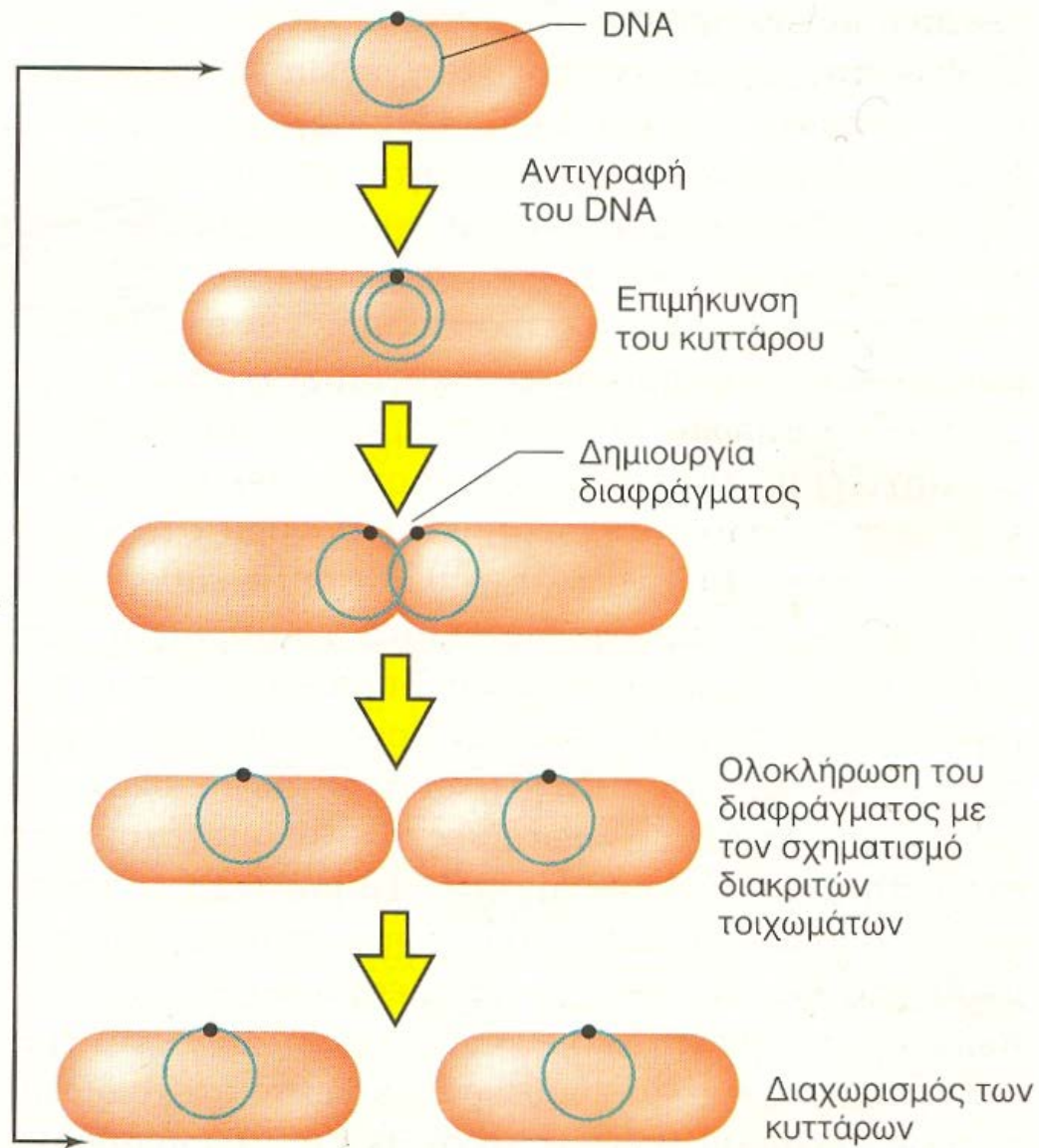


Μικροβιακή Αύξηση

Κυτταρική αύξηση και διχοτόμηση

- Στους περισσότερους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, η ανάπτυξη ενός μεμονωμένου κυττάρου συνεχίζεται μέχρι τη διαίρεσή του σε δύο νέα κύτταρα (**διχοτόμηση**).
- Τα κύτταρα επιμηκύνονται μέχρι να γίνουν περίπου διπλάσια σε μήκος και κατόπιν δημιουργείται ένα χώρισμα (**διάφραγμα**) το οποίο διαιρεί σταδιακά το κύτταρο σε 2 θυγατρικά.
- Το διάφραγμα δημιουργείται με την επέκταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος προς το εσωτερικό του κυττάρου μέχρι τον σχηματισμό των 2 θυγατρικών κυττάρων.
- Κατά τη διάρκεια του αυξητικού κύκλου, όλα τα κυτταρικά συστατικά πολλαπλασιάζονται, έτσι ώστε κάθε θυγατρικό κύτταρο να διαθέτει πλήρες χρωμόσωμα και επαρκή αριθμό κυτταρικών οργανιδίων.
- Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη αυξητικό κύκλο στα βακτήρια ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται από ένα σύνολο θρεπτικών και γενετικών παραγόντων.

Μία γενεά

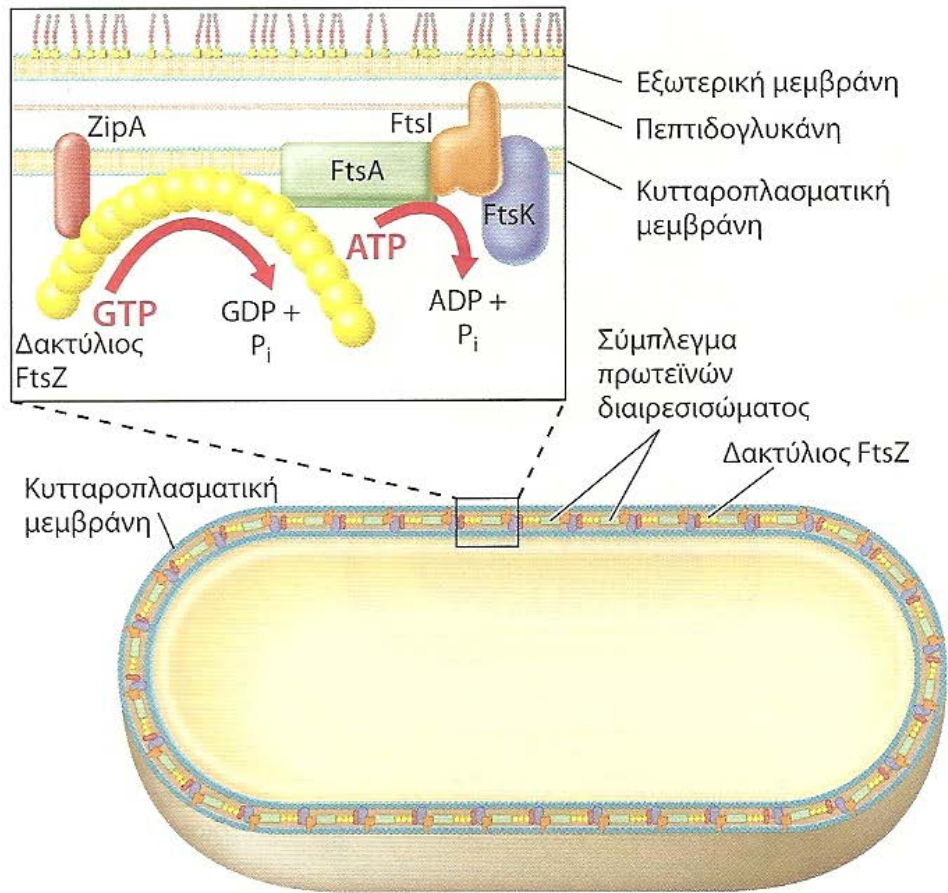


Σχ.114. Διαδικασία διχοτόμησης ενός ραβδόμορφου προκαρυωτικού κυττάρου.

Πρωτεΐνες Fts και το επίπεδο κυτταρικής διαίρεσης

- Έχουν αναγνωρισθεί πολλές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική κυτταρική διαίρεση των προκαρυωτών (**πρωτεΐνες Fts**).
- Η **FtsZ** είναι μια **πρωτεΐνη-κλειδί** αυτής της ομάδας.
- Οι πρωτεΐνες Fts είναι ευρύτατα διαδεδομένες στους προκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένων και των αρχαίων, ενώ πρωτεΐνες τύπου FtsZ έχουν βρεθεί σε μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες υπογραμμίζοντας την εξελικτική τους συγγένεια με τα βακτήρια.
- Οι πρωτεΐνες Fts σχηματίζουν μια «συσσκευή» διαίρεσης, το **διαιρεσίωμα**.
- Ο σχηματισμός του διαιρεσιώματος αρχίζει με την πρόσδεση μορίων FtsZ σε έναν δακτύλιο γύρω από τον κυτταρικό κύλινδρο στο κέντρο του κυττάρου (επίπεδο κυτταρικής διαίρεσης).
- Σε ένα κύτταρο *E. coli*, για τον σχηματισμό του δακτυλίου πολυμερίζονται περίπου 10,000 μόρια πρωτεΐνης FtsZ.

