh delov genomov in nastanejo hibridi. Tu sodeluje 25 različnih encimov. Do te izmenjave genskega materiala pride samo med homolognimi deli DNA molekul (sekvence morajo biti podobne). Dve taki molekuli se najprej približajo druga drugi. Nato v eni izmed teh pride do zareze v eni vijačnici (nick zareza). Nato proteini destabilizirajo zarezano vijačnico. Recipientsko DNA protein RecA razkrene to dvojno vijačnico, kamor vmes se prileže del druge DNA molekule. RecA kontrolira celotni proces zamenjave. Na koncu imamo recipientsko DNA, katera ima del vijačnice zamenjan. Dolžine zamenjanih predelov se razlikujejo. To metodo uporabljajo za pridobivanje genskih map. Če se dva dela velikokrat prenašata, potem to pomeni, da sta blizu skupaj na kromosomu in če se prenašata pogosto, potem nista blizu. Prenos je odvisen od pozicije genov v kromosomu. Ta proces je pomemben pri spolni reprodukciji. Pri evkarjotnih, kjer ni spolnega razmnoževanja, je to proces, ki sledi transdukciji, konjugaciji in transformaciji. Na osnovi rekombinacije se lahko opravi komplementacijski test, s katerim lahko ugotovimo, kje ima gen okvaro. S pomočjo teh testov so napravili celo serijo genskih map za bakterije, živali in tudi človeka. Danes se ta metoda, zaradi enostavnega sekveniranja ne uporablja več.

Transformacija

Gre za vstop proste molekule DNA v recipientsko celico, katera se s procesom rekombinacije vgradi v recipientske kromosome (to so ugotovili z poskusom, ko so miško okužili z virulentnimi, nevirulentnimi in mešanico prekuhanih virulentnih in dodanih nevirulentnih). Vstop molekule DNA v recipientsko celico je vezan na morfološko stanje celice. DNA mora preiti skozi membrano. Membrana ni vedno sposobna prepustiti molekulo DNA skozi sloj. Pri E.coli je za uporabo kompetentnih celic potrebna uporaba Ca^{2+} in Mg^{2+} ionov. Frekvenca transformacij je tako do 20%, normalno pa je samo 1%.

Stopnje transformacije:

Molekula DNA se pritrdi na specifične receptorje na površini celice. Ti so ponavadi proteinske narave. Najprej je ta pritrditev reverzibilna, nato pa postane ireverzibilna. Nato vstopi DNA v citosol. Pri vstopanju gre lahko notri enovijačna DNA ali pa dvovijačna. Vstopajo lahko le kratki fragmenti DNA molekule, ki nosijo samo nekaj genov. Pri nekaterih je potrebna določena sekvenca za prenos v notranjost. Takoj po prenosu proteini zaščitijo te fragmente pred nukleazami. V večini primerov potem pride do genske rekombinacije, ki vgradi te fragmente v kromosom. Pri plazmidih pa ne gre tako. Tam ostanejo ti fragmenti avtonomni v citosolu.

Transfekcija pri sesalcih pomeni vnos tuje DNA. Pri glivah in kvasovkah je potrebno za uspešno transformacijo odstraniti celično steno. S tem dobimo protoplaste. To se

potem dela z encimi. Z polietilenglikolom in kalcijem lahko potem v protoplastih naredimo pore, ki omogočajo prenos DNA. Lahko jih naredimo tudi z električnimi impulzi.

Transdukcija pomeni prenos DNA iz ene celice v drugo celico s pomočjo virusov. Generalizirana transdukcija pomeni prenos katerega koli dela okužene bakterije v drugo bakterijsko celico. Ob lizi celice pride do razpada kromosoma v celici in prenos delov v proteinske plašče. Proteinski plašč vsebuje sedaj samo fragmente bakterijskega kromosoma in nič virusne DNA. Lahko pa se prenese DNA v novo celico, kjer se mora ta DNA takoj vgraditi v nov kromosom. Če te homologne rekombinacije ni, potem je ta DNA izgubljena. Frekvenca tega pojava je 1 od milijon do 100 milijonov. Toliko virusnih partiklov nosi bakterijsko DNA in fagi, ki to prenašajo so lahko virulentni (okužijo takoj) ali pa temparentni (najprej se vgradijo in razmnužujejo).

Specializirana transdukcija je mogoča samo pri temparentnih fagih. Tu pride do prenosa s pomočjo virusa samo nekaterih specifičnih genov ob mestu vgraditve faga. Ko preide lizogena celica v litični cikel, se ta fagna DNA izreže in začne podvojevat. Ko pride v litični del cikla, se začne podvojevat. V določenih primerih pride do napačnega izreza in izrežejo se še geni od bakterije, ki so zraven tega mesta. Ta kompleks se začne podvojevat in dobimo partikle, ki nosijo poleg virusne DNA še del bakterijske DNA, ki je bila zraven. Normalno se izreže 1 do 2 gena, v izrednih primerih pa do cel klaster genov. (klaster genov – set genov, ki je pod istim promotorjem). Z lambda fagom se prenese Gal gen, kateri kodira β -galaktozidazo. Tu vedno nekaj fagne DNA ostane v bakterijski celici, nekaj pa je vedno manjka v virusnih partiklih, zaradi česar lahko postanejo nevirulentni.

Če ima bakteriofag pomoč helper virusa potem lahko prenese bakterijsko DNA.
ATT – omogoča sintezo proteinov v proteinskem plašču za pritrditev (attachment).
ORI – ta začne replikacijo DNA (origin – začetek)
COS – kohezivni konci virusne molekule DNA.

Samo tej trije predeli so lahko prisotni in s tem se lahko poveča količina bakterijske DNA. Pri specializirani transdukciji je stopnja pojva večja kot pri generalizirani, zato se uporablja v molekularni biologiji. Ti na novo vneseni geni se lahko vgradijo v recipientsko celico, po drugi strani pa se lahko samostojno podvojujejo.

Fagna koncerzija – ko bakterijska celica vsebuje profag, postane imuna za ponovno infekcijo z istim ali sorodnim fagom. Pri tem pride do spremembe v celični steni. Ta sprememba onemogoči naslednjim fagom, da bi njihova DNA molekula vstopila v tako celico. Velik procent bakterij izoliranih iz narave je lizogenih (vsebujejo virusno DNA).

PLAZMIDI

So ekstrakromosomalne molekule DNA. Večinoma so cirkularni plazmidi, ki se samostojno podvojujejo. Niso nujno potrebni za preživetje bakterije. Obstajajo neka podobnost z virusno DNA. Imajo samostojno replikacijo, ki je neodvisna od bakterijskega kromosoma. Obstaja pa samo intracelularna sinteza, ker ni proteinskega plašča za prenos. Prenašajo se lahko z konjugacijo ali pa direktno z transdukcijo. Normalna velikost je med 1-1000 kbp. Večinoma pa predstavljajo manj

kot 1/1000 bakterijskega kromosoma. Je dvovijačna DNA molekula, krožne oblike in za te je značilno, da so super zvite. Če v tej super zviti molekuli naredimo zarezo v eni vijačnici, dobimo okrogel plazmid. Če pa prerežemo obe vijačnici, potem pa dobimo linearno DNA. V naravi se lahko zgodi, da bakterijske celice plazmide izgubijo z replikacijo oziroma z nekaterimi substancami lahko inhibiramo podvajanje plazmidov, ne pa kromosomov. Ena takih substanc je etidijev bromid. (Ozdravljenje → brez plazmidov). Na vsakem plazmidu mora biti ORI mesto, kamor se veže DNA polimeraza. Pri gram pozitivnih bakterijah imamo dvosmerno podvojevanje DNA molekule oz tako imenovan teta tip replikacije. Nekateri pa se podvajajo samo v eni smeri. Encimi za podvojevanje pa so bakterijski. Pri gram negativnih bakterijah pa imamo tako imenovano kotaleče kolo, komplementarna vijačnica pa se sintetizira kasneje. Število kopij plazmidov v celici je različno. Lahko so od 1-3 kopije, v nekaterih primerih pa tudi 100 kopij enega plazmida. To je število kopij oz. copy number. To število je kontrolirano z genom na plazmidu ali bakterijskem kromosomu. Posamezna bakterijska celica ima lahko do deset različnih plazmidov. Nekateri so inkompatibilni (to so ponavadi sorodni – ne morejo biti notri).

Kakšne gene nosijo plazmidi?

Konjugativni plazmidi nosijo gene za F ali π piluse. To so zunanji izrastki. Nekateri lahko nosijo rezistenco na antibiotike, sulfilamide, težke kovine. Nekateri nosijo gene, ki sintetizirajo toksične substance. Nekateri nosijo gene za bakteriocine – to so kratki peptidi, ki so toksični za sorodne vrste bakterij. (Pri E.coli → holicini).

Pri streptomicetah je cela vrsta genov za antibiotike vezana na plazmide. Vezane so lahko tudi fizikalne lastnosti (N_2 , urea, za vire elementov, razgradnja oktalena, ksenobiotikov (ksenobiotiki so substance, ki jih je sintetiziral človek).

Bakterijska konjugacija

Gre za prenos genskega materiala med dvema bakterijama, vendar je tu potreben neposreden stik. Kontrola konjugacije je vezana na gene, ki so na F-plazmidih (ti so sposobni sinteze F-pilusov).

F plazmid je prisoten samo v donorski celici, akceptorska celica pa ima prisotne samo določene receptorje, ki vežejo ta F pilus. Ko je ta stik vzpostavljen pride do prenosa plazmidne DNA istočasno pa mora priti do podvojevanja DNA (plazmidno kolo). Prenaša se samo enojna vijačnica DNA. Komplementarna se mora sintetizirati v recipientski celici. Gen za začetek prenosa je vezana na ORI+ mestu. Dodamo F+ iz F-. V določenih primerih se F plazmidi vgradijo v is (insercijska sekvenca) mesta. Dobimo integriran epison in celica preide v Hfr+ (visoka frekvenca rekombinacije) obliko. V tem primeru se ob konjugaciji ne prenaša samo plazmid DNA ampak se prenaša celotni bakterijski kromosom, kamor naj bi bil vgrajen ta plazmid. F plazmidi se ob določenih pogojih lahko izrežejo iz kromosoma. Istočasno se lahko izreže tudi nekaj kromosomskih genov. Ti se lahko z veliko večjo frekvenco prenašajo iz ene bakterije v drugo bakterijo. Poleg F so TRA plazmidi, ki vsebujejo transfer gene. Pri nekaterih je mogoč samo vrstni prenos, pri nekaterih je možno med rodovi, drugi pa spet omogočajo širši prenos.

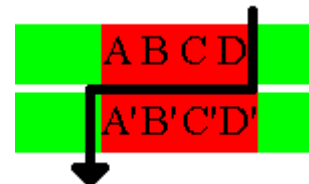
Transpozoni so premični deli DNA molekule (skakajoči geni). Odkrili so jih z analizo bakterijske genomske mape. S tem so ugotovili, da so eni geni obrnjeni v eno smer, drugi pa v drugo. Teje geni niso stabilni, saj se lahko izrežejo in obrnejo. Tem preureditvam pravimo transpozicija. Je redek pojav s frekvenco 1/10000-1/10000000 celic v neki generaciji pride do tega pojava. Prenašajo se lahko samo določeni geni,

ki so vezani na transpozicijske elemente. Te so najprej odkrili pri rastlinah (koruzi), nato pa še pri bakterijah. Imamo tri tipe transpozicijskih elementov:

- IS sekvence (insercijske)
- Transpozoni
- MU – bakteriofag

IS sekvence nosijo zapis za en gen. Ta kodira encim transpozazo (omogoča izrez teh struktur in prenos drugam). Na obeh koncih tega elementa imamo obrnjene terminalne podvojitve sekvenc. Velikost teh je od 40-1000 baznih parov. Značilno za IS sekvence je da ne nosijo dodatne genske informacije. Najdemo jih na bakterijskem kromosomu, plazmidih in nekaterih bakteriofagih. Nastopajo lahko v več kopijah in omogočajo homologno rekombinacijo plazmida v kromosomu in celotno integracijo.

Transpozoni so iz obeh strani omejeni z IS sekvencami. Vmes je še fragment DNA, ki nosi katerekoli druge gene. Nujno pa mora vsebovati gene za transpozazo, kajti ta omogoča mobilnost teh delov. Transpozaza izreže zapis ob koncu IS sekvenc in sprosti celoten transpozon iz večje molekule DNA. Ta tudi zazna tarčno sekvenco nekje drugje na plazmidu in tam zareže to vezavno mesto na način, kot je prikazano na sliki. Nato se te razmaknejo in vmes se vgradi transpozicijski element, ostali deli te sekvence se pa podvojijo.



MU elementi pa se lahko vgradijo – integrirajo kjerkoli na kromosomu. Transpozicija je neke vrste rekombinacijski proces, samo ne med homolognimi mesti. Transpozone delimo glede na tip prenosa v dve skupini:

- Konzervativni transpozoni
- replikativni transpozoni

Pri konzervativnih transpozonih gre samo za izrez fragmentov DNA in premestitev, pri replikativni pa se transpozoni med samim procesom namnožijo, kar povzroči povečanje števila.

Kakšen je efekt te vgradnje?

Če se transpozon vgradi v gen v kromosomu, dobimo nefunkcionalen gen (če gre za strukturni gen). Nekateri transpozoni so naravni mutageni (kot npr bakteriofag MU). Uporabljajo se pri molekularni biologiji, kot biološke mutagene. Na sam kromosom lahko vgradimo npr. rezistenco na antibiotike, ter sekvence, ki povzročijo mutacijo MO. Transpozoni lahko povzročijo nestavilnost genskega potenciala. Pri prenosu transpozona oz. pri vgradnji, se ta lahko vgradi v eni ali drugi smeri in tako vpliva na ekspresijo genov. Določa smer branja zaporedja.

Integrioni so med transpozoni pomembni, saj nosijo gen za encim integrazo. Ta integraza lahko izreže gene iz kateregakoli vira in jih vgradi v transpozon pod kontrolo transpozonovega promotorja. Tu gre za horizontalni prenos genov med različnimi organizmi. Ti nosijo lahko cele kasete genov, kjer je vezana rezistenca ali katere druge lastnosti. Med evolucijo je imel prenos genov z integrioni pomembno vlogo.

Regulacija metabolizma

Prilagajanje metabolizma spremembam v okolju je omogočilo mikroorganizmom preživetje v naravi. Pogoji v naravi niso konstantni, se stalno spreminjajo (T, fizikalni dejavniki,...). V celici poteka na tisoče različnih reakcij, vendar ne potekajo istočasno in z enako intenziteto. Nekateri metaboliti nastopajo v visokih koncentracijah, nekaterih pa v nizkih. Normalne koncentracije so od 1 μmol do 1 mmol. Nekateri lahko nastopajo tudi v 100mmolarnih koncentracijah. Taki so osmo regulatorji (za ozmotski pritisk, kot je to glicerol). V celicah imamo kontrolo metabolizma na dveh nivojih. Prvi je regulacija encimske aktivnosti – postranslacijska regulacija, druga je regulacija količine proteina tu sodeluje transkripcija in translacija (regulacija na nivoju transkripcije ali translacije).

Kako vse lahko pride do kontrole encimske aktivnosti?

Aktivnost encima je premo sorazmerna z koncentracijo encima. Več kot ga je, večja je specifična aktivnost. Lahko je prvotno encim sintetiziran kot prekursorjski protein, ki ni aktiven in z odstranitvijo dela tega prekursorjskega proteina s proteazami se oblikuje aktivni encim. Proteaze pa tudi aktivne encime razgrajujejo, tako da ima vsak encim svojo življenjsko dobo. Tu govorimo o turn over procesu (pomeni, da pri ustavitvi pretvorbe iz gena v encim, koncentracija tega encima počasi začne upadati). Na nivoju samega encima pa lahko to uravnavajo majhne molekule, ki lahko alosterično spremenijo molekulo.

Če se efektorji vežejo na alosterična mesta, potem lahko spremenijo obliko aktivnega mesta in tako substrat ne more več priti v to režo (če je efektor inhibitor), da bi se razgradil. Tu govorimo o inhibiciji. Zelo pogosta je inhibicija povratne zveze. Vse encimske reakcije so v kemijskem ravnotežju. Če je produkta več, kot substrata, poteka razgradnja, če je obratno, se proces obrne. Če se ta produkt potem porabi, teče celotna metabolna pot neovirano, če pa se produkt kopiči, lahko ta inhibira enega od encimov na začetku metabolne poti in to je inhibicija povratne zveze (produkt vpliva na aktivnost prvega encima). To je pogosto pri sintezi aminokislin.