- Τα μόρια της πρωτεΐνης FtsZ πολυμερίζονται και δημιουργούν ένα πλήρη δακτύλιο.
- Ο δακτύλιος που σχηματίζεται προσελκύει και άλλες διαιρεσισωματικές πρωτεΐνες Fts, συμπεριλαμβανομένων των FtsA και ZipA.
- Η ZipA αποτελεί την «άγκυρα» που συνδέει τον δακτύλιο FtsZ με την κυτταροπλασματική μεμβράνη.
- Η FtsA συνεισφέρει, επίσης, στη σύνδεση του δακτυλίου FtsZ με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά και στην προσέκλυση πρόσθετων διαιρεσισωματικών πρωτεϊνών.
- Το διαιρεσίωμα περιέχει, επίσης, πρωτεΐνες Fts αναγκαίες για τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης (π.χ. FtsI).
- Η FtsI είναι μια από τις πολλές **πρωτεΐνες δέσμευσης της πενικιλίνης**.
- Το διαιρεσίωμα ενορχηστρώνει τη σύνθεση νέου υλικού κυτταροπλασματικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος (**διάφραγμα διαίρεσης**).

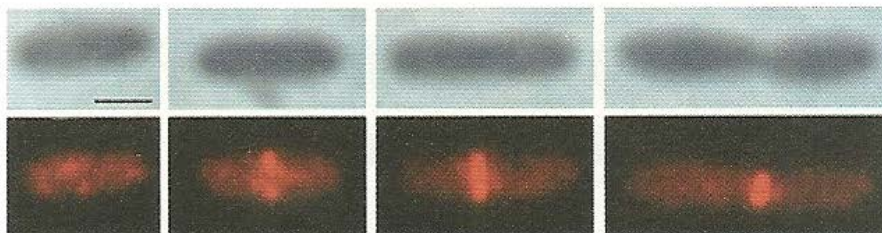


Σχ.115. Ο δακτύλιος FtsZ και η κυτταρική διαίρεση.

(α) Εγκάρσια τομή ραβδόμορφου βακτηρίου. Η ZipA αποτελεί την άγκυρα του FtsZ, η FtsI είναι μια πρωτεΐνη βιοσύνθεσης πεπτιδογλυκάνης, η FtsK βοηθά στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και η FtsA είναι μια ATPάση.

(β) Σχηματισμός και αποικοδόμηση του δακτυλίου FtsZ στην *E. coli*.

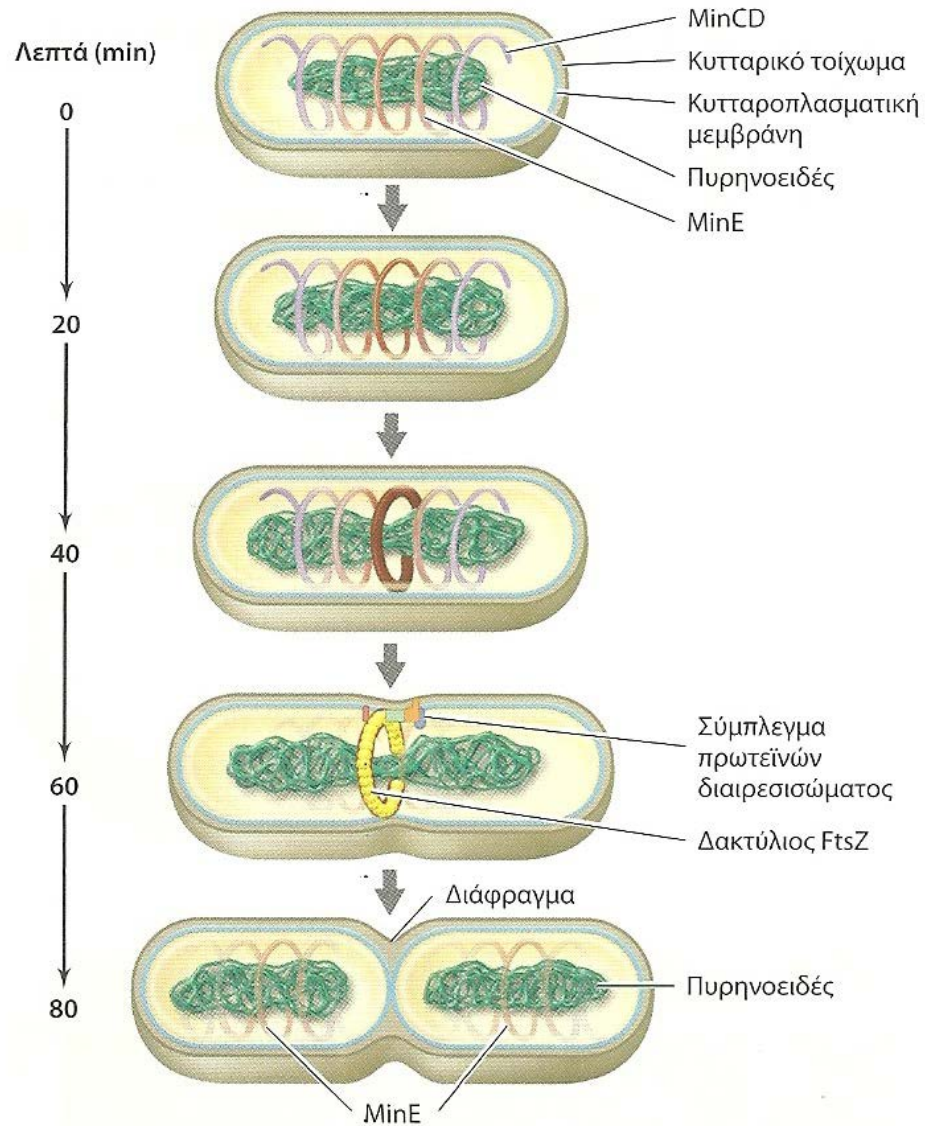
(α)



T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

(β)

- Η αντιγραφή του DNA πραγματοποιείται πριν από την κατασκευή του δακτυλίου FtsZ.
- Η ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA αποτελεί μάλλον το μήνυμα για τον σχηματισμό δακτυλίου FtsZ, ο οποίος δημιουργείται στον χώρο ανάμεσα στα διπλασιασμένα πυρηνοειδή.
- Ο καθορισμός του μέσου του κυττάρου συντελείται με τη βοήθεια μιας σειράς πρωτεϊνών (**πρωτεΐνες MinC, MinD** και ιδιαίτερα της **MinE**).
- Όταν λαμβάνει χώρα η περίσφυξη, ο δακτύλιος FtsZ αποπολυμερίζεται, δίνοντας το έναυσμα για την εσωτερική αύξηση του τοιχώματος και τον διαχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων.
- Η πρωτεΐνη FtsZ διαθέτει ενζυμική ενεργότητα υδρόλυσης GTP, για την παραγωγή ενέργειας που απαιτείται για τον σχηματισμό και την αποικοδόμηση του δακτυλίου FtsZ.

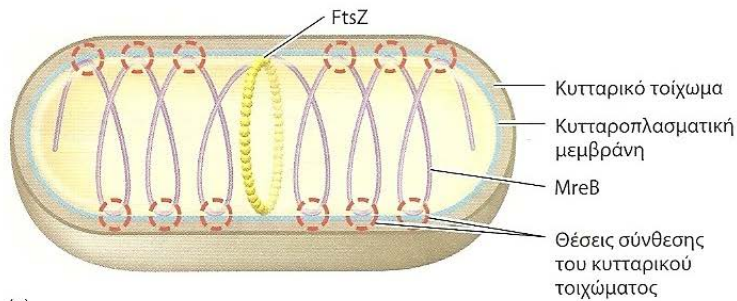


Σχ.116. Αντιγραφή DNA και κυτταρική διαίρεση.

- Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, η πρωτεΐνη-κλειδί για τον καθορισμό του **κυτταρικού σχήματος** είναι η **πρωτεΐνη MreB**, που σχηματίζει ένα κυτταροσκελετό σε διάφορα είδη βακτηρίων και σε ορισμένα είδη αρχαίων.
- Η MreB σχηματίζει μια νηματοειδή έλικα περιμετρικά στο εσωτερικό του κυττάρου, κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη.
- Ο σκελετός της MreB ενδεχομένως καθορίζει το κυτταρικό σχήμα προσελκύοντας και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος.
- Βακτήρια σχήματος κόκκου δεν διαθέτουν πρωτεΐνη MreB, ούτε και το γονίδιο που την κωδικοποιεί, υποδηλώνοντας ότι το «προδιαγεγραμμένο» σχήμα των βακτηρίων αυτών είναι σφαιρικό.
- Επίσης, η απενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την MreB στα ραβδομορφα βακτήρια έχει ως αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό τους σε κόκκους.
- Οι ποικίλες μορφολογικές διαφοροποιήσεις των μη σφαιρικών προκαρυωτικών κυττάρων οφείλονται σε αντίστοιχες διαφοροποιήσεις της διάταξης των νηματίων της MreB.

Πως καθορίζει το σχήμα του κυττάρου η MreB?

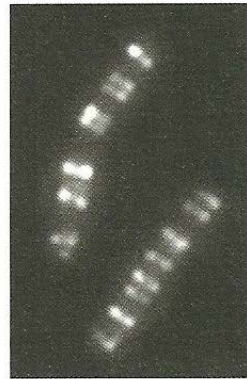
- Οι ελικοειδείς δομές της δεν είναι στατικές, αλλά περιστρέφονται μέσα στο κυτταρόπλασμα ενός αναπτυσσόμενου κυττάρου.
- Η νεοσυντεθείσα πεπτιδογλυκάνη συνδέεται με τις έλικες της MreB στα σημεία που αυτές έρχονται σε επαφή με την κυτταροπλασματική μεμβράνη.
- Η MreB, μάλλον, περιορίζει τη σύνθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος σε συγκεκριμένες θέσεις, επιτρέποντας στο νέο κυτταρικό τοίχωμα να σχηματιστεί σε διάφορα σημεία κατά μήκος του κυττάρου.
- Το *Caulobacter crescentus* (σχήμα δονακίου) παράγει εκτός από την MreB και την **κρεσκεντίνη**.
- Αντίγραφα της κρεσκεντίνης οργανώνονται σε νημάτια στην κοίλη επιφάνεια του κεκαμμένου κυττάρου.
- Εκτιμάται ότι η διάταξη των νηματίων προσδίδουν στο κύτταρο την χαρακτηριστική του μορφή.



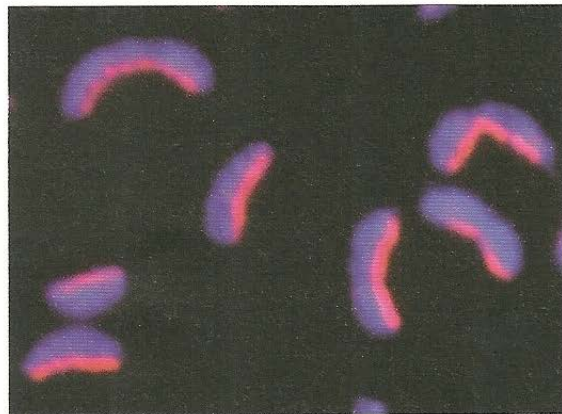
(α)



(β)



Alex Formstone



(γ)

Christine Jacobs-Wagner

Σχ.117. Η πρωτεΐνη MreB και η κρεσκεντίνη ως παράγοντες που καθορίζουν την κυτταρική μορφολογία.

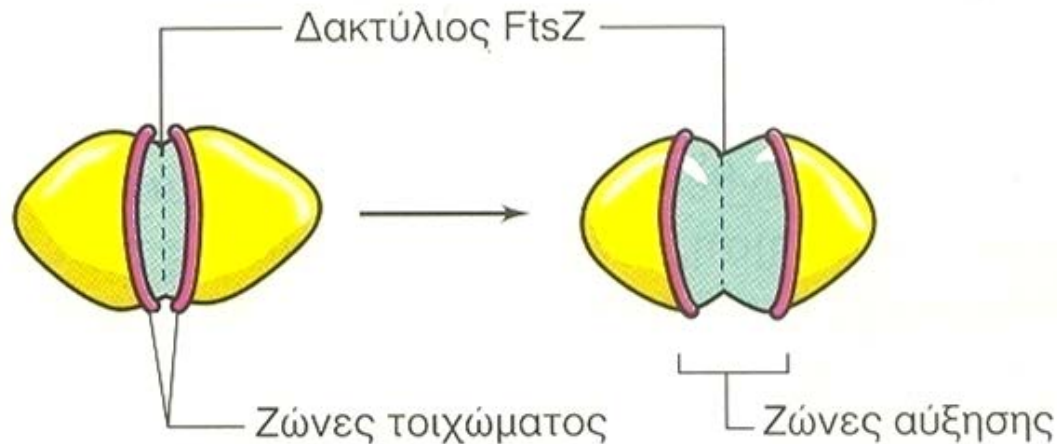
(α) Η MreB ελίσσεται σαν σπείρα και έρχεται σε επαφή με την κυτταροπλασματική μεμβράνη σε διάφορα σημεία (θέσεις σύνθεσης νέου κυτταρικού τοιχώματος).

(β) Μικροφωτογραφίες κυτάρων *Bacillus subtilis*. Η MreB φθορίζει.

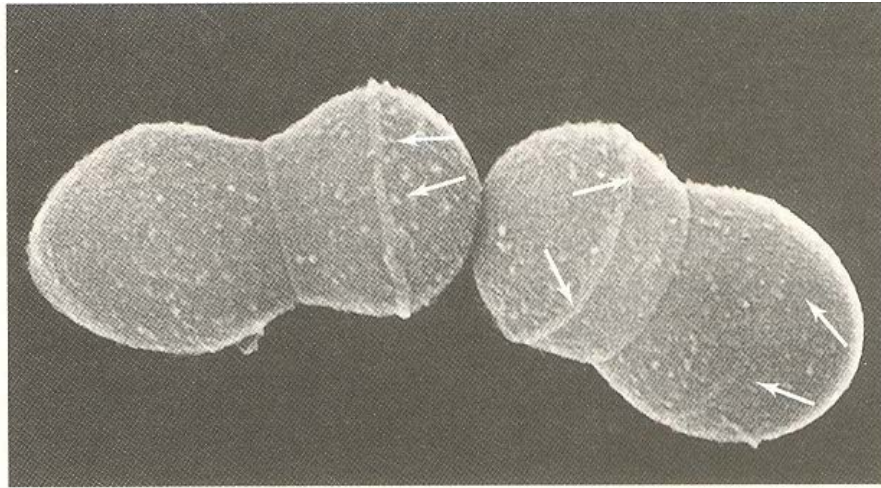
(γ) Κύτταρα *Caulobacter crescentus*. Η κρεσκεντίνη εμφανίζεται με κόκκινο και το DNA με μπλε.

Σύνθεση πεπτιδογλυκάνης και κυτταρική διαίρεση

- Όταν ένα κύτταρο μεγενθύνεται πριν την κυτταρική διαίρεση, συντίθεται νέο κυτταρικό τοίχωμα που προστίθεται στο προϋπάρχον, χωρίς να διαταράσσεται η δομή του τοιχώματος.
- Με αφετηρία τον δακτύλιο FtsZ δημιουργούνται μικρά ανοίγματα στο τοίχωμα από τις **αυτολυσίνες** (έχουν παρεμφερή δράση με τη **λυσοζύμη**), οι οποίες βρίσκονται στο διαιρεσίσωμα.
- Η ένωση της παλιάς και της νέας πεπτιδογλυκάνης δημιουργεί μια αναδίπλωση στην επιφάνεια του κυττάρου των Gram (+) βακτηρίων, ανάλογη μιας ουλής.



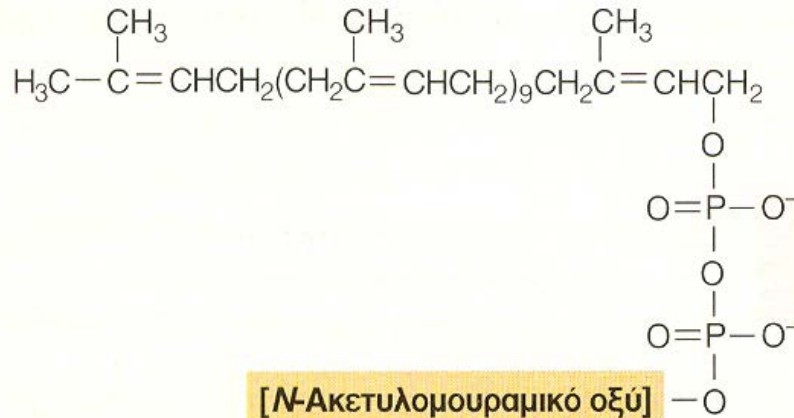
Σχ.118. Η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης σε Gram (+) βακτήρια.



Σχ.119. Ηλεκτρονικό μικρογράφημα *Streptococcus hemolyticus*. Τα βέλη δείχνουν τις ζώνες του τοιχώματος.