Pri regulaciji encimov gre lahko tudi za kovalentno, ni nujo da je samo alosterična. Pri kovalentni gre za vezavo delov drugih molekul na proteinsko molekulo, lahko gre za fosforilacijo, metilacijo, vklopitev ATP. Fosforilacija je izredno pomemben proces pri signalni transdukciji (od okolice do spremembe karakteristike encimov).

Drugi nivo regulacije je na nivoju genov. Ta regulacija v končni fazi potem rezultira v spremenjeni koncentraciji določenega proteina in glavna regulacijo ekspresije uravnavajo regulatorne proteinske molekule. Te morajo biti sposobne neke interakcije med proteinom in nukleinskimi kislinami. Vežejo se na DNA molekule. V tem primeru gre lahko za nespecifično vezavo. Primer pri histonih – proteini, ki stabilizirajo DNA molekulo. Drugi so pa tisti, ki se vežejo na specifična mesta. Na določeno sekvenco nukleotidov. Vse proteine lahko glede na to kako se sintetizirajo razdelimo:

- konstitutivni proteini → sinteza stalno poteka, ne glede na to kaj se dogaja v okolju in ne glede na to v kakšni fazi je celica. Ponavadi so vezani na ekspresijo s promotorji, ki šibko vežejo RNA polimerazo. To pomeni, da sinteza sicer stalno poteka ampak ne z zelo hitro reakcijo. Specifično zaporedje na teh promotorskih regijah omogoča večjo oz. manjšo afiniteto in s tem bolj pogost oz. manj pogost prepis gena v RNA. (promotor zaporedje pred genom, kamor se veže RNA polimeraza. Afiniteta vezave je odvisna od

sekvence nukleotidov v tej promotorski regiji. Močnejše kot se veže, večji je prepis in obratno). Konstitutivni promotorji so šibki promotorji.

- Inducibilni encimi, kjer se prepis genov inducira oz. začne samo ob določenih pogojih, ki so lahko vezani na neko spremembo v gojišču ali pa na sam celični cikel. Pri teh promotorjih igrajo pomembno vlogo regulatorni proteini, ki so sposobni specifične vezave na DNA molekulo, ki spoznajo specifično sekvenco nukleotidov. V tem primeru gre za dimerne proteine, kjer vsaka od podenot spozna določeno sekvenco in se veže v vijačnico. Večinoma se ti regulatorni proteini lahko vežejo na nek predel DNA, kjer imamo inverzne ponovitve sekvence DNA (zaporedje, ki je na eni strani na zgornji vijačnici je enako zaporedju, ki je na komplementarni vijačnici na drugi strani tega mesta). Teh proteinov je več vrst. Eni imajo motiv dvojnega heliksa, potem so tako imenovani Zn finger structure (cink prstna struktura). Tej imajo vgrajen Zn in heliks, ki se veže na stabilen del. Lahko pa imajo levcinsko zadrgo. Levcini se v določenih enakomernih razdaljah ponavljajo v dveh domenah. Ti proteini se morajo vezati na določena mesta na DNA, ki naj bi se nahajala med promotorsko regijo in geni. Ti se vežejo na predel operatorja. S tem fizično onemogočijo RNA polimerazi, da bi stekla preko genov in da bi jih prepisala v m-RNA.

Par definicij za izraze pri genih:

Opretator – predel DNA, kamor se veže regulatorski protein.

Promotor – predel kamor se veže RNA polimeraza

Klaster genov – skupina genov pod kontrolo enega operatorja.

Celotni tej regulacijski enoti (promotor, regulator in klaster genov) pravimo operon. To je značilno za prokariotske organizme. Pri evkariotskih je samo en promotor in en gen.

Regulon – je več operonov, ki so pod kontrolo istega regulatorskega proteina. To pomeni, da se v operatorske regije lahko veže en in isti regulatorski protein.

Kako poteka ta proces regulacije oz kako se to izraža v samem sistemu celičnem:

Imamo primer, kjer imamo minimalno gojišče, kjer je samo ogljik v organski obliki. Arginina ni, tako da ga mora mikrob sam sintetizirati. Ko pa dodamo arginin v gojišče, celica enako nadaljuje z enako hitrostjo rasti, vendar se encimi ne sintetizirajo (za arginin) in ostanejo na istem nivoju oz začne počasi upadati. Drug primer je kjer imamo minimalno gojišče, v začetnem delu je kot vir C prisotna glukoza, celice lahko rastejo, po določenem času pa damo v gojišče laktozo, ki inducira sintezo encima β -galaktozidaza. Tu gre za spodbujeno sintezo encima, v prejšnjem primeru pa zavrtje prepisa genov za encim.

Kako poteka indukcija na nivoju prepisa gena m-RNA?

Rekli smo, da se na operatorsko regijo veže regulatorna molekula, v tem primeru je to represor in fizično onemogoči RNA polimerazi prepis genov, ki se nahajajo na 3' koncu. To je normalen primer, ko se nič ne dogaja v okolju, je represorska molekula vezana na regulator. V primeru da dodamo v gojišče nek induktor, ki je vezan na metabolizem produkta teh genov, se ta veže na represorsko molekulo, spremeni njegovo alosterijo in ta več ni sposoben vezave na molekulo DNA in se sprostí iz tega operatorskega mesta in RNA polimeraza lahko prepíše gene v klastru in sproži sintezo proteinov. Primer je laktoza, če jo damo v gojišče, vstopi v celice in molekule se vežejo na represorske molekule, te spremenijo svojo alosterijo, ne morejo se več

vezat na operatorsko regijo in sintetizira se β -galaktozidaza. Imamo celo vrsto umetnih analogov, ki oponašajo induktorske molekule. Proces regulacije na nivoju encimov je dosti hitrejši, kot pa ta z analogi.

To do sedaj je šlo za negativno kontrolo transkripcije z represorskimi proteini. To je bilo to do zdaj, ker represor onemogoči RNA polimerazi prepis teh genov.

Drug princip pa je ta, da represor ni sposoben najprej vezat se na operatorsko regijo, pač pa šele ob molekuli korepresorja, ki se veže na regulatorni protein, spremeni njegovo strukturo, in tako se lahko veže na operator in zopet ni prepisa v RNA. Pri negativni so dva principa:

- represor se prvotno lahko veže na operator in onemogoči prepis genov v RNA. Ko se veže induktor.

v drugem primeru pa najprej ni sposoben vezave in šele ob prisotnosti nekega korepresorja, pride do prekinitve prepisa. Korepresorji so majhne molekule, ki se nahajajo v okolici, gojiščih, lahko pa so metabolni produkti. Za razliko od negativne imamo še pozitivno, kjer nimamo operatorskih regij, pač pa so takoj strukturni geni (pri evkariontih samo en). Tu imamo regulatorne proteine, ki so ponavadi aktivatorski, ki se vežejo na RNA polimerazo. Ob prisotnosti nekega induktorja je ta aktivatorski protein sposoben vezave na RNA polimerazo in spet vezava tega kompleksa na polimerazo omogoči stik RNA polimeraze s promotorsko regijo in prepis tega gena v RNA. Ta kompleks omogoči alosterično vezavo RNA polimeraze na promotor. Primer tega je pri E.coli maltoza, katera se veže na maltozni aktivator in omogoči prepis s polimerazo. Maltozni aktivator lahko aktivira več operonov in v tem primeru govorimo o regulonu. Pri E.coli imamo določene gene pod pozitivno kontrolo, določene pa pod negativno kontrolo. Pri evkariontskih je vedno prisotna samo pozitivna kontrola. Negativne pa ni, ker ni operatorskih regij. Vedno je samo promotor in en sam strukturni gen.

Lahko imamo več klastrov genov oz več regulonov pod kontrolo enega samega represorskega proteina. Ta kontrola poteka glede na razmere v okolju. Pri E.coli, če jo gojimo v gojišču brez fosfata in ga nato dodamo, se aktivira prepis približno 80 genov. Cela serija operonov se aktivira. Še večja enota kot so reguloni so stimuloni, kjer gre za aktivacijo cele skupine genov različnih regulonov, ki pripravijo celo vrsto različnih encimov, za pripravo kosila (vira snovi). Pod globalno kontrolo spada tudi proces glukozni efekt, ki je prisoten pri celi vrsti mikrobov. Pri tem gre za pojav da prisotnost glukoze kot vira ogljika v gojišču prepreči uporabo drugih virov ogljika v gojišču. Npr. če imamo gojišče z glukozo in laktozo, bo najprej porabil vso glukozo, nato pa šele laktozo. To pomeni, da glukozna na nekakšen način prepreči sintezo encimov, ki so potrebni za razgradnjo laktoze. Na nivoju rastne kinetike se ta pojav izraža v diavksični rasti. Če imamo gojišče z laktozo in glukozo, bo mikrob rasel z določeno hitrostjo v prvi eksponentialni fazi, nato se bo rast ustavila, se bodo sintetizirali encimi, in prešla bo celica v eksponentialno rast, vendar tu z drugim virom C.

Kakšen je regulacija na nivoju prepisa DNA v RNA. Tu vedno sodeluje katabolni aktivator protein (CAP). Ta cap protein se lahko veže na m-RNA polimerazo, samo ko je prisoten še ciklični AMP (cAMP) določeni koncentraciji v celici. cAMP je kot induktor v tem primeru. Vendar pa glukozna inhibira delovanje adenilat ciklaze (ta ciklizira ATP v cAMP). cAMP potem deluje kot induktor, veže se na CAP aktivatorski

protein, ki se lahko potem veže na RNA polimerazo, ta pa potem lahko prepíše gen za β -galaktozidazo v m-RNA. In ko naraste koncentracija cAMP, se lahko začne sintetizirati encim za razgradnjo galaktoze. To je fenomen katabolne represije. Pod to represijo so amilaze. (rezistenca na katabolno represijo – mutanti, ki so sposobni razgrajevati več tipov ogljika istočasno).

Bistvene razlike v regulaciji metabolizma med prokarioti in evkarioti.

Pri prokariotih imamo praviloma prepis več kot enega gena v m-RNA in dobimo policistronsko m-RNA molekulo. Pri evkariotih praviloma vedno pride do prepisa enega samega gena v m-RNA, ki ima velikokrat tudi introne, kateri se morajo izrezati iz m-RNA-ja preden preide celotni sistem v translacijsko fazo. Pri prokariotih ni intronov. Pri evkariotih ni prave negativne kontrole (ni regulatornih proteinov, ki bi se vezali na DNA molekulo, ampak se vežejo na RNA polimerazo). Pri evkariotih je samo pozitivna kontrola. Pri prokariotih imamo operone, ki je sestavljen iz promotorja in operatorja, kateremu sledi klaster genov, ti geni v kalstrijih ponavadi kodirajo encime, ki sodelujejo pri metabolni poti. Pri evkariotih govorimo o monocistronski RNA, ki je praviloma večja in dobimo velikokrat velike proteine z veliko molekulsko maso, ki so podvrženi postranslacijski modifikaciji (pogosteje kot prokariotski). Pri tem sodelujejo proteaze, ki odceplajo dele molekul, ki potem tudi spreminjajo protein. Velikokrat pa na indukcijo prepisa določenih genov v produkte sodelujejo tudi mehanizmi prenosa signalov, prenos signalov poteka preko določenih sekundarnih prenašalcev signalov, pomembna molekula je tudi cAMP, določeni sensorji v membrani zaznajo spremembo v okolici in s tem se lahko sintetizira cAMP, ki po eni strani aktivira proteinske kinaze, to so encimi, ki lahko foforilirajo tarčne encime in na ta način spremenijo njihovo aktivnost, po drugi strani pa lahko tak sekundarni prenašalni signal kot je cAMP lahko sodeluje na nivoju ekspresije genov. Odgovor preko indukcije genov je počasen proces, ki se zazna šele čez nekaj ur. Na indukcijo cAMP lahko vplivajo različni stimulusi (vplivi iz okolja), eden je izraba glukoze iz gojišča, lahko pride tudi kakšna druga hranilna snov pod mejo in sproži ta signal (poraba N_2) ali pa so fizikalni dejavniki, kot so temperaturni šok, hipoozmotski šok, oksidacijski šok. Se pa razlikujejo pri mikroorganizmih. Lahko je Ca^{2+} , ki se veže na kalmodulin in aktivira proteinske kinaze. To prilagajanje, omogoči mikroorganizmu preživetje v okolju. Tisi, ki se niso prilagajali, jih sedaj ni več ;).

Metabolizem oziroma metabolna raznolikost

Metabolizem so vse reakcije, ki potekajo v celici (metabol – spremeniti).

Vsaka celica potrebuje za obstoj energijo v obliki kemijsko vezane energije ali svetlobne energije, potrebuje še gradbene elemente in končne akceptorje elektronov. Vse to moramo celici zagotoviti, da lahko uspeva na gojišču. Reakcijam, pri katerih pride do sproščanja energije pravimo katabolizem. Pri tem je večinoma glukoza kot vir energije. Prav tako iz katabolnih reakcij izvirajo gradbeni elementi, ki se vgradijo v celico. Imamo še anabolizem, kjer se ti osnovni gradbeni elementi vgradijo v kompleksnejše molekule. Pri tem se porablja energija v obliki ATP oz NAD^+ ali $NADP^+$.

Na začetku evolucije so bile primarni vir energije anorganske molekule, katere so kasneje zamenjala organske molekule. Nekateri mikroorganizmi so bili sposobni pridobivati energijo iz svetlobe, najprej so bili to enostavni fotosintetski mikroorganizmi, kasneje pa so se razvili oksigeni fototrofi, ki so uporabljali za vir

elektronov vodo, sproščali pa so kisik. Litotrofi pa lahko pridobijo energijo iz različnih anorganskih substanc.

Anabolizem:

- avtotrofi (ogljik pridobivajo iz anorganske oblike (CO₂). Ti organizmi so bili tudi primarni reducenti anorganskih spojin).
- Heterotrofi (sposobni so pridobivati C samo iz organskih spojin. To so ali paraziti ali pa saprofiti (uporabljajo nežive organske materiale).

Terminalni akceptorji elektronov

Kot organske komponente pri organolitotrofih ni obvezno, da so sladkorji, pač pa so lahko to še katere druge substance (nekateri mikroorganizmi lahko razgrajujejo nafto, ksenobiotike,...).

Viri dušika

Te spojine so ključnega pomena pri sintezi aminokislin. Dušika je malo v obliki nitratov, veliko pa se ga nahaja atomarnega v atmosferi. To je oblika, ki je za večino mikroorganizmov nedostopna oz neuporabna razen za nitrifikacijske bakterije, katere lahko vežejo atmosferski dušik. Te ponavadi živijo v sožitju z drugimi organizmi.

Oksidacija – odstranjevanje elektronov iz nekega substrata.

Redukcija – dodajanje elektronov substrata.

Elektronski donator – reducent → so substance, ki imajo tendenco po oddajanju elektronov.

Elektronski akceptor – oksidant ima tendenco po sprejemanju elektronov.

Redukcijski potencial je podana v voltih, meri pa se z elektrolitsko napetostjo in pove nam o tendenci neke substance, ali je boljši donator oziroma akceptor elektronov. Ta redoks potencial je odvisen od koncentracije protonov in vse meritve so standardizirane proti pH = 7.

Večinoma so vse molekule in donator in akceptor. Kaj od tega pa so, je odvisno od reakcije, v kateri sodelujejo. To nam najbolje predstavi elektronski stolp, v katerem so oksidoredukcijski pari (redoks pari). Pri teh parih govorimo vedno o vezanih reakcijah in tak stolp nam prikaže prenos elektronov. Na koncu vrste so terminalni akceptorji elektronov: O₂, Fe³⁺, NO₃⁻. Nižje kot so na elektronskem stolpu, več energije se ob prehodu sprosti.

Elektroni so vedno vezani na neko substanco. Lahko je organska ali anorganska molekula. Pri metabolizmu imamo več vrst prenašalcev. Nevezani prenašalci (NAD⁺ in NADP⁺). Ti so prosti v citosolu. NADP⁺ direktno vstopa v oksidoreduktivne procese, NAD⁺ pa vstopa v elektronski transport preko oksidativne fosforilacije, kjer imamo membransko vezane prenašalce (citokrome), ki so dejansko koencimi.

Fotosinteza

Fotosinteza je pridobivanje energije s pomočjo svetlobe. Je najpomembnejši proces, ki poteka v klorofilih. Svetloba se sprejema v obliki kvantov. Celotni proces razdelimo na dva dela:

- svetlobna faza – svetloba se pretvori v kemijsko energijo (ATP, NADH)

- temotna faza - ta energija se porabi za redukcijo CO₂

Elektroni za redukcijo CO₂ pridejo iz NADPH. Temna faza je neodvisna od svetlobne. ATP in redukcijska energija lahko pridejo tudi od druge. Pri bakterijah imamo anoksigeno fotosintezo, kjer elektroni izvirajo iz vodikovega sulfida oz. iz nekaterih organskih snovi (škrlatne in zelene bakterije). Pri ciano bakterijah in evkariontih imamo oksigeno fotosintezo. Elektroni za NADPH izvirajo iz molekule vode. Pri tem se sprošča kisik. Fotosinteznega procesa nebi bilo, če nebi bil prisoten pigment – klorofil, ki je lahko bakterijski ali evkariontski (se malo razlikujejo). Za vse klorofilne molekule pa je značilen porfirinski obroč, ki ima v sredini vezan Mg. Ob tem porfirinskem obroču so še dolgoverižne hidrofobne alkoholne molekule (fitol, veže strukturo na membrano). Samo pri rastlinah imamo več tipov klorofila. Klorofil A je osnovni klorofil, ki ima dva absorpcijska maksimuma pri 430 in 680 nm, pri 600nm ima pa minimum (pri 600nm je zelena barva). Klorofil B je zelo podoben le da ima absorpcijski maksimum pri 660nm. Pri bakterijah ravno tako nastopa različica klorofila A, ki ima pri ciano bakterijah absorpcijski maksimum pri 680nm, pri škrlatnih in zelenih bakterijah pa ima klorofili pri adsorpcijski maksimum pri 1020nm, 850nm, 750nm. Klorofil A in bakterijski klorofil se razlikujejo v strukturi, pri obeh pa se nahaja purfirinski obroč z magnezijem.

Kje je klorofil lokaliziran?

Vedno je vezan na membransko strukturo. To so fotosintetske membrane. Pri evkariontih so že bolj kompleksne strukture. Kloroplasti so sestavljeni iz tilakoid in te tvorijo grana. Te klorofili so v kompleksu 200-300 molekul skupaj, zraven pa so še druge molekule (proteinske), ki omogočajo da te klorofili čim bolj učinkovito ujamejo svetlobo in jo potem posredujejo v reakcijski center. Ta center je pri evkariontih P7100 (to je klorofilna molekula v reakcijskem centru, ki ujame kvant svetlobe). Z ujeto energijo se tvori protonski gradient, kateri se potem porabi za sintezo ATP-ja.

Pri prokariotih pa ni organelov, ni kloropalstov, vendar pa so klorofilne molekule vezane na intracelularne membranske strukture. Lahko gre samo za invaginacijo (nagubanje) membran, kot je to pri škrlatnih bakterijah. Pri Heliobacteriumu, ki so gram pozitivne bakterije je klorofil vezan na citoplazemsko membrano, medtem ko pri zelenih žveplovih in nežveplovih imamo pa že malo bolj zapleteno strukturo. To so tako imenovani klorosomi. Tu gre za z membrano obdano strukturo, kjer imamo reakcijski center (25-30 klorofilnih molekul), okrog pa so antenske klorofilne molekule, ki lovijo svetlobo različnih valovnih dolžin in jo kvantno predajajo v reakcijski center. V tem sklopu so lahko potem tudi določene proteinske molekule, ki pritrjujejo klorofilne molekule na membrano.

Anoksigena fotosinteza.

Gre za podoben tok elektronov, kot pri respiratornem toku (oksidativna fosforilacija), čeprav tu nastopajo tudi drugi prenašalci elektronov. Vsi tej elektronski transporterji so vezani na membranske strukture in tok elektronov poteka od bolj negativnega k bolj pozitivnemu redoks potencialu. Kako je strukturno sestavljen?

Gre za 4 membransko vezane pigmentne proteinske komplekse in za ATP-azni kompleks. Prvi kompleks je sprejemnik svetlobe oz antena 1, kjer se nahaja bakterijski klorofil B870. Naslednji kompleks je drugi sprejemnik svetlobe ali antena 2, z bakterioklorofilom B850. V vseh teh primerih gre za bakterioklorofil A. Obe anteni služijo samo za sprejem svetlobne energije in za usmerjanje v reakcijski center. Tretji je citokrom BC1. To je identični protein, kot pri oksidativni fosforilaciji. Na koncu je

proteinski kompleks reakcijskega centra (tu je še specialni par klorofila A). Tega obdajajo trije različni polipeptidi. To so transmembranski z oznako M, L in H. Ti polipeptidi fiksirajo bakteriofilne molekule, dve molekuli bakteriochlorofila A (ni znana funkcija), dve molekuli bakterio feofitina (to je klorofil A brez Mg), dve molekuli kinona in dve molekuli karetenoit-a. To je kompleks z 4 membransko vezanimi pigmentnimi proteinskimi kompleksi. Poleg teh imamo še citokrom C2, ki se prosto giblje po periplazmatskem prostoru in prenaša elektrone.

Kako poteka tok elektronov med temi kompleksi?

Najprej gre svetlobna energija do reakcijskega centra, tu udari v specialni par bakteriochlorofilnih molekul A. ta par se spremeni v močnega reducenta. Njegov redukcijski potencial skoči od +0,5V do -1V. Tako potem reducira akceptorsko molekulo z nižjim potencialom, to je bakterio feofitin. V tem primeru gre za izredno hitro reakcijo ($3 \cdot 10^{-12}$ s). Po tem sledi redukcija kinona, ki se nahaja na obrobju reakcijskega centra in gre tudi za hitro reakcijo, ki poteče prej kot v 10^{-9} . Ta molekula se potem sprosti v tako imenovani kinoski pul (predel, kjer je večja koncentracija kinonov). Ob prehodu elektronov skozi ta kinonski pul, pride do sproščanja energije, ki se porabi za transport protonov preko membrane. Nadaljnje reakcije so počasnejše potekajo v ms. Elektroni gredo na citokrom PC1 in C2, pri nekaterih gre tudi na Fe-S protein in na ferodoksin. Iz C2 se lahko elektron prenese nazaj v reakcijski center. V tem primeru gre za ciklično fosforilacijo, ker elektroni tečejo v zaprtem krogu in tu ni potrebe po zunanjih elektronskih donorjih. ATP sintaza je podobna kot pri normalni aspiraciji.

Za fiksacijo CO_2 ni zadosti ATP, pač pa je potrebna še redukcijska moč kot je NADPH. Da se ta lahko tvor pa sistem potrebuje elektrone, ki morajo v sistem vstopiti od elektronskih donorjev. Ti donorji pri anoksigeni fotosintezi so H_2S , lahko tudi elementarno žveplo ali pa tiosulfati. Pri nekaterih mikrobi so sposobni dobiti elektrone od H_2 , vendar je potrebna tu hidrogenaza. Tudi nekatere organske substance sukcinat, malat butirat lahko služijo kot donorji elektronov. Elektroni iz teh donorjev izstopijo v sistem na nivoju citokroma C2. Da elektroni pridejo na višji nivo je potreben reverzni tok elektronov, za kar se porablja energija, ki se pridobiva iz protonskega gradienta. Če želimo tvoriti NADPH, pa je potreben obrnjen elektronski tok.

Pri zelenih žveplovih bakterijah so nekoliko drugačni klorofili in tudi redoks potencial teh je nekoliko drugačen. Pri zelenih žveplovih bakterijah pa imamo že klorofil A, ki je na nekoliko višjem energetske nivoju, iz katerih potujejo elektroni na ferodoksine in ti potem lahko sodelujejo v kalvinovem ciklu. Podobno je pri heliobacteriumu (g+). Tukaj so spet malo drugačni klorofili. Nastopajo hidroksi klorofil A. Elektroni se oddajo na protein, ki vsebuje Fe-S, na ferodoksin in končno pride do sinteze NADH. Pri teh bakterijah nimamo reverznega toka elektronov in enaki cikel lahko sodeluje pri tvorbi ATP-ja in pri tvorbi reduciranih molekul, ki sodelujejo pri fiksaciji CO_2 .

Pri oksigeni fotosintezi (aerobni) imamo sistem, kjer gre za produkcijo ATP in NADPH. Tu imamo dva fotosintezna sistema, tak sistem se je razvil pri ciano bakterijah. V prvem fotosistemu imamo klorofil A imenovan B700, v drugem pa je v reakcijskem centru klorofil A z oznako P680. Ti pigmenti so zopet vezani na membranske strukture (kopice membranskih struktur, ki se nahajajo v citoplazmi in vsebujejo ta pigment). P680 ima bolj pozitiven redukcijski potencial kot redoks par kisik/voda, zato lahko elektron preskoči iz molekule vode na P680 v oksidiranem

stanju. Oksidiran klorofil A P680 sprejme kvant svetlobe, potem ko je že sprejel ta elektron in pride do redukcije. Dvigne se molekula na višji redukcijski nivo in postane zelo močen reducent. Ta elektron potuje preko feofitina (klorofil A brez Mg), potem kinoni, citokromi, plastocianin (pigment, ki vsebuje Cu). Iz tega plastocianina pride do reakcijskega centra P700 in ta P700 v oksidiranem stanju lahko sprejme kvant svetlobe, ki jo dvigne na višji redukcijski nivo in od tu potem spet potuje elektron naprej preko nekih vmesnih stopenj, ki niso raziskane do ferodoksina (Fe-S protein) in končno pride do redukcije NADP^+ v NADPH. Pri oksigeni fotosintezi je primarni produkt fotosinteznega mehanizma reducirana oblika NADPH. Sinteza ATP pa lahko poteka v normalni oksidativni fosforilaciji, kjer NADPH odda elektron citokromu oksidativne fosforilacije oz. lahko pride do elektronskega toka tudi med fotosistemom II in I, kjer se sproščanje te energije porabi za tvorbo protonskega gradienta. ATP se lahko pri oksidativni fotosintezi tvori na dva načina, lahko z NADPH ali z cikličnim sistemom fotosinteznega sistema I. Pri oksigenih fototrofi (alge) lahko poteka anoksigena fotosinteza, če ni na razpolago vode kot donorja elektronov. V tem primeru poteka ciklična fosforilacija z fotosistemom I za tvorbo ATP. Za tvorbo NADPH-j pa moramo dobiti elektrone iz H_2 ali pa iz H_2S (alge vodik, ciano bakterije H_2S).

Pri fotosintezi lahko nastopajo tudi karotenoidi, ki lahko absorbirajo svetlobo v drugem vidnem spektru in za prenos svetlobe v območje klorofilov, oz. imajo lahko tudi fotosintezno vlogo, preprečujejo fotooksidacijo. Fikobili proteini so pomožni pigmenti pri cianobakterijah in pri rdečih algah. Fikoeritrini (550nm) oz fikocian (620nm in 640nm) ti omogočajo tudi fotosintezo pri izredno nizki intenziteti svetlobe. Nekatere alge živijo globoko v morju, čeprav svetloba pride do 200 pod gladino.

Temotna faza:

Tu gre za avtotrofno fiksacijo CO_2 . (kalvinov cikel – redukcija CO_2 do organske molekule → fruktoza oz. fruktoza 6fosfat. Gre za reduktivni pentozni cikel). Celoten cikel lahko razdelimo v tri sklope:

Najprej sprejme molekulo CO_2 ribolozna bis fosfat dobimo fosfogliceratno kislino, to reakcijo katalizira ribolozna bis fosfat karobksilaza (rubisco). Ta kislina je še vedno na istem energetskem nivoju, ima enak redosk potencial kot CO_2 . V naslednji fazi je treba ta potencial spraviti na nivo ogljikovih hidratov. Za to sta potrebna energija iz ATP in redukcijska moč iz NADPH. Dejansko je ta del calvinovega cikla identičen obrnjenemu delu glikolize. Fosfogliceratna kislina se protevori v 1,3-difosfogliceratno kislino in pri dodatni redukcij nastane gliceral aldehid-3-fosfat. Razlika je le to, da pri glikolizi nastaja NADH, pri calvinovem ciklu pa se porablja NADPH. Na koncu imamo še nastanek ribolozne bis fosfata.

Bolj primitiven kot je kalvinov cikel je obrnjen cikel trikarbokslnih kislin oz obrnjen krebsov cike. Pri zelenih bakterijah imamo tak primer. Tu na nivoju acetilkoencima A vstopa CO_2 . V končni fazi dobimo spet trioza fosfat, ki se lahko pretvori do heksoze.

Litotrofija

Potreba po ATP in redukcijski energiji v obliki NADH in NADPH. ATP nastaja enako kot pri »organskih« organizmih, le da je tu donor protonov organska molekula. Redukcijska moč NADH ali NADPH pa lahko nastane direktno iz anorganske snovi. Pogoji je, da ima tendenco oddajanja elektronov in da je NADH nižje v stolpu redukcijskih potencialov. NADH lahko nastaja tudi iz obrnjenega elektronskega transporta.

Viri anorganskih elektronskih donorjev:

Predvsem geološkega izvora (vulkanske kamnine, žvelo,...), lahko pa biološkega izvora (vodik) kot produkt metabolizma drugih organizmov. Lahko so antropogeni (snovi, ki jih je ustvaril človek uporabljajo za vire elektronov (dušične spojine, industrijski odpadki)). Če je kisik terminalni akceptor elektronov, potem je precej anorganskih spojin, ki so višje v redoks vrsti.

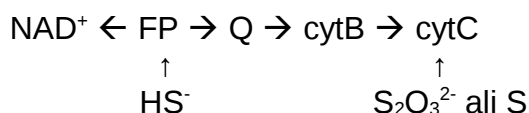
Kemolitotrofi

Vodikove bakterije oksidirajo vodik. Vodik je produkt metabolizma drugih organizmov. Pri tem je bistvena hidrogenaza, ki se nahaja v membrani in razkline molekulo H_2 na $2H^+$ in $2e^-$. Elektroni po eni strani preskočijo v kinonski pul, lahko pa se direktno porabijo za redukcijo NAD^+ v $NADH$. Največ energije se sprosti, če je kisik terminalni akceptor elektronov. Velikokrat so ti organizmi fakultativni organotrofi, lahko pa so litotrofi (*E. coli* je organotrof, če ne pa uporablja H_2 na litotrofni osnovi). Ti organizmi, ki so oboje so miksotrofi.

Pri nekaterih mikroorganizmih ni teh hidrogenaz, zato je to obrnjen tok elektronov in se energija za redukcijo $NADH$ pridobi iz protonskega gradienta. Večinoma so te bakterije, ki uporabljajo vodik avtotrofne.

Žveplooksidirajoče bakterije

Pri teh sližijo žveplove spojine za pridobivanje elektronov in energije. Najvišje je H_2S na elektronskem stolpu. Če se H_2S pretvori v SO_2 , se sprosti 798 kJ/mol energije. Če pa poteče oksidacija samo do S, potem se sprosti 209 kJ/mol energije. Pri $S \rightarrow SO_4^{2-}$ 587,1 kJ/mol, $S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ 822 kJ/mol. Končni produkti te oksidacije so protoni in sulfati. Tu gre za kisle reakcije. pH lahko preraste tudi pod 1. Prva stopnja v oksidaciji H_2S je nastanek elementarnega žvepla. Če je na voljo veliko H_2S bodo mikrobi izpeljali samo prvi del reakcije in bodo elementarno žveplo kopičili kot zalogo celične energije.



V nekaterih primerih lahko kot končni akceptor elektronov velja NO_3^- v anaerobnih pogojih. Elektroni za redukcijo CO_2 izvirajo iz reverznega elektronskega transporta. Nekateri S-bakterije lahko uporabljajo organski vir ogljika (Biogenerator \rightarrow uporablja H_2S kot anorganski vir in C kot organski vir energije in je miksotrof). Ti organizmi se nahajajo predvsem v morju in v vulkanih.