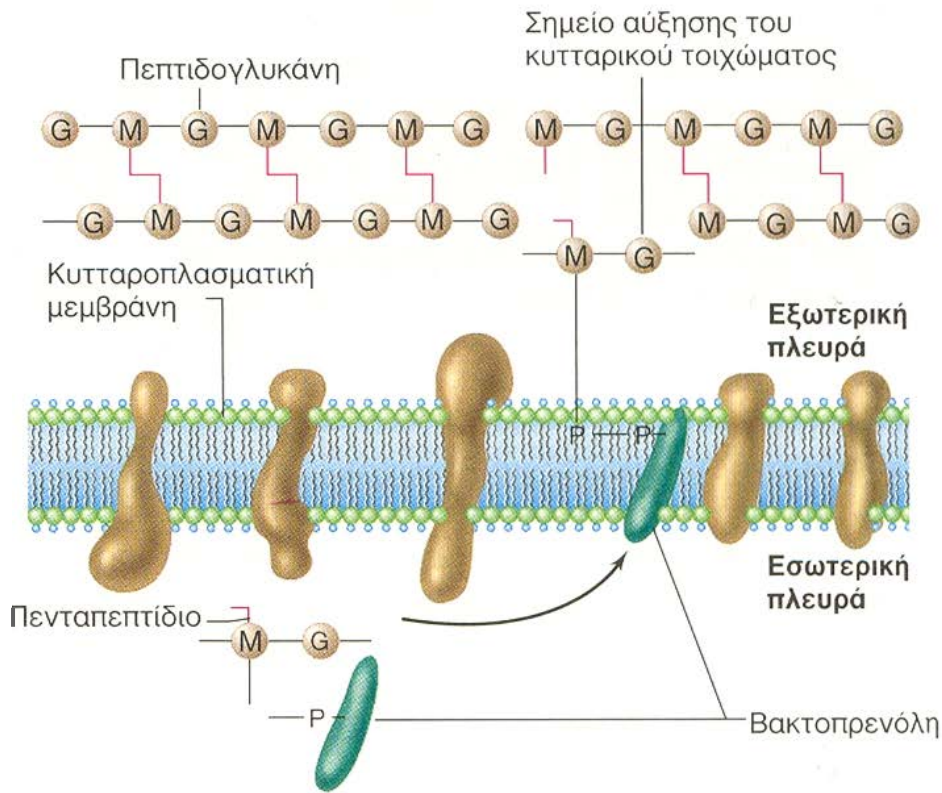
Βιοσύνθεση πεπτιδογλυκάνης

- Κατά τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, γίνονται ελεγχόμενες τομές από τις αυτολυσίνες στην προϋπάρχουσα πεπτιδογλυκάνη, με ταυτόχρονη ένθεση πρόδρομων μορίων.
- Σπουδαίο ρόλο στην όλη διαδικασία παίζει ένα μόριο-φορέας λιπιδικής φύσεως, η **βακτοπρενόλη**.

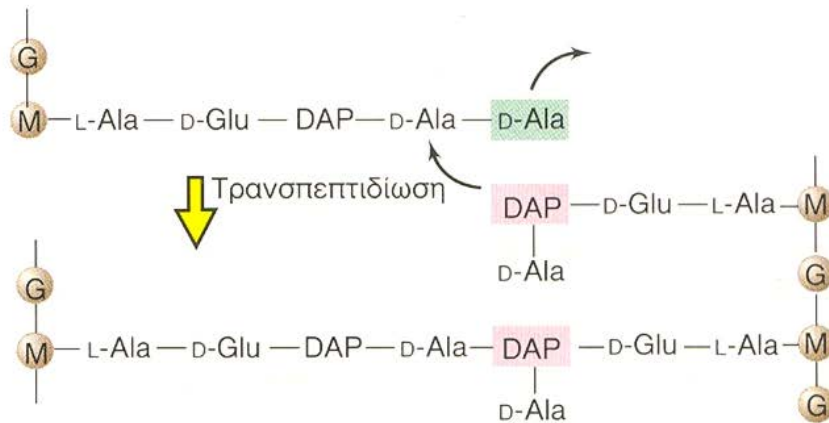


Σχ.120. Η βακτοπρενόλη.

- Η βακτοπρενόλη είναι μια έντονα υδρόφοβη αλκοόλη C55, που συνδέεται με το N-ακετυλογλυκοζαμίνη/N-ακετυλομουραμικό οξύ/πενταπεπτιδίο, πρόδρομο μόριο της πεπτιδογλυκάνης.
- Ο ρόλος της βακτοπρενόλης είναι η μεταφορά του N-ακετυλογλυκοζαμίνη/N-ακετυλομουραμικό οξύ/πενταπεπτιδίου δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, καθιστώντας τα πρόδρομα μόρια αρκετά υδρόφοβα, ώστε να διέλθουν ανέπαφα από το εσωτερικό της.



(α)



(β)

Σχ.121. Σύνθεση πεπτιδογλυκάνης:
 (α) Μεταφορά πρόδρομων μορίων πεπτιδογλυκάνης δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο σημείο αύξησης του κυτταρικού τοιχώματος,
 (β) Αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης.

- Το τελικό στάδιο στη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος είναι ο σχηματισμός πεπτιδικών διασυνδέσεων μεταξύ καταλοίπων μουραμικού οξέος σε παρακείμενες αλυσίδες γλυκάνης (**τρανσπεπτιδίωση**).
- Η τρανσπεπτιδίωση έχει ιδιαίτερη ιατρική σημασία, γιατί είναι η αντίδραση που παρεμποδίζεται από την **πενικιλίνη**.
- Έχουν χαρακτηριστεί πολλές πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πενικιλίνη στο περίπλασμα Gram (-) βακτηρίων (μια από αυτές είναι η πρωτεΐνη FtsI).
- Όταν η πενικιλίνη δεσμεύεται, οι πρωτεΐνες χάνουν την καταλυτική ενεργότητά τους.
- Απουσία σύνθεσης νέου κυτταρικού τοιχώματος, η συνεχής δράση των αυτολυσινών οδηγεί σταδιακά σε ατροφία του κυτταρικού τοιχώματος και τελικά σε κυτταρική λύση.

- Η τρανσπεπτιδίωση περιλαμβάνει το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών με ένα ή περισσότερα διαφορετικά αμινοξέα, ανάλογα με τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος κάθε μικροοργανισμού.
- Στα Gram (-) βακτήρια, οι διασυνδέσεις δημιουργούνται συνήθως ανάμεσα στο DAP του ενός πεπτιδίου και στη *D*-αλανίνη παρακείμενου πεπτιδίου (η FtsI λειτουργεί ως τρανσπεπτιδάση).
- Αρχικά, στο άκρο του πρόδρομου μορίου πεπτιδογλυκάνης υπάρχουν 2 κατάλοιπα *D*-αλανίνης, αλλά η μια *D*-αλανίνη απαμακρύνεται κατά την αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης, παρέχοντας την απαιτούμενη ενέργεια, καθώς η τρανσπεπτιδίωση λαμβάνει χώρα έξω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου δεν υπάρχει διαθέσιμο ATP.

Αύξηση του πληθυσμού

- Οι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση, αυξάνονται μέχρι διπλασιασμού του μεγέθους τους και στη συνέχεια διαιρούνται σε δύο ίσα μέρη.
- Η αύξηση μιας καλλιέργειας είναι ανάλογη του αριθμού ή της μάζας των κυττάρων:

$$\text{Αύξηση καλλιέργειας} = \mu (\text{αριθμός ή μάζα κυττάρων}) \quad (10)$$

- Η σταθερά μ είναι δείκτης του ρυθμού αύξησης και ονομάζεται **σταθερά ρυθμού αύξησης**.
- Η μαθηματική έκφραση της εξίσωσης (10) είναι:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad \text{ή} \quad \frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{ή} \quad \frac{dz}{dt} = \mu Z \quad (11)$$

Όπου: N: ο αριθμός κυττάρων/mL

X: μάζα κυττάρων/mL

Z: το μέγεθος οποιουδήποτε κυτταρικού συστατικού

dt: η χρονική στιγμή στην οποία μεταβλήθηκε το μετρούμενο μέγεθος της καλλιέργειας.

- Ολοκλήρωση της (11) δίνει:

$$\ln Z - \ln Z_0 = \mu(t-t_0) \quad (12)$$

- Η μετατροπή της (12) σε δεκαδικούς λογάριθμους δίνει:

$$\log_{10} Z - \log_{10} Z_0 = \frac{\mu}{2.303} (t-t_0) \quad (13)$$

- όπου Z και Z_0 αντιπροσωπεύουν τις τιμές οποιουδήποτε βακτηριακού συστατικού σε χρόνους t και t_0 αντίστοιχα.
- Μετρώντας τις τιμές Z και Z_0 είναι δυνατός ο προσδιορισμός της σταθεράς ρυθμού αύξησης (μ), η οποία εκφράζει το ρυθμό αύξησης μιας καλλιέργειας.
- Παράδειγμα: Μια καλλιέργεια περιέχει 10^4 κύτταρα/mL στο χρόνο t και 10^8 κύτταρα/mL 4 ώρες αργότερα, ο ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας είναι:

$$\mu = \frac{(8-4) 2.303}{4 \text{ ώρες}} = 2.303/\text{ώρα}$$

- Μια άλλη παράμετρος που καθορίζει τον ρυθμό αύξησης μιας καλλιέργειας είναι ο χρόνος διπλασιασμού (g). Ορίζεται ως ο **χρόνος ο οποίος απαιτείται για το διπλασιασμό όλων των συστατικών μιας καλλιέργειας.**
- Στην περίπτωση αυτή έχουμε:

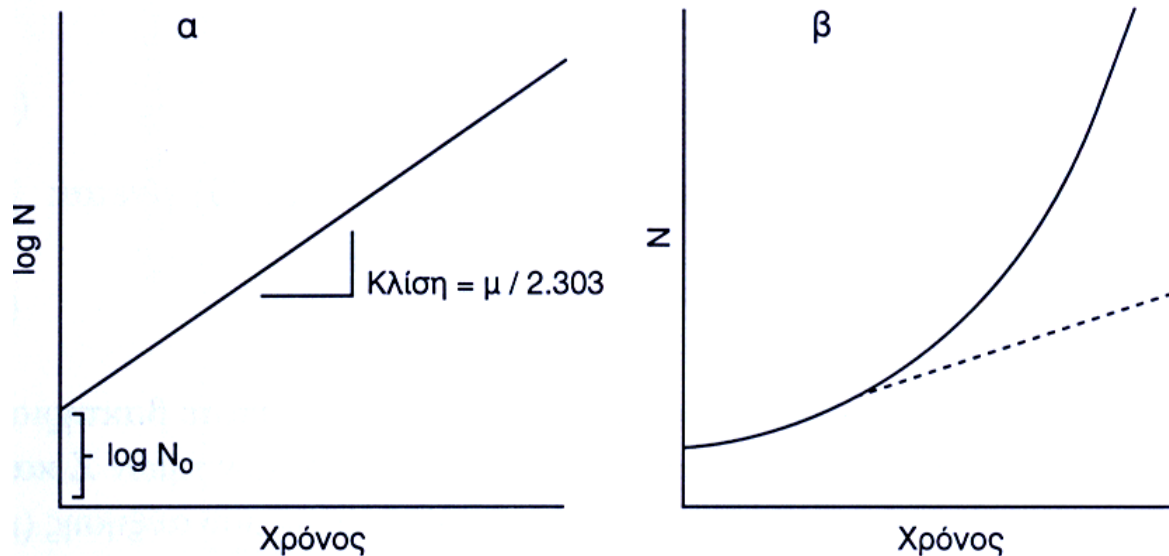
$$\ln 2Z - \ln Z = \mu g \quad (14) \quad \text{ή}$$

$$\frac{\ln 2 + \ln Z - \ln Z}{g} = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0.693}{g} = \mu \quad (15)$$

- Έτσι ο χρόνος διπλασιασμού του προηγούμενου παραδείγματος είναι:

$$g = \frac{0.693}{2.303 \text{ ώρες}^{-1}} = 0.30 \text{ ώρες}$$

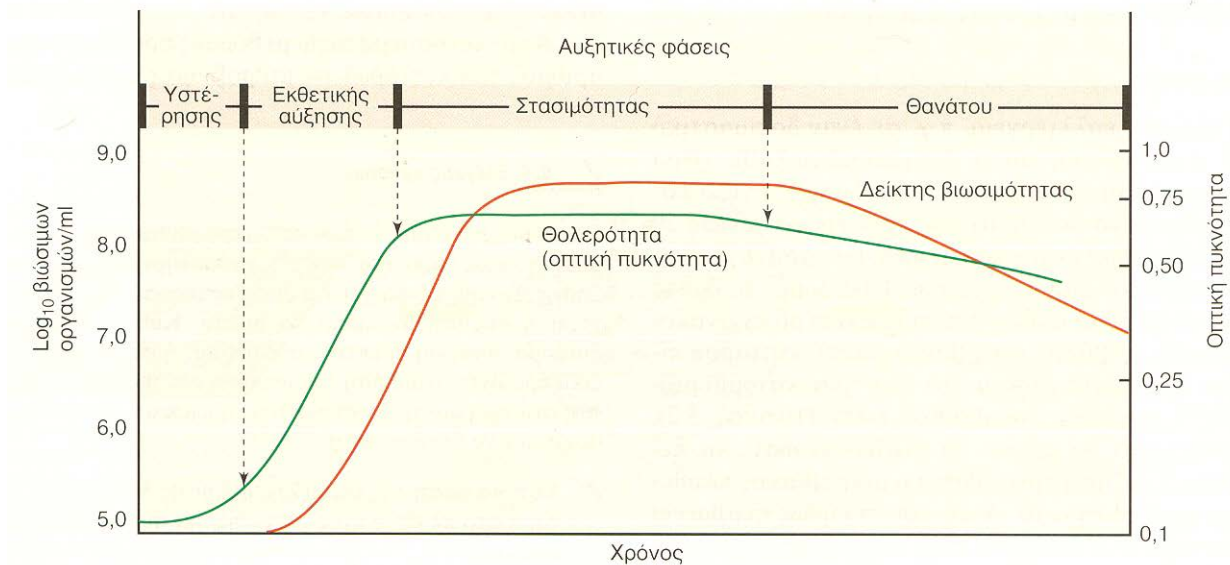
- Διαγραμματική απεικόνιση της (13):



Σχ.122. Λογαριθμική αύξηση μιας καλλιέργειας.

- Στην πραγματικότητα, οι μικροβιακοί πληθυσμοί ακολουθούν την **λογαριθμική φάση ανάπτυξης** για μικρό χρονικό διάστημα, αφού ένα βακτήριο με χρόνο διπλασιασμού 20min αν διατηρούσε λογαριθμική αύξηση για 48h θα δημιουργούσε απογόνους συνολικού βάρους $2.2 \times 10^{31}g$ δηλαδή 4.000 φορές το βάρος της γης.

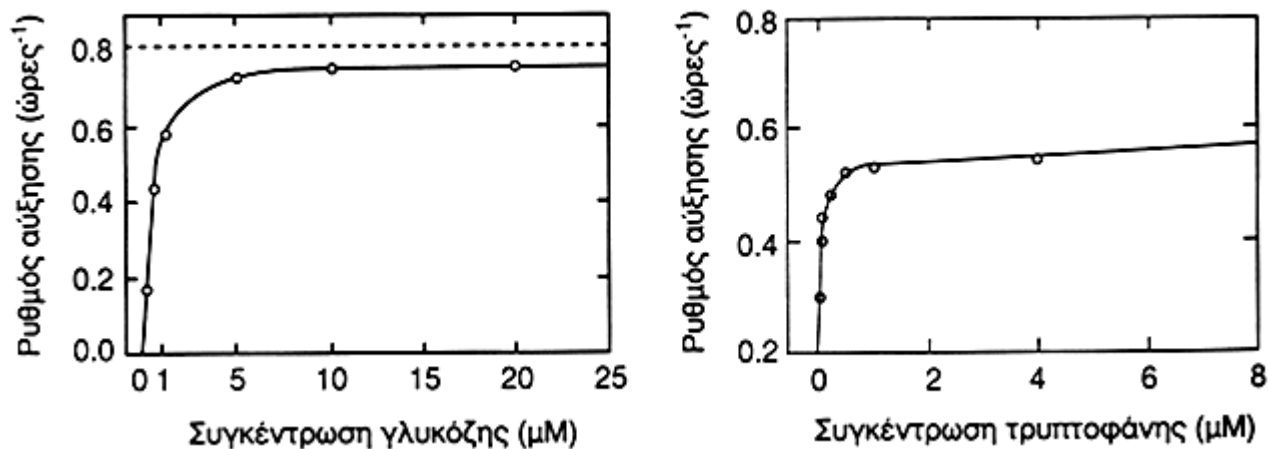
- Κατά τη **λανθάνουσα φάση**, η οποία προηγείται της λογαριθμικής φάσης, τα κύτταρα προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον.



Σχ.123. Φάσεις ανάπτυξης μιας μικροβιακής καλλιέργειας.

- Η αύξηση της καλλιέργειας περιορίζεται από εξάντληση των θρεπτικών υλικών ή/και από συσσώρευση τοξικών παραπροϊόντων του μεταβολισμού.
- Έτσι παρατηρείται ελάττωση και μηδενισμός του ρυθμού αύξησης (**φάση στασιμότητας**) και στη συνέχεια έχουμε τη **φάση θανάτου**.
- Η μικροβιακή αύξηση μπορεί να προσομοιωθεί με μια χημική αντίδραση, όπου τα αντιδρώντα (θρεπτικά συστατικά) μετατρέπονται σε προϊόντα (κύτταρα) μέσω των μικροβίων (καταλύτης).
- Ενώ η ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων καθορίζεται από τη συγκέντρωση των αντιδρώντων, στα βακτήρια ο ρυθμός αύξησης είναι σταθερός μέχρι να εξαντληθεί σχεδόν το **κύριο θρεπτικό συστατικό**, καθώς ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος διατηρούν σταθερή την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των θρεπτικών υλών.