Fe oksidirajoče bakterije

Tu gre za oksidacijo Fe^{2+} (fero) v Fe^{3+} (feri). Redoks potencial Fe^{3+}/Fe^{2+} je +0,76V zato je izredno nizko na tem elektronskem stolpu. Kljub temu, da gre za kisik kot terminalni akceptor elektronov se sprosti malo energije. To je tudi vzrok počasni rasti teh bakterij. Večino teh bakterij je tudi sposobna oksidacije žvepla, zato so obligatni acidofili. Dejstvo je, da je Fe^{2+} stabilen samo v kislem, v nevtralnem pa ni topen, saj nastane FeO in ta oblika potem ni dostopna bakterijam. (*Thiobacillus Ferrooxidans*). Ta nizek pH uporabljajo bakterije kot protonski gradient. Vstopajoči H^+ se porablja za sintezo ATP in za vzdrževanje nevtralnega pH. Ko kisik prejme elektron preko elektronskega transporta se ti H^+ porabijo za tvorbo H_2O . Tu nastopa posebni encim

rustician, ki $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$, elektorni pa potujejo do cytC. NADPH ali NADH pa nastajata z reverznim transportom elektronov. (Galionela leptotriks – živi v vodi na meji med anaerobnimi pogoji in aerobnimi, ker je tam prisotna oblika Fe^{2+} v ionski obliki in ne v oksidirani (FeO).

NH_3 , NO_2^- oksidirajoče bakterije

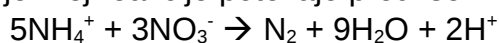
Donorji elektronov so nitriti. Tu gre za anaerobno oksidacijo. To so nitrifikacijske bakterije. Te so ločene na dve skupine:

→ $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ NITROZONAS

→ $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ NITROBACTER

Redoks potencial NH_3 je približno 0V, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ je +0,44V. Par $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ ima 0,82V.

Anaerobna oksidacija $\text{NH}_3 \rightarrow$ anamoksná reakcija → Tu sodelujejo NO_3^- kot terminalni akceptorji elektronov, primarni donor pa je NH_3 . Tu se sprosti precej energije. Tej reakcije potekajo predvsem v odpadnih vodah.



Anaerobna respiracija

Molekule, ki omogočajo anaerobno respiracijo so bile prvotno primarni akceptorji elektronov. Kisik je prišev v upoštev kasneje. Je slabo topen, zato je veliko vodnih mikrobov tudi v današnjih časih anaerobnih. Kot vir energije uporabljajo organske molekule. Alternativni akceptorji so večinoma anorganske molekule. Elektronski transport je analogen tistemu pri evkariontih. Mikrobi, ki so sposobni anaerobne respiracije so obligatni (preživijo samo v odsotnosti kisika) in fakultativni (preživijo v pomanjkanju kisika) anaerobi. Ti akceptorji so višje v energijskem stolpu, zato se sprošča pri teh procesih manj energije. Ti akceptorji so:

(višji redoks potencial) $\text{O}_2 > \text{Fe}^{2+} > \text{NO}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_2 > \text{S}$ (nižji redoks potencial)

Asimilacija in disimilacija

Pri obeh procesih gre za redukcijo določenih spojin, ki se lahko uporabljajo po asimilativni poti ali disimilitivni poti. Vedno gre za sprejem elektrona, ki ga oksidanti potrebujejo. Pri asimilaciji pride do pretvorbe substanc za rastni gradbeni material. Po redukciji se te sstance vgradijo v proteine ali druge molekule. Pri disimilaciji gre za uporabo teh substanc kot končnih akceptorjev elektronov.

Asimilacija NO_3^- , SO_4^{2-} in CO_3^{2-} se lahko uporabijo kot viri N, S in C. Končni produkti so potem aminoskupine, sulfidrilne skupine (SH) in različne organske ogljikove spojine (ogljikovi hidrati). Bistvena razlika med disimilacijo in asimilacijo je, da pri asimilaciji so reducirane sstance v ravnotežju z sintezo, kar pomeni da ni kopičenja reduciranih akceptorjev (aminokislina se ne kopičijo po redukciji nitratov). Pri večini organizmov imamo te asimilacijske metabolne poti prisotne pri bakterijah, algah, glivah rastlinah ne pa pri živalih. To pomeni, da morajo višji organizmi dobiti N v obliki organskih spojin. Disimilativni metabolizem imajo samo nekateri prokarionti.

Kako poteka redukcija nitrata?

Gre za anorganske dušikove spojine, ki so elektronski akceptorji. Najbolj pogosti alternativni elektronski akceptorji če ni kisika so nitrati, nitriti, didušikov oksid, NO, N_2 . Večinoma so to plini (NO_2 , NO, N_2). Ko pride do redukcije nitrata do nitrita in nitrita do N_2O oziroma lahko naprej v NO in N_2 se dušik pretvori v plinasto stanje oziroma plinasto spojino, katera je izgubljena za zemeljski oziroma vodni sistem. V tem primeru govorimo o denitrifikaciji. Izrednega pomena je v agronomiji. Preprečujemo

lahko samo tako, da zračimo zemljo, da mikrobi lahko raspirirajo s kisikom. To se doseže na ta način, da se zemljo preorje. S tem zemljo v bistvu prezračijo in tako mikrobom omogočijo uporabo kisika kot terminalnega akceptorja elektronov, zato pustijo dušik primeru. Enako je pri nastanku poti. Tam se zemlja zbije, pogoji v njej so anaerobni, zato bakterije porabljajo dušik kot terminalni akceptor elektronov in rastline ne morejo rasti.

Kako poteka disimilativna redukcija nitrata?

Prva stopnja je redukcija nitrata do nitrita. Sodeluje nitratska reduktaza. Za njo je značilno, da vsebuje molibden. Gre za membranski protein, ki je inhibiran s kisikom. Elektroni preko citokroma B pridejo do nitratske reduktaze, ki potem reducira nitrat do nitrita. Pri asimilativni poti pa je drug tip reduktaz. Ta proces pa lahko poteka tudi aerobno. Tipično za ta encim je, da je inhibiran z končnim produktom in to je amoniak. V obeh primerih je to prva stopnja v redukciji nitrata in kot produkt nastaja nitrit, ki pa v nizkem pH območju lahko prehaja v nitritno kislino, ki pa je mutagena. Dejansko gre pri nitritni reduktazi v bistvu za detoksifikacijo. Nitrit bi lahko postal toksičen, se potem naprej reducira v naslednji stopnji. Tu pride najprej do nastanka N_2O , nato do NO in v končni stopnji do N_2 . Nekatere bakterije imajo ene druge druge encime. Tako lahko nekatere pretvorijo dušik do NO , druge do N_2 . *E.coli* ima samo nitratsko reduktazo, tako da lahko prevede nitrat samo do nitrita. Kar pa ni dobro, ker so lahko nitriti tudi toksični.

Disimilacija $NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$

Asimilacija $NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow NH_2OH \rightarrow NH_3 \rightarrow R-NH_2$

Naslednji element oziroma spojine, ki lahko služijo kot terminalni akceptor elektronov so spojine žvepla. V glavnem gre za sulfat, ki je precej razširjen ion v morski vodi. Imamo lahko asimilativno ali disimilativno porabo.

Asimilativno se lahko porablja sulfat pri vseh organizmih razen živalih, disimilativno pa le pri sulfat reducirajočih bakterijah. Asimilativno se sulfat reducira v vodikov sulfid in ta se takoj vgradi v metionin in cistein. Tudi pri disimilativni porabi sulfata je končni produkt vodikov sulfid. V primerjavi z kisikom in nitratom je sulfat relativno slab akceptor, redoks potencial para sulfat sulfid je pri +0,1V (relativno visoko). Sulfat je izredno stabilen ion, to je še ena slabost. Ko gre za en ali drug proces, mora najprej priti do fosforilacije sulfata, do aktivacije z ATP-jem. Ravno zaradi tega, ker je tako visoko na elektronskem stolpu, je rast teh bakterij bistveno počasnejša.

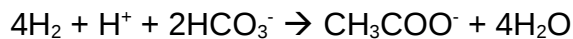
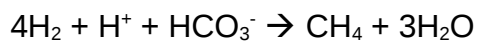
Kot elektronski donorji pri obeh teh procesih služi H_2 , lahko pa tudi laktat in piruvat. Kako poteka sama redukcija sulfata?

$SO_4^{2-} \rightarrow ATP \rightarrow$ adenzin fosfo sulfat (APS). To omogoči ATP sulfurilaza. Pri disimilativni poti se ta APS reducira, sprejme dva elektrona in dobimo SO_3^{2-} in potem pride do nadaljnjih produkcij in na koncu dobimo H_2S (v tem postopku se sprejme še 6e-). Pri asimilaciji se APS z še enim ATP-jem pretvori v fosfo adenzin fosfosulfat (PAPS). Za nadaljnjo redukcijo te molekule pridejo elektroni iz NADPH, vpletena je dehidrogenaza, dobimo SO_3^{2-} , to pa se nadaljuje enako kot pri disimilativni poti. In na koncu dobimo H_2S , ki se vgradi v aminokislino. Elektroni pridejo preko prenašalcev elektronov, donorji pa so vodik in za razklop vodika je potrebna hidrogenaza. Ta se nahaja v periplazmatskem prostoru. To je prostor med celično membrano in celično steno. Te elektroni potem potujejo do citokroma C3 in potem do adenzin fosfo sulfata. Te bakterije so v glavnem litotrofni organizmi, donor elektronov je H_2 akceptor je SO_4^{2-} , sinteza ATP-ja pa poteka preko gradienta protonov. Imamo tudi nekatere

organotrofne bakterije, ki so sposobne uporabljati sulfate disimilativno, kjer so organski donorji elektronov, to so morski mikroorganizmi (primer: desulfobacter). Oni pridobivajo elektrone iz laktata, piruvata, acetat. Cikel trikarboksilnih kislin je nekoliko modificiran, podrobnosti ne bomo obravnavali. Kot eden od terminalnih akceptorjev je lahko tudi HCO_3^- oziroma raztopljeni CO_2 . V anaerobnih sistemih je lahko veliko mikrobov, ki so organotrofi. CO_2 je eden od končnih produktov energijskega metabolizma organotrofov. To pomeni, da v sedimentih in stoječih vodnih sistemih je lahko veliko CO_2 raztopljenega v obliki karbonatnega iona (anaerobni pogoji). Redoks potencial je $-0,2\text{V}$, tako da tej bakterije zelo slabo rastejo ker je majhen razpon v potenciali. Poznamo dva tipa CO_2 reducirajočih prokariontov:

- organogene arheje
- homoacetogene bakterije

V obeh primerih služi kot donor elektronov vodik, s tem da v enem primeru pride do tvorbe metana, v drugem primeru do tvorbe acetata.



Pri oddaji elektronov in pri transportu elektronov do karbonatnega iona se sprosti nekaj energije, ki se porabi za črpanje protonov preko membrane. Za sintezo NADH pa je potreben obrnjen transport elektronov in lahko pride do sinteze ATP-ja in NADPH, ki so potrebni za fiksacijo CO_2 in za tvorbo organskih spojin. Za metanogene arheje je značilno, da fiksacija CO_2 ne poteka po kalvinovem ciklu, ampak po AcCo-A poti. Pri metanogenih arhejah ni kalvinovega cikla. Pri obeh ponovno pride do kopičenja v okolju. Primer: na dnu jezer, se nahajajo sedimenti, kjer so anaerobni pogoji in bakterije izločajo metan. Zato so tudi na bledu nameščeni neke vrste rezervoarji, ki shranjujejo ta metan.

Poleg teh imamo še nekatere druge elektronske akceptorje, ki sodelujejo pri anaerobni respiraciji. Gre za anorganske elemente (Fe in Mn). Pri železu gre za redukcijo feri oblike v fero obliko. Feri oblike je veliko v naravi in ta lahko služi za respiracijo predvsem pri nekaterih anaerobnih glivah, poleg tega pa še pri nekaterih organotrofnih in litotrofnih bakterijah. Redoks potencial para feri fero je relativno nizek ($0,77\text{V}$, za kisik je $+0,82\text{V}$) in zato je železo uspešen akceptor. Za ta proces je potreben feri reduktaza, medtem ko elektroni spet prihajajo iz cele vrste ali organskih ali anorganskih donorjev. Feri oblika železa je bolj topna kot fero oblika. V nevtralnem pH področju fero oblika ni topna in ta proces lahko s pridom uporabljajo v rudarstvu, pri bioličenju (tako izločijo fero obliko, katera se kot »oborina« izloči na dno vode. Mikrobi iz topne oblike pretvarjajo železo v netopne, ki ga je lažje zbrati. Drug element je mangan. Pri tem gre za redukcijo Mn^{4+} v Mn^{2+} obliko. Poteka anaeroben proces. Pri tem gre za pretvorbo Mn iz bolj netopne v bolj topno obliko. Mn ima relativno visok redoks potencial in ni tako učinkovit kot železovi ioni ampak vseeno lahko ta proces poteka. So pa še nekateri drugi elementi, ki imajo funkcijo terminalnih akceptorjev elektronov. To je selen in arzen. Vendar v naravi so koncentracije teh spojin relativno nizke. Predvsem pri selenovih oksidih gre pri redukciji teh oksidov do tvorbe elementarnega selen, ki je manj toksičen, kot so toksični selenovi oksidi, tako da gre za proces detoksifikacije. Kot terminalni akceptorji so lahko tudi nekatere organske spojine. Lahko so to spojine, ki so prisotne v okolju ali tudi intermediati metabolizma, ki se nahajajo v celicah. Če gre za intermediete, govormo o

fermentativnih procesih. Tu gre za alkoholno vrenje in za kopičenje teh elementov v okolju. Tu je vezana še fosforilacija na nivoju substrata.

Organske substance, ki so lahko akceptorji in se nahajajo izven celic.

Te so lahko dodane gojišču, lahko dodamo fumarat, ki se potem reducira v sukcinat, če NADH služi kot donor elektronov, lahko potem pri transportu elektronov preko elektronskega transporta pride do črpanja treh elektronov, kar je dovolj za en ATP. Podobno lahko tudi glicin deluje kot akceptor elektronov. Pri tem nastaja acetat. Imamo pa še nekatere druge organske spojine: tri meti lamin oksid (TMAO) in nastaja tri meti lamin. TMAO pri ribah deluje kot molekula za izločanje dušika, ki se lahko izloča preko kože. TMAO imajo to lastnost, da smrdijo. To tvorijo mikrobi in če mamo ribe na sobni temperaturi, potem zasmrdijo. Podobno lahko mikrobi uporabljajo tudi dimetil sulfoksid DMSO. Ta substanca se reducira do dimetil sulfida, ki ima tudi močan vonj. Dimetil sulfoksid lahko uporablja *Campylobacter*, *E. coli*. Dimetil sulfoksid je dobro topilo za organske molekule, ki niso topne v vodi, etanolu. Ne smemo ga imeti dolgo časa na pultu, ker začne smrdeti. Začne rasti bakterije, katere ga razgrajujejo. Če je substanca sterilna, potem teh bakterij ne bo.

Anaerobni pogoji

So vedno, kadar je kisika premalo oziroma ga zmanjka. V tem primeru so lahko terminalni akceptorji elektronov intracelularne organske molekule in to je fermentacija.

Fermentacija

Uporaba vira energije brez zunanega akceptorja elektronov. Tu je terminalni akceptor elektronov intracelularna organska molekula. Tu pride do nepopolne oksidacije donorjev in do kopičenja intermediatov. Gre za fosforilacijo na nivoju substrata. Ta sinteza ATP-ja je bolj učinkovita kakor sinteza ATP-ja z protonskim gradientom.

Pri vseh teh procesih mora ostati oksidoreduktivno ravnotežje. Število elektronov na levi je enako številu elektronov na desni. Veliko fermentativnih procesov ohranja to ravnotežje z produkcijo H_2 .

Kako delimo fermentativne reakcije?

Tip	Reakcije	Bakterije
Alkoholna	Heksoza \rightarrow 2Etanol + $2CO_2$	Kvasovke <i>Saccharomyces</i> –
Homolaktična	Heksoza \rightarrow Laktat	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
Heterolaktična	Heksoza \rightarrow Laktat + Etanol + CO_2	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i>
Propionska kislina	Laktat \rightarrow Propionat + acetat + CO_2	<i>Propionibacterium</i>
Različne kisline	Heksoza \rightarrow etanol + 2,3-butadienetandion + sukcinat + laktat + acetat + format + H_2 + CO_2	Enterične bakterije
Butirična kislina	Heksoza \rightarrow Butirat + Acetat + H_2 + CO_2	<i>C. butyricum</i>

Butanol	Heksoze \rightarrow Butanol + Acetat + Aceton + Etanol + H ₂ + CO ₂	<i>C.acetobutylicum</i>
Kaproatna	Etanol + Acetat + CO ₂ \rightarrow Kaproat + Butirat + H ₂	<i>C.kluyveri, C.aceticum</i>
Homoacetogena	Fruktoza \rightarrow 3 Acetat + 2H ₂ O	<i>Acetobacterium</i>
Metanogena	4H ₂ + 2CO ₂ + H \rightarrow acetat + 2H ₂ O Acetat + H ₂ O \rightarrow CH ₄ + HCO ₃	<i>Methanosarcina, Methanotheris</i>

Oksidacija sukcinata do propionata sprosti 20kJ/mol energije. To se porabi za črpanje Na⁺ iz celice. To ustvari natrijev koncentracijski gradient in na osnovi tega gradienta se preko ATP-aznega sistema tvori ATP. Za en ATP so potrebni trije natriji. Propionat se kopiči kot terminalni akceptor elektronov v okolici.