- Οι καμπύλες που συσχετίζουν το ρυθμό αύξησης με τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών έχουν τη μορφή:



Σχ.124. Επίδραση της συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών στην αύξηση του *E. coli*:
(α) Γλυκόζη, (β) Τρυπτοφάνη.

- Εκφράζονται από την εξίσωση:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C}{K_S + C} \quad (16)$$

Όπου:

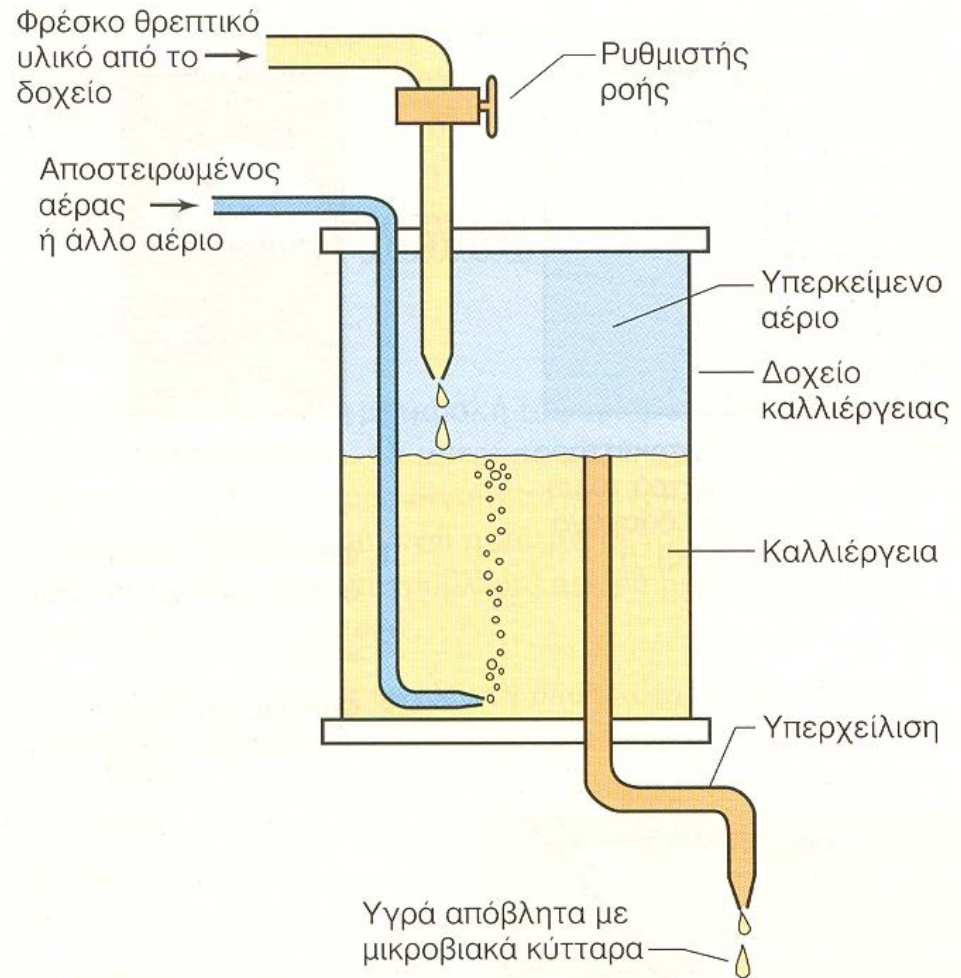
μ : ο ρυθμός αύξησης

C : η συγκέντρωση του κύριου θρεπτικού συστατικού

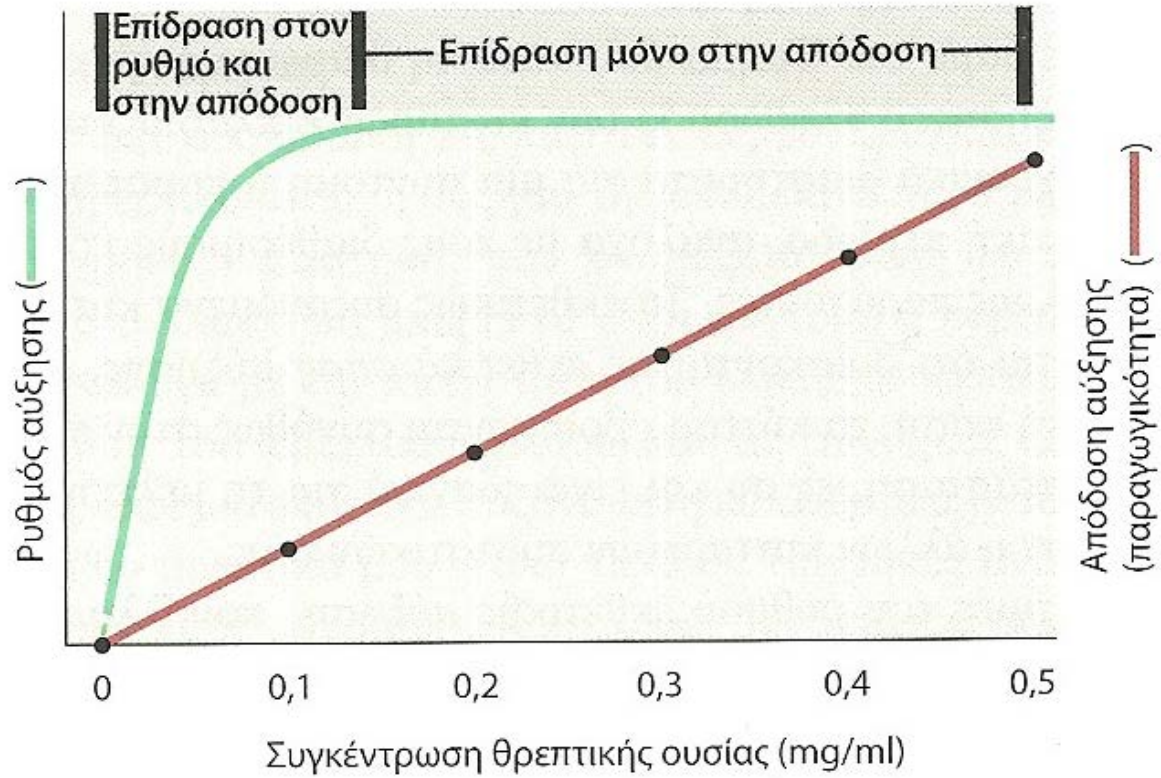
K_s : μια σταθερά, αντίστοιχη των *Michaelis-Menten*.

- Καλλιέργειες που αναπτύσσονται υπό περιορισμένο χώρο (κλειστές καλλιέργειες) διατηρούν τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης για μικρό χρονικό διάστημα.

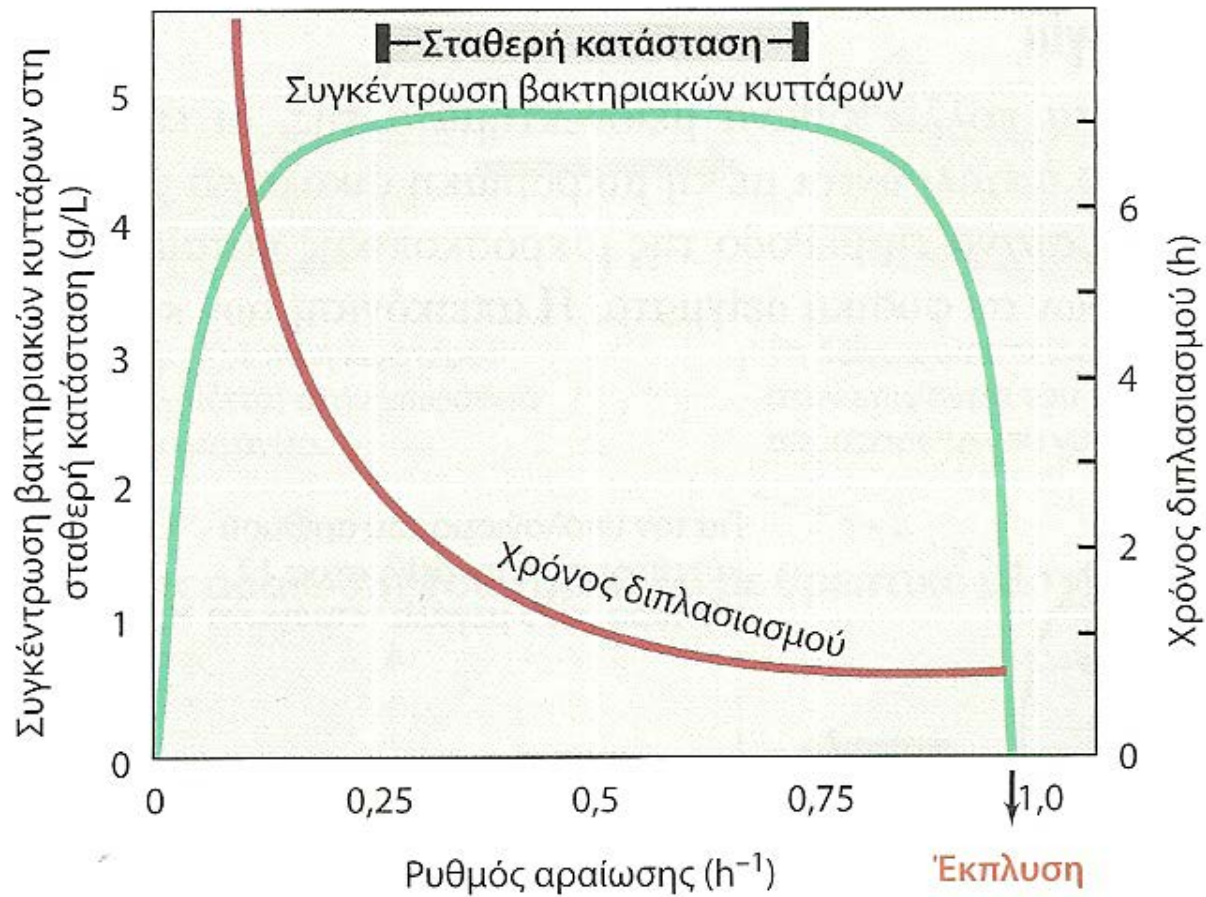
- Για να διατηρηθεί μια καλλιέργεια σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης χρησιμοποιούνται συστήματα συνεχούς καλλιέργειας.