Sintropija je če sodeluje več mikrobnih vrst (en mikrob razgradi sladkor do acetata, etanola, drugi acetat do CH₄, H₂,... Le CO₂ in CH₄ se ne moreta uporabiti kot donorja elektronov.

Kje so mere anaerobnega metabolizma

Ogromno organskih spojin se lahko razgradi fermentativno, ne pa vse. Lignin je substanca s katero se prepojijo zeleni deli rastlin in dobimo olesenitev. Če je les v vodi, ne bo strohnel. V anaerobnih pogojih nastane premog, ker pride samo do pooglenitve. Podobno se ne morejo razgraditi hekso-oktadekani. To so sestavni deli nafte. Ker so pod zemljo anaerobni pogoji jih mikrobi ne morejo razgraditi.

Vgradnja dušika kot N₂

Nekajkrat smo rekli, da je dušik tisti element, ki je dostopen večini organizmov v obliki amoniaka, nitrata in dušika. Tisti organizmi, ki uporabljajo nitrat za terminalni prejemnik elektronov, potem spravijo dušik iz vodnega ali zemeljskega sistema v atmosfero. V atmosferi je veliko plinastega dušika, ki je izredno stabilna oblika dušika (trojna vez). Ta dušik je izredno inerten plin. Energija, ki je potrebna za razčlenitev dveh atomov dušika je 940kJ/mol. Določeni procesi tudi v atmosferi lahko pretvorijo dušik v nitrat oz nitrit. To se dogaja ob strelah, kar pa je premalo. K sreči imamo nekatere bakterije in ciano bakterije, ki lahko fiksirajo dušik. Iz elementarnega ga lahko spravijo v rastlinam dostopno obliko. Tu so predvsem pomembne ciano bakterije iz vrste clustridium in azotobacter. Nekatere vrste pa lahko rastejo v simbiozi z rastlinami predvsem metuljnicami (detelja, grah, fižol...). To so brazodium bakterije. Za to, da lahko tej mikrobi fiksirajo dušik iz atmosfere potrebujejo encime. Gre za kompleks dveh nitrogenaz. Prvi kompleks je dinitrogenaza in drugi kompleks je dinitrogenazna reduktaza. Oba vsebujeta poseben kofaktor, ki vsebuje Fe in dinitrogenaza tudi Mo. Gre za poseben kofaktor, kjer imamo 1x Mo, 7x Fe in 9x S vezane preko homocitrata v proteinsko molekulo. Vsaka taka proteinska encimska molekula ima dva taka centra z koencimom. Nekatere bakterije pa imajo lahko namesto molibdena vanadij. To je predvsem v tistem primeru, ko v okolju ni Mo. Aktivacija molekule N₂ je energetsko zelo zahteven proces. Potrebnih je 6e za redukcijo N₂ do dveh molekul NH₃. Reakcija poteka v treh stopnjah, kjer ne pride do

kopičenja intermediatov. Celotna reakcija poteka v nitrogenaznem kompleksu, kjer sta prisotna oba encima. Gre tudi za izredno reduktiven proces, ki je inhibiran s kisikom. Kisik celo razgradi ta dva encima. Kljub temu pa lahko fiksacija N_2 poteka tudi aerobno, vendar morajo biti te encimi zaščiteni pred O_2 . To se rešuje na različne načine. Eni imajo zelo hitro respiracijo, lahko imajo posebne celice, ki imajo sluzast ovoj in preprečuje vstop kisika v topni obliki, lahko so ti encimi zaščiteni z drugimi proteini v nek kompleks, ki ravno tako preprečuje vstop kisika. Pri ciano bakterijah pa imamo že poseben tip celic t.i. heterociste, ki so ugodne za fiksacijo N_2 . Ko so odkrili ta proces fiksacije N_2 so šli takoj odkrivat gene za nitrogenaze in jih skušali prenesti v rastline in ravno zaradi težave, da so encimi neobstoje v prisotnosti O_2 se to ni izteklo.

Kako poteka sam elektronski transport med fiksacijo N_2 ?

Elektroni izvirajo iz piruvata in ta se oksidira do Ac-Co-A. Elektroni preskočijo na flavodoksin in iz tu gredo na nitrogenazo, potem pa na dinitrogenazo. Tu je potrebna energija v obliki ATP in na koncu pride do razbitja trojne vezi in tvorbe NH_3 . Proces vedno spremlja sproščanje H_2 . Protoni so potrebni tudi pri sami redukciji, tako da je celokupna reakcija potem porabi 8 protonov in 8 elektronov na molekulo N_2 , nastaneta pa $2NH_3 + H_2$. Gre za izredno potraten energetski proces porabi se 16-24 ATP-jev. Za sam N_2 je potrebnih 6 elektronov, potem pa še dva dodatna za H_2 . Vsi ti geni so ponavadi v enem takem klastru. To pomeni, da so nanizani en za drugim in pod vplivom istega promotorja. Dvajset takih proteinov, ki sodelujejo pri nitrifikaciji se nahaja v nif klastru(nitrifikacijski klaster). Poleg obeh nitrogenaz so zapisani še encimi, ki sodelujejo pri tvorbi kofaktorja, pri inserciji kofaktorja, sami encimi, ki sodelujejo pri procesiranju dinitrogenaz, gene za homocitrat, za flavodoksin. Vsi ti so na nif klastru. Kisik je negativni regulator. Če je prisoten, se ustavi celotna sinteza in prepis genov. Ko enkrat imamo NH_3 se ta vgradi na nivo ak, najprej na nivo glutaminske kisline, pride do reakcije z α keto glutaratom, ki je intermediant cikla trikarboksilnih kislin, tvori se glutamat, (glutamat dehidrogenaza). Druga reakcija je glutamat + atp \rightarrow glutamin, ki ima dve molekuli NH_3 . Od tu naprej pa gre potem sinteza vseh ostalih aminokislin.

Odnos mikrobov in okolja.

Mikrobi so izredno pomembni pri kroženju snovi v naravi. Pomembni so pri razgradnji vseh organskih snovi v anorgansko in obratno. Pri tem imamo celo vrsto različnih ekosistemov. To je sistem okoli nekega organizma. Pri tem so mišljeni vsi kemijski dejavniki, fizikalni,... Tako za vsako kroženje snovi obstaja nek biokemijski cikel, kjer ti elementi spreminjajo oksidacijsko stanje. Ti elementi, ki so najbolj pomembni za vse žive organizme so ogljik, vodik, dušik in kisik, v manjši meri tudi žveplo, fosfor in ostali mikroelementi.

Kje vse najdemo mikroorganizme v naravi?

Kjer živijo višji organizmi so tudi mikrobi. Lahko živijo tudi v simbiozi z temi organizmi. Najdemo pa jih tudi tam, kjer ni višjih organizmov. V določenih ekoloških nišah, tako imenovanih mikro-okoljih, se lahko ti kemijski parametri izredno hitro spreminjajo in mikrobi morajo biti sposobni preživeti te spremembe. Veliko mikrobov raste v obliki biofilma. Gre za en sam sloj celic, ki prekriva neko podlago. Ti biofilmi se lahko razraščajo na površini anorganskih ali organskih snovi in predvsem jih bomo dobili na prodnih kamnih in odmrlih rastlinskih materialih. Lahko tudi pri nas na zobeh. Tej povzročajo karies. Predvsem gre za tako imenovan absorpcijski efekt, kjer s tem

biofilmom povečajo površino in tako lahko iz okolice izolirajo več snovi, kakor če so susprendirani v vodi. Razporeditev hranilnih snovi v naravi je izredno neenakomerna. Vedno je pomanjkanje hranilnih snovi. Predvsem če govorimo za prst. Zato imamo večino organizmov v naravi v stacionarni fazi rasti. Od časa do časa pa pride do obilice hrane in takrat mikroorganizem preide v eksponencialno rast in takoj pride do kompeticije za hrano. Potem zelo hitro preidejo zopet v stacionarno fazo. Bistveno prednost pri tem imajo tisti mikroorganizmi, ki so sposobni imeti intracelularne zaloge. Pri mikroorganizmih je zaradi tega velika tekmovalnost in tudi sodelovanje pri izrabi teh hranilnih snovi. Tu gre za to, da en mikrob določen vir elektronov predela do neke stopnje, produkt potem porabi nek drugi mikrob, dokler ne pride do H₂O in CO₂. Pri tem so tudi pomembni različni habitati.

V jezerih na dnu v sedimentih imamo lahko metanogene bakterije, sulfat-reducirajoče bakterije, denitrifikacijske bakterije lahko pa so tudi različne fermentativne bakterije. V aerobnem delu jezera pa imamo lahko tudi tvorbo fotosinteze, če je prisotna svetloba. Vsa ta jezera so lahko eotrofna (veliko organskih snovi, v teh primerih pride zelo hitro do anaerobnih pogojev (alpska jezera). Potem so še politrofna.

V kopenskih habitatu je predvsem pomembno kroženje vseh teh elementov, ki smo jih prej našli. Kroženje ogljika: ogromno ga imamo vezanega v humusu in v fosilnih gorivih. Nekaj ga je potem v rastlinah in nekaj v živalih. Relativno malo je atmosferskega ogljika. (0,03%). Ta atmosferski CO₂ lahko fiksirajo rastline, s katerimi se hranijo mikrobi in živali. Nekaj se ga raztaplja v morjih in v vodnih habitatih, kjer ga lahko fiksirajo alge in določene vodne živali. Gre za inkrostracijo - za vgradnjo karbonatov v celično steno ali v oklep. Odmrli ostanki teh živali lahko tvorijo sediment, ki vsebuje ogromno karbonatov. Določene živali lahko uporabljajo karbonate za ojačitev svojih oklepov ali celičnih sten. Iz teh sedimentov lahko nastanejo potem kamenine. Ogromno ogljika je vezanega še v kameninah. Trenutno imamo relativno malo CO₂ v atmosferi. V preteklosti je bilo bistveno več atmosferskega CO₂. V kopenskih habitatih imamo heterogenost, mikrobnih rastlinskih in živalskih vrst. Shema CO₂, N₂ in S na CD-ju.

Kot zelo pomemben ekosistem imamo pri govedu. Pri prežvekovalcih in to v njihovem vampu. Govedo se hrani z rastlinskim materialom, ki ima ogromno celuloze, vendar govedo ni sposobno sintetizirati celuloze, zato nujno potrebuje simbiozo z mikrobi. Hrana pri prežvekovalcih potuje najprej v retikulum (začetni del prebavil) od tam gre v omasum in potem se vrne nazaj v usta in potem pride v vamp oz. rumen. Tu potem poteka zelo zanimiva rast mikrobov, gre za popolnoma anaerobne pogoje, kjer mikrobi potem uporabljajo CO₂ kot vir elektronov in ustvarja se metan kot končni produkt. Žival potem uporabi mikrobovo maso za svojo rast. Pomembne so v teh potovanjih hrane tudi spremembe v pH-ju, namreč preden vstopi v črevesje pride do padca pH-ja in pomora vseh mikroorganizmov. V bistvu gre za kontinuirni način fermentacije, hrana stalno priteka v vamp in ta mikrobova kultura se stalno porablja za rast. Poleg teh proteinov so lahko produkt tudi hlapne maščobne kisline in določeni ogljikovo hidrati. Te potem porabi žival kot svoje donorje energije iz elektronov. Velikokrat bomo našli mikrobe v simbiozi z drugimi rastlinami in živalmi. Predvsem pomembne so združbe med algami in glivami. To so lišaji. Ti so izredno odporni na ekstremne temperature in na nizko količino hranil v okolju. Predvsem so to fototrofi, ker imajo alge. Naseljujejo lahko predele kjer ostali mikroorganizmi ne morejo uspevati. Namesto alg imamo pri nekaterih lišajih cianobakterije. Simbioza poteka tako, da alge oz. ciano bakterije služijo kot primarni reducent hranilnih snov, medtem ko glive dajejo določeno trdnost. Če gozd pogori so lišaji tisti prvi, ki naselijo ta predel

in ko nastane dovolj humusa, se lahko na tem predelu razvijejo prve rastline, zato govorimo, da so lišaji pionirji v teh procesih.

Mikoliza – gre za simbiozo med glivo in višjimi rastlinami. Gliva se razvije okrog korenine laska. Rastlina zalaga rastlino z ogljikovimi hidrati, medtem ko gliva omogoča rastlini lažjo absorpcijo anorganskih snovi iz okolja. Poznamo dva tipa mikolize:

- eptomikoliza, kjer je gliva samo na površini koreninskega laska
- endomikoliza, kjer pa se gliva razrašča v koreninskem tkivu.

Mikolizne glive so obligatni simbionti. Ne zanje živeti brez prisotnosti rastline. Večina basidiomicetnih gliv (prostotrošnice) je mikoliznih. Cela vrsta gob, ki jih ne znamo gojiti umetno, ker v naravi uspevajo v simbiozi z rastlinami in še ne vemo, katere snovi jim te rastline zagotavljajo.

Odnosi med mikrobom in človekom

Osnovne značilnosti o delovanju mikrobov v človeškem telesu

Človeško telo je idealno gojišče za rast in razvoj mikroorganizmov. Mikroorganizmi imajo v telesu na voljo bogate hranilne substance, primerno temperaturo, večinoma je na voljo dovolj kisika, nevtralen pH,... To pomeni, da bi mikrobi z veseljem uporabljali človeško telo kot vir hranil. To pa ni možno, ker ima človeško telo zaščito, kot je koža in nespecifična in specifična obramba. Specifična obramba je imunski sistem. Dokler je zarodek v materinem telesu je v sterilnem okolju in šele ob rojstvu pride zarodek v stik z zunanjim svetom in tudi z mikroorganizmi. Mikroorganizmi se naselijo predvsem v debelem črevesu, drugače jih pa najdemo na površini kože, na očeh, v nosu, ustih, genitalnem sistemu in seveda v nekaterih predelih prebavil (požiralnik, dvanajsternik, tanko črevo, ne pa tako veliko kot v želodcu). Vsako telo odraslega telesa nosi več mikrobnih celic kot pa svojih lastnih. Odraslo človeško telo ima 10 milijard nam lastnih celic, ima pa tudi 100 milijard mikrobnih celic. Mikrobi so večinoma prokarionti, njihov celični volumen je bistveno manjši, zato je tudi lahko taka razlika. Vsi ti mikrobi spadajo med normalno telesno floro in ne povzročajo kakršnih koli bolezni. Ta normalna flora preprečuje razvoj patogenih mikroorganizmov. Govorimo o probiotikih (probiotični jogurti so jogurti, ki vsebujejo mikrobove, kateri okrepijo floro v našem telesu). V primeru probiotikov govorimo o simbiozi, o skupnem prebivanju – sožitju. Poznamo tudi več tipov sožitja. Komenzalizem je kjer je eden od udeležencev tega sožitja neprizadet, drugi pa ima koristi od njega. V tem primeru je neprizadeto naše telo, korist pa ima mikrob. Predvsem gre za bakterije, ki jih najdemo v očesu, ušesu, genitalijah. To so bakterije iz rodu korinebakterium in mikobakterium. Drug tip sožitja je mutualizem, kjer gre za korist obeh dveh udeležencev. Primer je E.coli, ki naseljuje naše tanko in debelo črevo. Ona od nas pridobiva hranilne substance, sama pa sintetizira razne vitamine (vitamin K in nekatere vitamine B), ki jih lahko potem človeško telo absorbira. Parazitizem je tretja oblika sožitja, kjer eden osebek raste na račun drugega in temu drugemu škodi. Taki mikrobi v glavnem povzročajo bolezni. Okurtunisitčni mikroorganizmi, so tisti, ki normalno ne povzročajo bolezenskih znakov, ampak v določenih pogojih, predvsem ko pade odpornost telesa pa lahko preidejo v parazitski odnos in povzročajo infekcijske bolezni. Tak primer je E.coli – dokler je v destinalnem traktu (tankem črevesu) je neškodljiva, ko pa pride do okvare epidermisa (vrhnjega sloja celic v tankem črevesu), lahko preide v tkivo in tam povzroča okvare. Neseria

menigitidis – normalno je prisotna v našem respiratornem traktu, če pade odpornost, lahko povzroči vnetje membranskih ovojnic in povzroči meningitis. Ravno tako streptokokus evmonie je vedno nekaj prisotne v našem telesu. Ko pade imunski sistem se lahko razmnoži in povzroči pljučnico. V tem primeru so mikroorganizmi lahko patogeni, kar pomeni, da povzročajo bolezni.

Pojmi, ki so vezani na patogenezo:

- Patogeneza – razvoj neke bolezni, kjer gre za strukturne in funkcijske spremembe v telesu.
- Infekcija – je vstop in kolonizacija telesa z nekim patogenim mikroorganizmi.
- Bolezen – negativna sprememba v delovanju telesa.
- Patologija je veda, ki se ukvarja z študijem bolezni
- Etiologija govori o vzroku za bolezni

Vzrok za bolezni ni nujno vedno mikrob. V glavnem vse bolezni razdelimo v tri kategorije:

- degenerativne bolezni, kjer gre za propad nekega tkiva (osteoporoza – zmanjševanje organske substance v kostnem tkivu, ciroza jeter)
- dedne bolezni, te so vezane na določeno mutacijo v človeškem genomu (hemofilija, cistična fibroza,...)
- infekcijske bolezni – te povzročajo mikrobi oz virusi.

Pri infekcijskih boleznih imamo lahko kot vzrok za isti tip bolezni različne mikroorganizme. Meningitis (vnetje možganskih ovojnic) lahko povzročijo nekatere bakterije, nekateri virusi. Ravno tako velja za pljučnice, nefritis (vnetje ledvičnih čašic). Za vse infekcijske bolezni pa veljajo kokova pravila, ki pravijo:

Neka bolezen je infekcijska če zadosti 4 postulatam. Ti so:

- prvi postulat pravi, da je neka bolezen infekcijska, če lahko v vseh bolnih organizmih kaže enake znake obolevnosti, najdemo prisoten določen mikrob, ki ga ni pri zdravih osebkih
- drugi postulat pravi, da ta mikrob lahko izoliramo in umetno gojimo v obliki čiste kulture na plošči
- tretji postulat pravi, da če celice te kulture vnesemo v nek zdrav organizem bo v tem organizmu povzročil enake simptome (bolezenske znake), kot jih je kazala žival, iz katere smo povzročitelja izolirali
- četrti postulat pravi, da če iz tega sekundarno okuženega organizma izoliramo povzročitelja v obliki čiste kulture mora taka kultura kazati enake morfološke znake, kot prva izolirana kultura (na mikro in makroskopskem nivoju).

Na osnovi teh postulatov se lahko to bolezen določi za infekcijsko bolezen, čeprav so tudi v tem primeru določene izjeme, ker nekaterih mikrobov ne znamo gojiti izven teles. Tu gre predvsem za vse viroze, nekatere od teh lahko gojimo v obliki tkivnih kultur in nekatere bakterijske seve, ki povzročajo bolezni ne znamo gojiti na umetnih gojiščih. Primeri teh so trehoneme palidum (sifilis) mikobakterium lepme (gobavost). Tu so potem razni triki, kako lahko zadovoljimo tem kokovim postulatam.

Kako klasificiramo infekcijske bolezni?

Simptomi so spremembe v delovanju telesa. Vsaka infekcijska bolezen ima svoje specifične simptome. Več simptomov skupaj opišemo z sindromom.

Kako delimo infekcijske bolezni:

- nalezljive

- nenalezljive, kjer so v glavnem vzrok normalno prisotni mikroorganizmi

Pri vseh boleznih je razvoj infekcijskih bolezni odvisen od števila mikroorganizmov, ki napadejo oziroma pridejo v naše telo. Če gre za normalno nizko število mikrobov, se bolezen ne bo razvila. Če smo izpostavljeni povečanemu številu patogenih mikroorganizmov, je verjetnost za razvoj bolezni večja. *Clustridium tetani* povzroča tetanus. Ti mikroorganizmi lahko pridejo v naše telo z globokim vbodom, ker so striktni anaerobi. Njegove spore se nahajajo povsod v ozračju. Če je vnesen v naše telo z globokim vbodom, kjer so anaerobni pogoji, bodo te spore začele najprej kaliti in razvije se tetanus.

Kakšno je pojavljanje bolezni?

Bolezni se lahko pojavijo občasno, lahko se pojavijo na različnih predelih. Pojavljanje bolezni je lahko endemično (prehlad,...). Tu so klice stalno prisotne pri neki populaciji, s tem da se ob določenih obdobjih močneje razvijejo in povzročajo obolenje. Lahko je epidemično pojavljanje, kjer pride do epidemij. V tem primeru zbolijo veliko ljudi za isto boleznijo (gripa).

Lahko pa je tudi pandemično. To je epidemija, ki se razširi po celem svetu (AIDS).

Kako delimo bolezni na resnost in trajanje okužbe?

Najpogostejše so akutne bolezni. Tu se bolezen hitro razvije, traja kratek čas in se hitro umakne (viroze so predvsem take, trajajo 7-dni). Drugi tip so kronične bolezni, kjer gre za počasen razvoj bolezni, bolezen dolgo traja, znaki niso tako očitni, od začetka so mili (tuberkuloza, sifilis – v glavnem gre za bakterijske okužbe). Tretji tip so subakutne bolezni. Gre za trajne okužbe, ki od časa do časa poslabšajo stanje okuženega oseba. Kot zadnje so latentne ali prikrite okužbe, katere povzročajo transparentni fagi (herpes).

Območje okužbe je lahko lokalno (virus prehlada – prizadet je samo gornji del respiratornega sistema), lahko pa je prizadeto celotno telo (gripa, ošpice).

Kako delimo tipe okužb:

- viroze (povzročajo jih virusi)
- bakterioze (povzročajo jih bakterije)
- mikoze (povzročajo jih glive)
- toksikoze (so v primeru, če jih povzročajo samo določeni toksini, ki jih izločajo mikroorganizmi)

Govorimo lahko tudi o primarnih in sekundarnih infekcijah. Primarne so večinoma viroze, ki oslabijo naš imunski sistem. Takšne viroze lahko povzročajo potem sekundarno infekcijo, kjer gre večinoma za bakterioze (angina se vedno začne z virozo).

Kako se bolezni razširjajo?

Nekatere bolezni so nalezljive. Vektorji prenosa so lahko ljudje (klicenosci - prenašalci), ni pa nujno, da tak prenašalec kaže znake oboletosti. Predvsem pri akutnih boleznih govorimo o inkubacijski dobi. To je od takrat, ko pride mikroorganizem v naše telo, do njegovega razvitja v bolezen. V tej fazi tak človek ni prenašalec. Med akutno fazo je tak človek prenašalec in lahko nosi spore. V zadnji fazi – rekonvalescenci bolezenski znaki že pojemajo in je še vedno dovolj klic, da se

razširijo naprej. Poleg človeka lahko prenašajo bolezen tudi živali – zoonoze. Borelijo prenašajo klopi, lahko prenašajo tudi meningitis, mikrosporidium, so plesni, ki jih lahko prenašajo mačke, komarji lahko povzročajo malarijo. Zelo pogoste so okužbe, ki se pojavljajo v bolnicah (predvsem pri operacijah methicillin resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA). To je sev bakterije *Staphylococcus aureus*, ki je rezistenten na večino antibiotikov.

Izvor je lahko tudi neživ. V zemlji je *bacillus anthracis*, v vodi pa so vibriokolere. Kako dejansko poteka prenos teh bolezni? Lahko s samim stikom (dotik okužene osebe, spolni odnosi,...) ali z indirektnim stikom (dotik predmeta, katerega se je predhodno dotaknila okužena oseba, ali ga je uporabljala). Prenasajo se bolezni lahko tudi preko kašlja (taktično), preko živali, s pomočjo vetra,...

Mehanizmi patogenosti

Virulenca je stopnja patogenosti. To pomeni, da nekateri mikrobi lahko povzročajo hujše bolezni, nekateri manj hude oblike. Virulenca je odvisna od števila mikrobnih celic, ki napadajo telo. Preden mikrob napade telo, mora najprej vstopiti v telo. To lahko preko mokožnih membran (membrane v respiratornem traktu, urogenitalnem traktu). Te epiteljske celice, ki pokrivajo te trakte na zunanji strani izločajo mokože (to so polisaharidi). Preko respiratornega trakta vstopajo povzročitelji prehlada. To so rinovirusi (povzročitelji prehlada).

Zakaj pride do prehlada?

Človeški imunski sistem je temperaturno zelo občutljivi. Če telesna temperatura za malenkost pade, postane imunski sistem bolj ranljiv za vsiljivce, saj je oslavljen.

Virusi, ki povzročajo gripo (*hemophilus influenzae*, *myxovirus*), povzročitelji ošpic (paramiksovirus), tuberkuloze (bakterija *Mycobacterium tuberculosis*), povzročitelj davice (*Corynebacterium*). Preko destinalnega trakta prehajajo povzročitelji kolere (*Vibrio cholerae*) in bakterije, ki povzročajo razjedo na želodcu (*Helicobacter pylori*), griže (*Shigella sp.*).

Preko urogenitalnega trakta vstopajo mikrobi enako preko glukočnih plasti v epiteliju. Ti so povzročitelji sifilisa (*Therionema pallidum*), povzročitelji gonoreje (*Neisseria gonorrhoeae*).

Nekateri mikrobi lahko v naše telo vstopijo tudi preko kože, vendar ima ta keratinasto plast na zunanji strani, katera daje zelo dobro zaščito pred vstopom cele vrste mikrobov. Tisti mikrobi, ki imajo keratinaze, s katerimi razgradijo keratin, lahko vstopijo. To so predvsem glive.

Bolj pogosta pot za vstop mikrobov je paranteralna pot. To je vstop mikrobov preko ran, razpok ugrizov, skratka tam kjer je koža okvarjena. Mikrobi, ki lahko tako vstopajo so povzročitelji gangrene (*C. perfringens*), povzročitelji tetanusa (*C. tetani*), povzročitelji kuge (*Yersinia pestis*), malarije (*Plasmodium* – spada med protozoee (praživali)).

Virulenca je odvisna tudi od števila mikrobov. Če pride do vstopa ene same celice, je zelo majhna verjetnost, da se bo razvila bolezen. Če je pa teh celic veliko, pa lahko pride do razvoja bolezni in v tem primeru govorimo o infekcijski dozi 50 (ID50) in letalni dozi 50 (LD50). ID50 pomeni, da je to tisto število mikrobov, ki pri 50% zdravih testnih živali povzročijo infekcijo in letalna doza 50 pa je tisto število virulentnih mikrobov, ki pri 50% zdravih testnih živalih povzročijo smrt.

Ko mikrob pride enkrat v telo se mora pridrži na celice, ki jih napade in zato uporabi ponavadi pritržilne molekule (adhezine oz ligande). Kot te adhezine oz ligande lahko uporabi specifične receptorje na gostiteljskih celicah, nekateri mikrobi pa se lahko pritrjujejo s sluzastim ovojem glikokaliksom. Primer je streptokokos mutan (povzročitelj karies). Nekateri bakterijske celice pa se pritrjujejo tudi s fimbrijami oz. posebnimi proteinskimi izrastki. Po vstopu v naše telo povzroči bolezen tako da poškoduje gostiteljsko celico. Lahko gre za direktno poškodbo ob vstopu mikroba, lahko pride do vstopa s pomočjo fagocitoze. Potem se lahko celica začne v tej celici razmnoževati. Nato z reverzno fagocitozo preidejo nove nastale celice ven iz gostiteljske celice. Nekateri bakterijske celice predvsem pa virusi potem sintetizirajo litične encime, ki razgradijo membrano in na ta način uničijo to gostiteljsko celico. Poškodba je lahko tudi zaradi drugih encimov ki jih izločajo mikrobi – levkocidni encimi, hemolizini (uničuje eritrocite), koagolaze (povzročijo strjevanje krvi), hialuronidaze (hidrolizirajo hialuronsko kislino – ta je vez med celicami v telesu). Izredno pomembni faktorji virulence so toksini, kot strupene substance, ki jih izločajo mikrobne celice. Toksine delimo v dve skupine. Eni so eksotoksini, ki se sproščajo iz celic v okolje in endotoksini. Pri eksotoksinih gre za proteinske molekule z relativno nizko molekularno maso in velikokrat je njihova sinteza vezna na gene, ki se nahajajo na plazmidih. To pomeni, da je tudi virulentnost neke bakterije odvisna od tega plazmida oziroma od tega ali nosi gene za eksotoksine ali ne. Obramba proti takim toksinom so antitoksini – to so protitelesa gostitelja, ki dajejo določeno stopnjo imunosti. Ta anti (proti) telesa se da pridobiti umetno. Z rektinacijo lahko umetno spodbudimo naše telo, da jih sintetizira.

Kaj vse lahko motijo eksotoksini?

Lahko motijo delovanje celic – citotoksini (*corine bacetrium difterie* povzročitelj davice in protein, ki ga ta bakterija izloča je difterotoksin. Ta protein inhibira sintezo celičnih proteinov predvsem v ledvicah in srcu). Drug tip eksotoksinov so nevrotoksini, kateri napadajo živčni sistem oz motijo prenos živčnih impulzov med živci in mišico. Predvsem pomembni so tetanospazmini. Ti delujejo na stiku med dvema živčnima celicama. Zaradi tega potem pride do mišičnih krčev, ker se izločajo neurotransmiterji. Botulin pa vpliva na pljučno mišico, saj je ob prisotnosti botulina ne moremo več napeti oz ne moremo več dihati. Botulin je najmočnejši naravni strup. Izločajo ga *bacillus botulinum* in 1g botulina lahko povzroči smrt 3 milijonov miši.

Enterotoksini, nastopajo v gastrodestinalnem traktu. Tu so predvsem povzročitelji kolere (*vibriocolere*), ki izločajo koleragen. Koleragen inducira sintezo cAMP-ja. cAMP povzroči predvsem otekanje tekočin iz celic v gastrodestinalnem traktu in pride do dehidracije. Te toksine lahko izloča tudi *E.coli*, če vsebuje specifične plazmide, ki nosijo gene za te toksine. Taka je tudi *Salmonela enteritidis*.

Lipid A in zunanji del celične stene so lahko pri g- bakterijah toksični. Lipid A pritrjuje zunanjo plast lipopolisaharidov na fosfolipidni dvosloj. Kemijsko so to lipopolisaharidi. Do sproščanja teh endotoksinov pride pri odmiranju g- bakterijskih celic, ki napadejo naše telo. Ti lipopolisaharidi (lipidi) če so v nižjih koncentracijah povzročajo oslabelelost, vročino, šok, predstavniki mikrobov so *Salmonela tifi*, tifoidna mrzlica, proteus (v urinalni trakt), neiseria meningitidis (vneteje možganskih ovojnic). Predvsem pri sproščanju lipopolisaharidov imamo to smolo, da naš obrambni sistem ta signal celo ojači preko določenih receptorjev. Na celicah se vežejo na te receptorje in povzročijo v celici kaskado signalov, ki lahko ta signal ojači in če je veliko takih celic, ki so napadene lahko pride do sepse (septični šok) in na koncu tudi do smrti. Precej smrti zaradi infekcijskih bolezni je zaradi endotoksinov, ki v zadnji fazi preidejo

v sepso. Če gre za infekcijo z g- bakterijami, nam tudi antibiotiki ne pomagajo kaj dosti, ker pride do propada teh celic in sprostijo se endotoksini. Določene toksine izločajo tudi glive in to so mikotoksini. Glive večinoma ne napadejo naše telo, ampak lahko te mikotoksine izločajo na živila, ki jih potem zaužijemo in z zaužitjem okuženih živil jih dobimo v telo, ki so nevarne za naše telo. Rženi rožički – so patogeni na rž-u. Izločajo alkaloide, ki so toksični in povzročajo določene težave, če jih zaužijemo. Povzročijo spontani splav in določene halucinacije. Nekateri alkaloidi lahko uporabljamo kot zdravila. Izredno pomembna substanca je afla toksin (*aspergillus flavus*). Ta je filamentozna gliva, ki raste v tropskih predelih. Njegova optimalna temperatura za rast je med 30-35 C ravno tako lahko raste na žitih, arašidih, koruzi. Afla toksin je najbolj kancerogena naravna substanca kar jih poznamo.