Σχ.125. Σύστημα συνεχούς ανάπτυξης μιας καλλιέργειας.



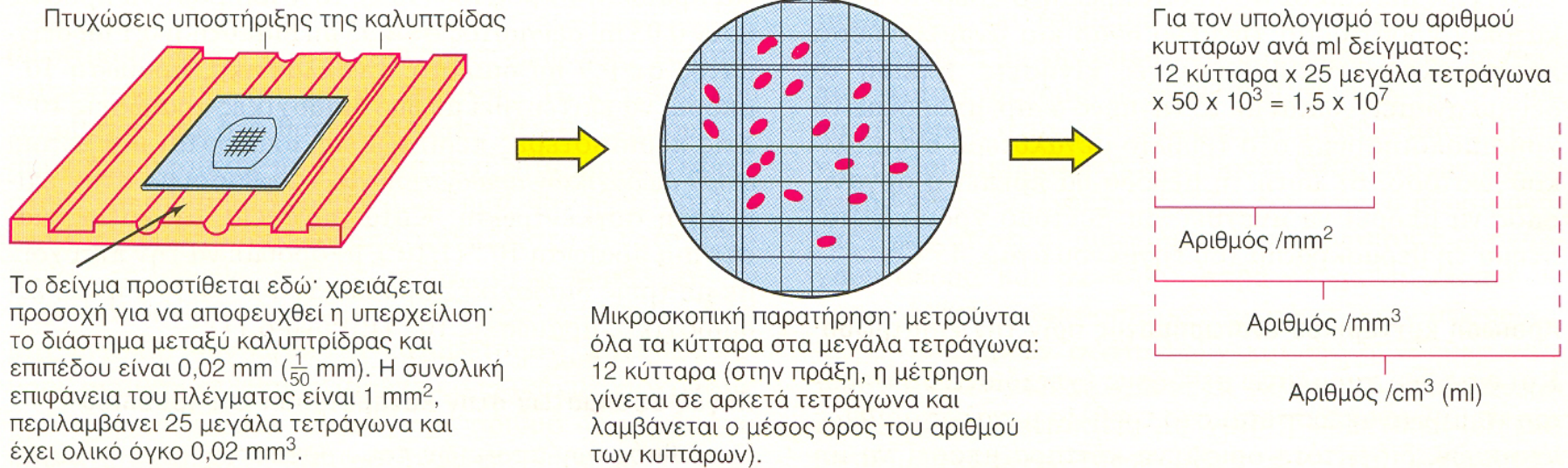
Σχ.126. Η επίδραση των θρεπτικών ουσιών στην αύξηση.



Σχ.127. Σχέσεις σταθερής κατάστασης σε σύστημα συνεχούς ανάπτυξης μικροβιακής καλλιέργειας (χημειοστάτη).