Amanitin – izločajo ga gobe in so nevrotoksin (*amanita phalloides* (zelena mušnica)). Toksine lahko izločajo alge - dinoflagelati, saksitoksine izloča *gonyaulax*. Tudi virusi so povzročitelji hudih bolezni, zaradi citocidnega efekta (razkroja celice). Predvsem ustavijo sintezo makromolekul, tako da ne pride do delitve celic. Omogočajo sproščanje predvsem litičnih encimov iz lizosomov, kar povzroči lizo celic. Nastanek samih virionov lahko povzroča nastanek inkluzijskih telesc (z virioni). Nekateri virusi pa lahko povzročajo združevanje posameznih celic v eno večjo celico in nastane sincicij (velika celica z več jedri – nastane z fuzijo celic). Nekateri virusi lahko aktivirajo onkogene, spremenijo normalno somatsko celico v onkogeno. V teh kancerogenih celicah pride do izgube kontaktne inhibicije in se začnejo nekontrolirano razmnoževati.

Obramba našega telesa proti mikrobom

Delimo jo na specifično (imunski sistem) in nespecifično (koža,...)

Nespecifične obrambe gostitelja

Gre za mehansko zaščito. Koža je izredno dober »organ«, ki nas ščiti pred vdorom mikrobov, potem za zaščito skrbijo še mukozne membrane (to imajo vse epiteljske celice, ki izločajo mukozo), ki preprečuje vdor nekaterim mikrobom. Potem so nekatere žleze, kot so solzna žleza, slina, migetalčni epitelij, ki vedno utripajo ven iz telesa (nos, sapnik). Poleg mehanske zaščite imamo še kemijsko zaščito pred mikrobi. Eno je tako imenovan ksedum ali olje, ki ga izločajo žleze lojnice v naši koži, drugo pa je nizek pH na koži 2-3. Lizocim je encim, ki razkroja pepidoglikan in je prisoten v solzah, znoju, slini, limfi. Tako da preveliko umivanje ni dobro, ker odpravimo to kemijsko zaščito na koži. Izredno močna zaščita pred mikrobi je nizek pH v našem želodcu pH=1.2 – 3. To predstavlja bariero, ki je večina mikrobov ne more preživeti. V krvi imamo potem celo vrsto celic, fagocitov, ki na podlagi fagocitoze uničujejo te celice. To so predvsem levkociti (bela krvna telesa) in jih delimo v tri skupine:

- Granulociti - te delimo na tri skupine, katere so dobile imena po barvanju v pH<7
 - Nevtrofilji so tisti, ki so odgovorni za fagocitozo v začetni fazi infekcije (65%)
 - Bazofili izločajo antikoagulate (omogočajo lažji prihod drugih celic do vira okužbe)
 - eozinofile pa lahko zapustijo kri - žile in izločajo toksine, proti parazitom, ki napadejo telo. Tudi ti imajo fagocitno sposobnost.

- Monociti iz njih se razvijejo makrofagi, ki so odgovorni za fagocitozo. Fagocitirajo samo tiste celice, ki jih limfociti označijo.
- Limfociti označujejo okužene celice oz. tujke in tu gre že za specifično obrambo.

Vnetje in vročina sta dva nespecifična obrambna sistema. Vnetje je lokalni način obrambe. Ta fiziološki proces ne loči med tem ali gre za infekt ali za mehansko poškodbo, oteklino, delovanje kemikalij, elektrike. Simptomi za vnetje so rdečica, bolečina, oteklina, občutek toplote na tem mestu. Namen vnetja je uničenje povzročitelja, omejitev efekta na določeno mesto in za popravilo poškodovanega tkiva. Pri vnetju se izloči histamin, tu lahko potem sodelujejo tudi bazofili, ki se nahajajo v okolju in izločijo tudi kinine (ti povzročijo bazodalitacijo (razširjanje žil), permeabilnost žil in s tem se pritegne tudi nevtrofile, ki sodelujejo pri fagocitozi). Poškodovane celice izločajo tudi še prostangladine in levkotriene. Te dve pa povzročijo kaogolacijo plazme in s tem se encimi in mikrobi lokalizirajo in povzročijo imobilizacijo organa. Odmrli makrofagi in nevtrofile lahko povzročijo gnojenje.

Končno sledi še popravilo tega poškodovanega tkiva. Lahko nastane stroma (podporno ali povezovalno tkivo), lahko pa nastane tudi parenhima, ki lahko funkcionalno nadomesti tisto poškodovano tkivo. Ponavadi ne pride do identične sinteze tkiva, ki je bilo primarno poškodovano.

Vročina je sistemska. Prizadeto je celotno telo gostitelja. Odgovor se odraža po celem telesu. Preko hipotalamusa je regulirana telesna temperatura. To je žleza v možganih in gre za telesni termostat, ki izloča določene hormone. Vendar da sproži sintezo prostangalidinov, mora hipotalamus dobiti nek signal. Ta je interlevkin 1. Ta sproži sintezo prostangladinov, izločajo pa ga fagociti. Prostangladini dvignejo telesno temperaturo na 39°C če so sproščeni v zadostni količini. Povzročajo skrčenje žil in povzročijo dvig metabolizma v celici. Ob bazokonstrikciji (krčenje žil) se žile skrčijo in to predvsem periferne žile na površini našega telesa. Občutek imamo da nas zebe, nas trese. To je ko imamo vročino. S krčenjem žil preprečimo preveliko izgubo toplote v okolje. Ko prostoglandini izginejo, začne telesna temperatura padati, žile se razširijo, telesna temperatura se začne ohlajevati. Mi imamo občutek, da nam je vroče, da nas kuha.

Kakšen je efekt povečanje temperature

Ti limfociti tudi povzročijo sproščanje interlevkini 1. Poveča se tudi sinteza interferona, poveča se metabolizem, kar omogoča hitrejše popravilo celic. Višja temperatura nam tudi omogoča nenormalen metabolizem mikroba (pri višji temperaturi se zniža nivo železa, katerega ga mikrob nujno rabi za svoj metabolizem). V telesu imamo še celo vrsto antimikrobnih substanc, ki lahko učinkovito napadejo mikrobo. V našem serumu (kri brez krvnih celic) je vsaj 20 takih proteinov, ki lahko nespecifično napadajo mikrobne celice. Ti sodelujejo pri lizi, fagocitozi, vnetnem procesu. To so npr. interferoni (antivirusni proteini α , β in γ tipi). Sinteza interferonov je sprožena v okuženi celici. V zdravi celici interferoni potem sprožijo sintezo antivirusnih proteinov. Interferon je neke vrste regulatorni protein, ki reducira prepis genov, ki sintetizirajo antimikrobne substance. Odkrili so ga pri osebah, ki imajo prehlad, potem niso te osebe dovzetne na druge virusne infekcije. Vzrok so interferoni. Ne preprečuje pa bakterijskih infekcij.

Specifična obramba

Imunski odgovor našega telesa je naravna pridobljena imuna aktivnost, ki je vezana na antitelesa. Sintetizirajo jo limfociti. Imamo naravno pridobljeno pasivno imunost (gre za antitelesa, ki iz matere preidejo v zarodek) in imamo umetno pridobljeno aktivno imunost, ki jo pridobimo z vakcinacijo. To lahko enostavno dobimo inaktivirane bakterijske toksine – toksoide, proti katerim potem naše telo pripravi samo primerna antitelesa. Lahko smo med vakcinacijo okuženi z mrtvimi organizmi, proti katerim naše telo zopet pripravi ustrezna antitelesa. Lahko smo vakcinirani z oslabljenimi organizmi. Nekatere vakcinacije pa tudi že dajo primerno pripravljena antitelesa.

Industrijska mikrobiologija

Mikrobe lahko uporabljamo v svojo korist. Uporaba za prehranske namene je že izredno stara. Stari Egipčani so pridobivali pivo, kruh(kvas),... Tudi nekatera plemena so ugotovila, da lahko skisano mleko predelamo v sir. Ravno tako se z mikrobi pripravlja vino,... Moderna mikrobná tehnologija pa je stara nekaj več kot 100 let. Tu so začeli mikrobe uporabljati bolj načrtno.

Kakšni so danes industrijski mikroorganizmi oziroma kaj je potrebno da lahko smatramo nek mikrob kot industrijsko uporaben.

Vsi industrijsko uporabljeni sevi so prvenstveno izolirani iz narave. Ti sevi morajo imeti sposobnost tvorbe nekega produkta, morajo imeti sposobnost rasti v velikem volumnu, na enostavnem cenemem gojišču. Zelo dobro je, da imamo na voljo sisteme, ki omogočajo gensko manipulacijo teh sevov. To pomeni, da imamo na voljo vektorje, transformacijske sisteme, ki omogočijo prenos in manipulacijo z geni. Ti mikroorganizmi tudi ne smejo biti patogeni. Mora imeti GRAS (generally recognised as safe). To pomeni, da noben sev ne sme povzročati kakršnih koli bolezni pri človeku ali živali. Tipično za industrijske seve je, da ko jih enkrat pripeljemo v produkcijo nekega proizvoda, jih izboljšujemo z mutagenezo ali z metodami rekombinantne DNA tehnologije.

Kakšni so vse biotehnoški produkti?

Kot prvo je kar mikrobná biomasa (mikrobne celice). Pri vzhajanju kruha uporabljamo kar cele kvasne celice, enako velja pri gojenju gob. Enako velja za mlečno-kislinske bakterije (skupaj z jogurtom pojemo tudi mikrobe).

Produkti mikroorganizmov:

Single cell protein so proteini, ki jih dobimo iz mikroorganizmov po večji razgradnji. Drugi produkti so encimi, ki jih ravno tako lahko pridobivamo z mikrobi predvsem glivami. Gre za ekstracelularne encime, kot so amilaze, pektinaze, celulaze, lipaze. Vse te encime lahko potem uporabimo naprej v industriji (industrija pralnih praškov (lipaze, pektinaze), amilaze pri pivu). Glukoza-izomeraza, glukoza-oksidaža lahko uporabljamo v diagnostične namene ali pa pri organski sintezi lahko določene stopnje vodimo z encimi kot biokatalizatorji. Tak primer je penicilin-acilaza. Tretja skupina produktov so mikrobní metaboliti. Te delimo na primarne metabolite in sekundarne metabolite. Primarni so etanol, očetna kislina, mlečna kislina, nekatere aminokisliline, citronska kislina. Te izvirajo direktno iz primarnega metabolizma, medtem ko sekundarni metaboliti, njihovi proteini izvirajo iz primarnega metabolizma, ampak je potrebnih še veliko stopenj, da pridemo do teh metabolitov. Sekundarni metaboliti so predvsem alkaloidi, antibiotiki, ki se uporabljajo predvsem za fermentološko učinkovite snovi.

Kako je tvorba produktov vezana na rast samega mikroba?

Primarni metaboliti se izločajo med primarno rastno fazo (eksponencialna ali trofofaza). Vedno nastajajo ti metaboliti ob rasti mikroorganizmov. V glavnem gre za energetsko bogate substance, katere bi se dale uporabiti dalje, če bi potekal metabolizem še naprej. Zato je dejansko izločanje primarnih metabolitov vezano na suboptimalne pogoje v gojišču. Tipičen primer je etanol (če bi imela kvasovka na voljo kisik, bi stekel metabolizem do konca preko glikolize do piruvata, preko cikla trikarboksilnih kislin do vode in CO₂. Če pa imamo anaerobne pogoje, se kopiči etanol. Podoben primer je citronska kislina pri *Aspergillus niger*. Substrat se kopiči samo če ni Mn ionov in če imamo veliko koncentracijo sladkorja. Rast samega *Aspergillus niger* pa je zavrnjena, zaradi pomanjkanja Mn iona.). V takih primerih lahko nekateri mikrobi izločajo primarne metabolite. Sekundarni metaboliti se izločajo šele ob izteku eksponencialne faze rasti in potem v začetku stacionarne faze in med njo (idio ali stacionarna faza). Tem metabolitom tudi pravimo idioliti. Če imajo mikrobi več ali maj enak metabolizem, se ne razlikujejo, medtem ko sekundarni metabolizem je izredno variabilen. Ti niso nujno potrebni za preživetje. Tekom evolucije so mutacije na tem delu metabolizma povzročale nastanek precejšnje variabilnosti. Sekundarni metaboliti so do molske teže 2000 Da in velikokrat ni razpoznavne uporabe teh sekundarnih metabolitov za mikrob. Jih producira, ni pa nujno da ima korist od tega. Lahko pa ti sekundarni metaboliti preprečujejo razvoj ostalih mikrobov v okolju. Izločanje in produkcija sekundarnih metabolitov, pa je izredno vezana na pogoje v gojišču, kot npr. kakšna je rast v eksponencialni fazi, kakšen je dostop kisika,... Nekateri mikrobi so sposobni izločati več sekundarnih metabolitov istočasno. Primer je sev streptomicet. En sev lahko izloča kar 32 različnih metabolitov istočasno). Značilno za produkcijo sekundarnih metabolitov je, da lahko produktivnost bistveno povečamo. Primer je produkcija penicilina z *Penicillium glivo*, kateri so produktivnost povečali za 50000x do sedaj. Nekaj z klasično mutagenozo, nekaj pa z načrtnim genskim inženiringom. To pa ne velja za primarni metabolizem. Za sintezo sekundarnih metabolitov je potrebnih precej stopenj. Za sintezo tetraciklina sodeluje 72 encimskih reakcij, pri sintezi eriotromicina (oba sta antibiotika) je potrebnih 25 encimskih stopenj. To se pravi, da morajo ti mikrobi, ki so sposobni te sekundarne metabolite sintetizirati, imeti kar lepo število genov za vse potrebne encime. Kljub temu pa število poti izvira iz primarnega metabolizma. Kako vse lahko nastajajo smo povedali pri antibiotikih. Sinteza potem poteka predvsem iz nakopičenih primarnih metabolitov (povečanje primarnih metabolitov povzroči povečanje proizvodnje sekundarnih metabolitov).

Karakteristike industrijskih bioprosesov.

Terminus fermentacija se velikokrat uporablja za gojenje kakršnega koli mikroorganizma. To velja na nivoju industrijskih bioprosesov in se razlikuje ta definicija od tiste pri metabolizmu. Tipi so lahko površinski – mikrob raste na površini nekega gojišča, ponavadi je to gojišče tekoče v velikih pladnjih. Mikrob se razvije v obliki mikrobne odeje, biomase, ki plava na površini. V tem primeru je mikrob v stiku z zrakom in produkte izloča v gojišče. Lahko so gojišča tudi trdna. Na teh gojijo gobe. Gre v glavnem za slamo ali kompost. Drug tip je submerzni način, kjer mikrob raste v gojišču. V tem primeru govorimo o šaržnem procesu (zaprtim angleško batch). Lahko je pol odprti proces (šaržni proces z napajanjem ali fedbatch). V principu gre za rast v neki posodi, kjer imamo gojišče z mikrobi, po določenem času se doda sveže gojišče, volumen se poveča, mikrob raste naprej, in to se ponavlja. S tem pa mikrob dela več produktov. Tretji način je kontinuirni (odprti proces). Tu stalno

dodajamo sveže gojišče, medtem ko mikrob z izrabljenim gojiščem stalno odvezujemo. Gojišča, ki jih uporabljamo v industriji morajo biti predvsem poceni in morajo vsebovati vse komponente, ki jih mikrob rabi za delovanje. Mora vsebovati vir C in ostale zahteve, ki jih ima mikrob. V industriji se melasa uporablja kot vir C. To je odpadni produkt pri pripravi sladkorja. Ta lahko še vedno vsebuje tudi do 50% sladkorja. Drug tak zelo pogost vir substratov je corn steep liquor. To je tekočina, ki ostaja pri mletju koruze. Vsebuje veliko N in rastnih faktorjev. Velikokrat se uporablja tudi sirotka. To dobimo, ko pripravljamo skuto. Od mleka ostaja tekočina, ki vsebuje veliko mineralov in laktoze. Kot vir proteinov pa se veliko uporablja sojina moka. Pri razvoju nekega gojišča je vedno potrebno optimizirati proces s smislom čim večjih dobitkov oziroma čim večje produktivnosti. Produktivnost pomeni, da mikrob čimveč produkta sintetizira na določeno časovno enoto, dobitek pa da, čimveč vira C ali N pretvori v končni produkt. Pri produktivnosti večja kot je, krajši je čas fermentacije. V glavnem počno to z gojenjem na stresalniku v paralelkah. To pa zato, da lažje kontrolirajo vir S,C,N, pH, stopnja prezračevanja. Iz teh rezultatov lahko z matematičnimi modeli pridobimo optimalne preseke ali pa si pomagamo z nevrosnkimi mrežami. To je druga metoda za optimizacijo teh procesov. Tu gre za empirično iskanje optimalnih pogojev, medtem ko je drugi pomemben faktor poznavanje metabolizma, poznavanje njegove regulacije. Na osnovi teh osnovnih fizioloških zahtev lahko potem izboljšamo produktivnost ali dobitke. Tu so pomembne anaplerotske poti (anaplarozne reakcije so tiste reakcije, ki omogočajo dvig intermediatov cikla trikarboksilnih kislin). Ravno tako je pomemben vpliv primarnega metabolizma. Večji kot je, večja je produktivnost. In na osnovi teh rezultatov, ki jih da produktivnost lahko načrtno spreminjamo mikrobo v smislu boljše produkcije.

Eden izmed načinov gojenja mikrobov je v fermentorjih ali bioreaktorjih. To so jeklene posode, v katerih imamo mešalo, ki stalno meša substrat oziroma brozgo z mikrobi, tako da imamo stalno homogene pogoje. V ta sistem od spodaj vpihujemo zrak, kjer so posebne frite, da zračne mehurčke razbijemo na čim manjše mehurčke. Prenos kisika iz plinaste faze v tekočo fazo je odvisno od površine mehurčkov. Tudi same lopatice mešala še dodatno razbijajo mehurčke kisika. Fermentorji morajo biti termostatorirani na ponavadi 30°C. Imamo manjše in večje fermentorje. Pri manjših moramo sistem segrevati, pri večjih pa ker imamo veliko biomase gre za tako eksotermne reakcije, da je treba sistem ohlajevati. To se izvrši z cirkulacijo vode v dvojnem plašču. Celoten proces se kontrolira z različnimi elektrodami (pH, za parcialni tlak kisika, za redoks potencial, za vsebnost CO₂). Velik problem je penjenje substrata, katero je treba kontrolirati. Vsako gojišče, ki ima proteine se rado peni, še posebej če dovajamo zrak. Peni se kontrolira z antipenilci (kemijsko). To so v glavnem razne maščobne kisline, lipidi, lahko pa tudi mehansko z različnimi razbijalci. Če ne kontroliramo penjenja, se lahko zgodi, da mikrobne celice vrže ven iz substrata in se začno razmnoževati na vrhu ali pa odidejo iz fermentorja skozi odtočno cev za zrak. Pri načrtovanju fermentorja je pomembno povečevanje volumnov (scale up-proces). Poznamo tri tipe fermentorjev glede na velikost (delovnega volumna):

- Laboratorijski fermentorji 5-10 l
- pilotni fermentorji 100-1000 l
- industrijski fermentorji 50-več 100000 l

Pri prenosu iz malih fermentorjev v velike je potrebno upoštevati vse inženirske lastnosti, da lahko to prenesemo na velike fermentorje.

Bioreaktorji

Fermentorji so mešalni tip bioreaktorja. Za to, da bi se zmanjšala energija za gojenje mikrobov, se uporabljajo stolpni reaktorji. Gre za visok ozek fermentor, kjer potem spodaj vpihujemo zrak. Ti mehurčki, ki se dvigajo mešajo substrat. Lahko imamo tudi stolpni fermentor, pri katerem od zgoraj črpamo gojišče in ga od spodaj znova vpihujemo z svežim zrakom nazaj v stolpni fermentor. Na tak način poteka mešanje in vzdrževanje homogenosti.

Imamo še drug tip fermentacije. To so tako imenovani dvofazni sistemi, kjer imamo poleg vodne faze še neko drugo nepolarno fazo (kloroform). Določeni produkti mikrobov potem kontinuirno prehajajo iz vodne faze v polarno fazo in se izolirajo (v bistvu gre za ekstrakcijo). Tako si olajšamo izolacijo produkta. Ni pa nujno, da imamo vedno mikrob prosto plavajoč v substratu. Lahko je imobiliziran. Normalno se za tako imobilizacijo uporabljajo alginat. Gre za navzkrižno vezavo z polimerizacijo npr. glutan aldehidom kamor se potem vežejo mikrobne celice. Lahko imamo mikrob vezan na nosilec na osnovi kovalentne vezave ali pa imamo majhne nitro kapsule, ki so obdane z semipermeabilnimi membranami in mikrob je potem vezan v teh mikro kapsulah. Pri nekaterih biotehnoških procesih lahko namesto celotnega mikroba uporabljamo samo encime, jih imobiliziramo in vodimo cel proces.

Kaj je prednost imobilizacije?

Na koncu vsakega procesa moramo produkt izolirati, očistiti, imobilizacija pa nam to olajša. Lažje odstranimo celice, mikrobno biomaso, tako da celoten proces poteka lažje, hitreje in ceneje. Imobilizacija produkta je vsaj tako draga, kot sama fermentacija. Najprej je treba iz takih brozg odfiltrirati mikrobov. To je precej zoprna zadeva predvsem pri bakterijah. Te so majhne in filtri nam ne koristijo doti, ker bi se prehitro zamašili, tako da centrifugiramo. Lažje je odstraniti filamentozne glive, ki tvorijo večje pelepe. Izolacija samega produkta pa poteka potem z obarjanjem ali različnimi kromatografskimi metodami. Tudi stopnja čistosti produkta je odvisna od tipa produkta. Pri določenih produktih, ki se uporabljajo v prehranski industriji je dovolj, da se uporablja tehnična čistost. Za zdravila je potrebna izredno izredno visoka stopnja čistosti in seveda še test na pirogene snovi (pirogene snovi so tiste snovi, ki bi ob zaužitju povzročile dvig telesne temperature). Vse produkte, ki jih dobimo delimo v dva dela (glede na ceno in količino). Eni so high volume low price (pekovski kvas, etanol, razne kisline, očetna kislina). To so poceni substance, ki jih gojimo v velikih količinah. (malo dražji so amilaza, renin (uporablja se v sirarstvu). Ti imajo ceno 100\$/kg. Encimi, ki se uporabljajo v diagnostiki (glukoza oksidaza 1000\$/kg). Luciferaza je npr. že 1000000\$/kg. Zadnji so terapevtski encimi, faktor VIII (100000000\$/kg). Določeni biotehnoški produkti so lahko zelo dragi.

Kakšni so vse produkti fermentacije?

Precej se še vedno pridobiva antibiotikov. Pridobiva se jih več kot 100000 ton letno in gre za posel, ki je vreden 7000000000\$. Znanih je več kot 8000 antibiotikov, s tem da se jih v medicinske namene uporablja veliko manj (razlog: rezistenca). Producenti so predvsem streptomicete, nekateri sevi rodu bacillus in nekatere filamentozne glive (penicilium akremonium). Gre za tipične sekundarne metabolne produkte. Kar nekaj antibiotikov danes pridobivajo z organsko sintezo, ali pa da samo določene prekursorje pridobijo po biotehnoški poti, potem pa z organsko sintezo predelajo naprej. Podobno kot antibiotiki se uporabljajo steroidi, hormoni, alkaloidi. Te tudi sintetizirajo določeni mikrobi. Gre za naravne učinkovine, katere raziskujejo le večje multinacionalke, ker imajo dovolj denarja, da lahko iščejo te nove naravne

učinkovine. Tu gre namreč za velika denarna sredstva, ker je treba pregladati vedno več snovi, da se dobi en uporaben produkt. Take raziskave ogromno stanejo. Od takrat dalje, ko najdejo eno tako učinkovino, pa do uporabe so pred klinični in klinični testi, ki trajajo 5-6 let. Na teh testih jih tudi precej odpade. Te antibiotike in mikroorganizme (če jih predelajo) potem patentirajo.

Generiki so substance, ki so bile odkrite v multinacionalkah, zaščitene so bile z patentom za dobo 20. let, potem pa lahko kdorkoli pridobiva te substance. In to, ko jih po dobi 20. let začno pridobivati druga podjetja, to so generiki. Cena generikov je bistveno nižja kot cena originatorjev.

Poleg antibiotikov, steroidov so tudi vitamini. Vitamin riboflavin B2 producira ga gliva *Ashbya gassypii* lahko pa se pridobiva tudi sintetsko. Nekatere aminokislino se tudi tako pridobivajo. Najbolj pomembna je glutaminska kislina. Uporablja se predvsem kot dodatek jedem, saj jim izboljša okus, potem so še aspartat, fenilalanin, kot umetna sladila, lizin, kot esencialna aminokislina za človeka. Tega je manj v rastlinskem materialu, zato ga imajo vegeterjanci premalo.

Kako pa se vrši produkcija aminokislino?

Pri njih imamo vedno inhibicijo povratne zveze. Zato je potrebno pridobiti encime, ki so rezistentni na inhibicijo povratne zveze in potem jo lahko mikrob izloča v gojišče. Še eni pomembni produkti so encimi, kot končni produkti fermentativnih biotehnoloških procesov. Gre za ekstracelularne encime, ki se jih uporablja ali v pranih praških ali v diagnostične namene. Tudi v prehrabeni industriji se dodajajo encimi. Večinoma so producenti glive. Rekli smo, da askomicetne glive igrajo pomembno vlogo pri kroženju ogljika v naravi, pri kroženju odmrlega rastlinskega materiala. Kot take so tekom evolucije razvile ogromno encimov za razgradnjo tega materiala (pektinaze, celulaze, lipaze,...). Veliko teh encimov lahko potem uporabimo v pralnih praških (proteaze – proteinski madeži, lipaze za maščobne, amilaze v prehrabeni industriji, pektinaze v pripravi sadnih sokov. Te zbistrijo sadni sok.). V diagnostične namene lahko uporabljamo oksidoreduktaze. Tu so predvsem dehidrogenaze in oksidaze, lahko pa tudi restriksijski encimi in nekateri ostali encimi, kot transferaze, izomeraze,... se lahko uporabljajo v diagnostične namene. Producenti so ekstremofilne bakterije in glive. V industriji ne uporabljajo primarnih producentov za produkcijo teh substanc, ampak tehnologijo rekombinacije. Iz primarnega producenta vzamejo gen, mu dodajo močan promotor, ki poveča transkripcijo, potem to vgradijo v dober industrijski mikroorganizem, ki potem producira te encime. Predvsem nekateri sevi *A. (aspergillus) oryzae*.

Kaj so to biotransformacije ali bioknverzije?

Določene stopnje v sintezi lahko lažje sintetizirajo mikrobi ali encimi, ki jih z njimi pridobivamo. Mikrobi tu sodelujejo samo kot biokatalizatorji za izvedbo točno določene reakcije, s tem da substrata ne porabi kot vir energije ampak kot vir C ali N. *Rhizopus nigricans* hidrolizira progesteron (na 11 mestu).

Prehrabena industrija temelji na biotehnoloških procesih. Veliko živil pridobivamo s predelavo z mikroorganizmi. Ena od takih je citronska kislina. Producira jo *aspergillus niger*. V 19. stoletju so jo pridobivali iz limone. Uporablja se kot naraven konzervans (v sadnih sokovih, v tekočih živilih, saj zniža pH in onemogoči razmnoževanje mikrobov). V začetku 20. stoletja so uvedli fermentativno pridobivanje najprej površinsko, kasneje pa tudi v fermentorjih. Danes se pridobi 80000 ton citronske kisline z *Aspergillus nigrom*. Gre za high volume low price. Taki veliki fermentativni procesi niso najbolj primerni za okolje, kajti ko se konča fermentacija ostane veliko produktov. Drug pomemben produkt je etanol. Pridobivamo ga z kvasovkami

Saccharomyces cerevisiae (vino). Pri pivu *Saccharomyces carlbergensis*. Ječmen je treba najprej nakaliti, ker je v zrnih sladkor spravljen v obliki škroba. Med kaljenjem amilaze, ki se sprostijo v ječmenu razgradijo škrob do mono in disaharidov in šele to lahko potem kvasovke predelajo v etanol. Na koncu se doda hmelj za okus in za preprečitev nadaljnje rasti mikrobov. Viski je enako narejen kot pivo, samo da po fermentaciji z kvasovkami se ne doda hmelj, ampak se to destilira. Če vino ostane odprto v dostopu zraka, dobimo kis. Ta se pridobiva lahko iz sadja. Tu nastopijo bakterije iz rodu acetobacter. Gre za aerobno pretvorbo etanola v očetno kislino. Imamo različne procese: odprta kad, kjer vino nalijemo v velike kadi in acetobacter potem dela svoj posel. Lahko imamo tako imenovano kapljalno metodo, kjer imamo v neki posodi žagovino, od spodaj vpihujemo zrak, zgoraj pa vlažimo z vinom ali fermentiranim sadjem. To potem počasi pronica preko ostružkov, kjer so imobilizirane bakterijske celice in ga pretvorijo v očetno kislino. Lahko pa imamo običajno submerzno fermentacijo, kjer imamo fermentorje in spet mikrobi veselo delajo. Mlečna industrija uporablja predvsem bakterije. Za pripravo skute potrebujemo proteaze. Te so včasih pridobivali iz želodca telet, ki so še pila mleko pri materah kravah. Dobili so ene nadomestke, »rizomuko«. Danes so ti encimi, ki se uporabljajo za pripravo so večinoma mikrobnega razvoja. Pri nastajanju sira pa nastopa potem še cela vrsta mikrobov, ki sodelujejo pri zorenju sira. Pri mehkih sirih mikrob zraste samo na površini, pri trdih pa imamo tudi mikrobe, ki predelujejo laktozo v sami sredici in kot produkt nastaja CO₂. Zato ima ementalec tako velike luknje. *Streptococcus*, *Lactococcus*, *penicillium*. Pri jogurtu *Lactobacillus* bolgarius, kefir.

Celo vrsto imamo potem še rastlinskih proizvodov. Olive se fermentirajo, ravno tako je kisanje zelja fermentacija (*Lactobacillus plantarum*). Sojina omaka je tipičen produkt fermentacije (*A. oryzae*). Pri pripravi kruha uporabljamo kvasne celice, kjer gre za *Saccharomyces cerevisiae*, kvasne celice predvsem izločajo CO₂, ki naredi testo mehko zaradi mehurčkov, ki nastanejo pri vzhajanju kruha. Nekatere gobe so užitne (šampinjoni, ostrigarji). Poleg prehranske industrije jih lahko uporabljajo v rudarstvu za tako imenovano mikrobo luženje. Rudo, ki jo skopljejo navlažijo in onukulirajo z mikrobi (spirajo). Mikrobi potem uporabljajo nekatere minerale kot terminalne akceptorje elektronov, na ta način ferit, kjer je železo v ferioobliki, pretvorijo v fero obliko in dobimo železovo oborino, ker je fero oblika netopna v nevtralnem. Gre za relativno počasen proces, ampak če imamo veliko površino, je to ekonomsko bolj ugodno kot taljenje v plavžih. Podobno delajo z bakrom, nenazadnje mikrobe s pridom uporabljamo tudi v čistilnih napravah, kjer gre za odstranjevanje organskih in anorganskih odpadkov. Predvsem mikrobi odstranijo organske snovi in znižajo tako imenovan BOD (biološko oksidativno zahtevo). V čistilnih napravah gre za večstopenjski proces. Najprej gre za mehansko odstranitev netopnih snovi, gre za separacijo, kjer se te mehanske snovi v glavnem usedejo na račun sedimentacije. Voda, ki ostane, se spravi v aerobni proces, kjer potem rastejo mikrobi v obliki filma (na kamnih ali filtrih, kamor se prši to vodo). Ti mikrobi iz te vode potem odstranijo organske snovi. V teh kamnih nastaja mikrobova biomasa ki se potem usede kot oživiljeno blato. To se potem uporablja kot hranilna substanca za gnojenje. 75-95% se zmanjša ta BOD. Lahko poteka tudi ta drugi del anaerobno, v zaprtih tankih, v tem primeru mikrobi organske snovi predelajo v CO₂ in metan. Biološka poraba pa se pri tem zmanjša še bolj (95%) in voda je potem čista in se jo lahko spusti v reke.