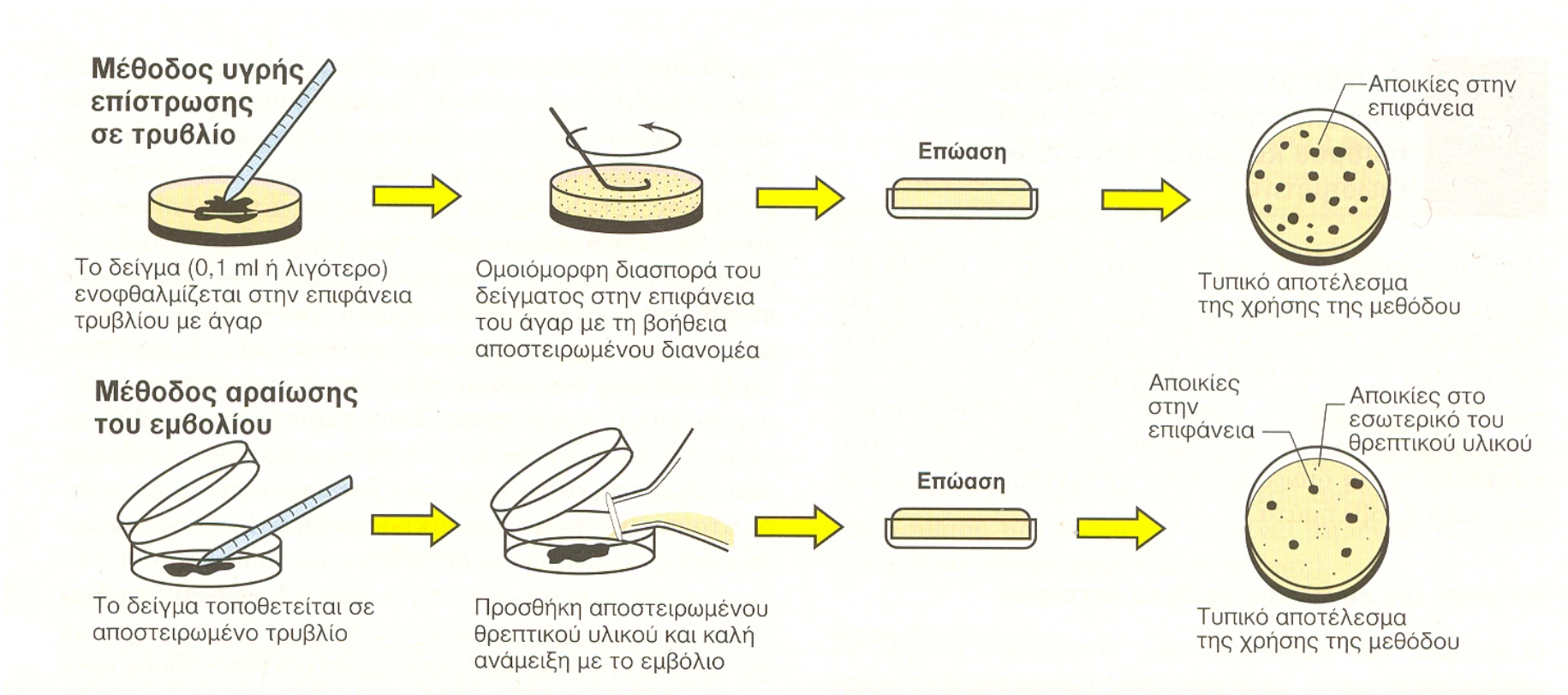
Μετρήσεις μικροβιακού πληθυσμού

1. Μέτρηση συνολικού αριθμού κυττάρων

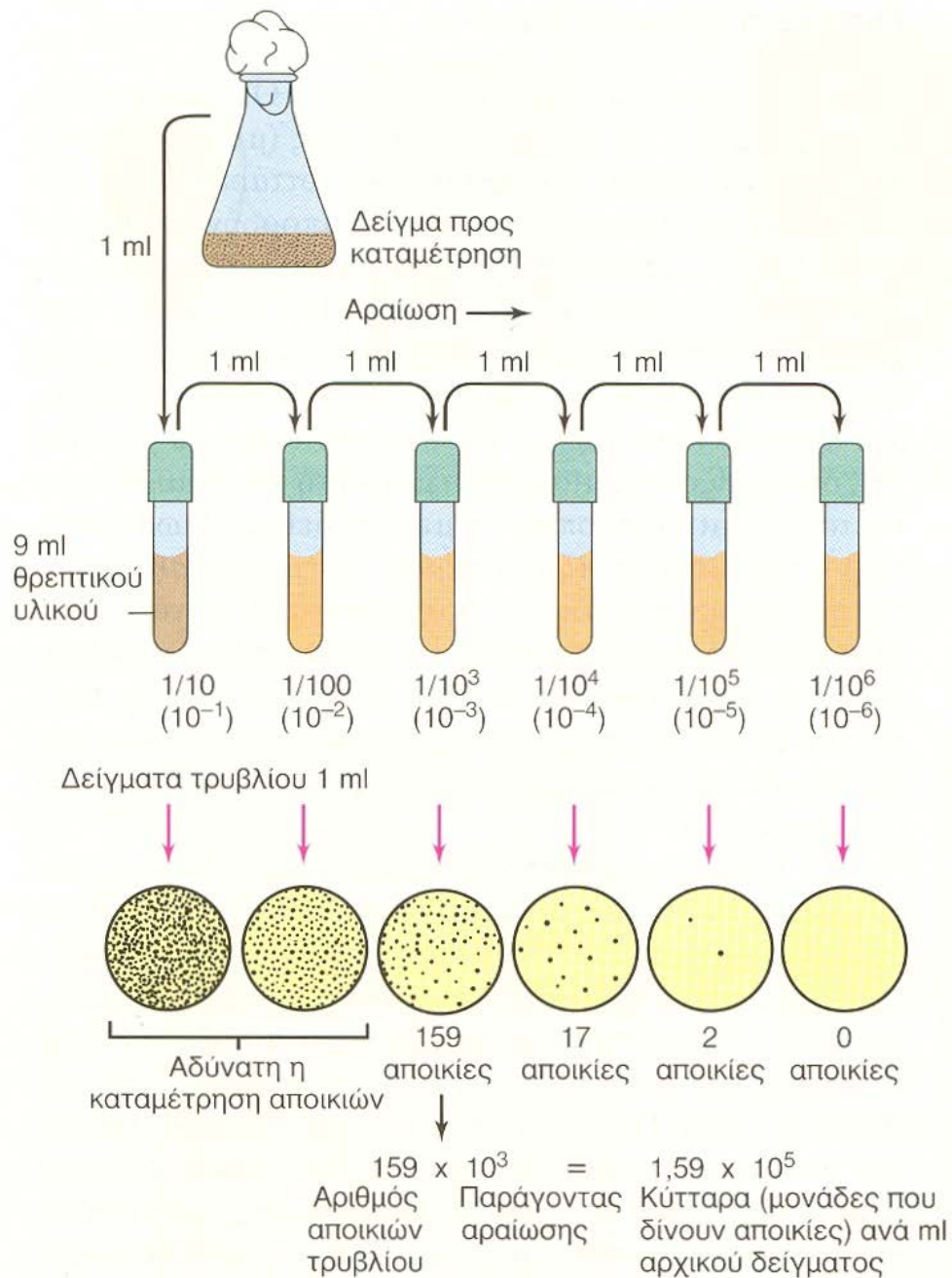


Σχ.128. Μικροσκοπική καταμέτρηση.

2. Μέτρηση δείκτη βιωσιμότητας

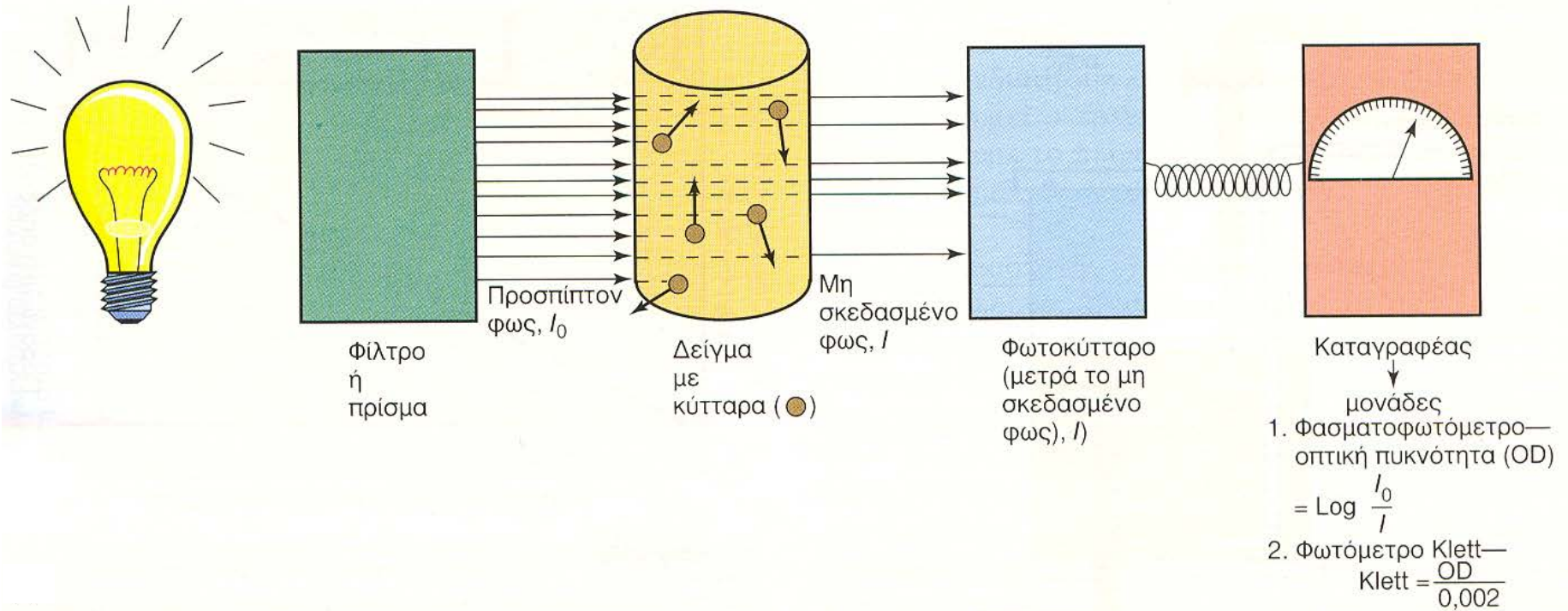


Σχ.129. Μέθοδοι μέτρησης δείκτη βιωσιμότητας.



Σχ.130. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων δείγματος.

3. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

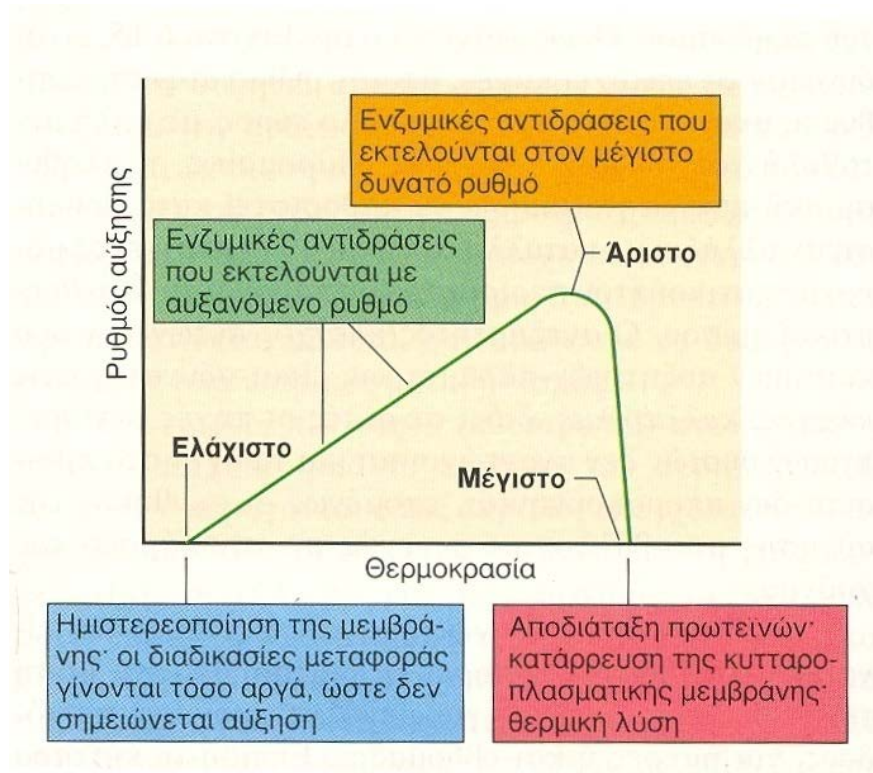


Σχ.131. Αρχή μεθόδου μέτρησης μικροβιακού πληθυσμού με μέτρηση οπτικής πυκνότητας.

Περιβαλλοντικές επιδράσεις στην μικροβιακή αύξηση

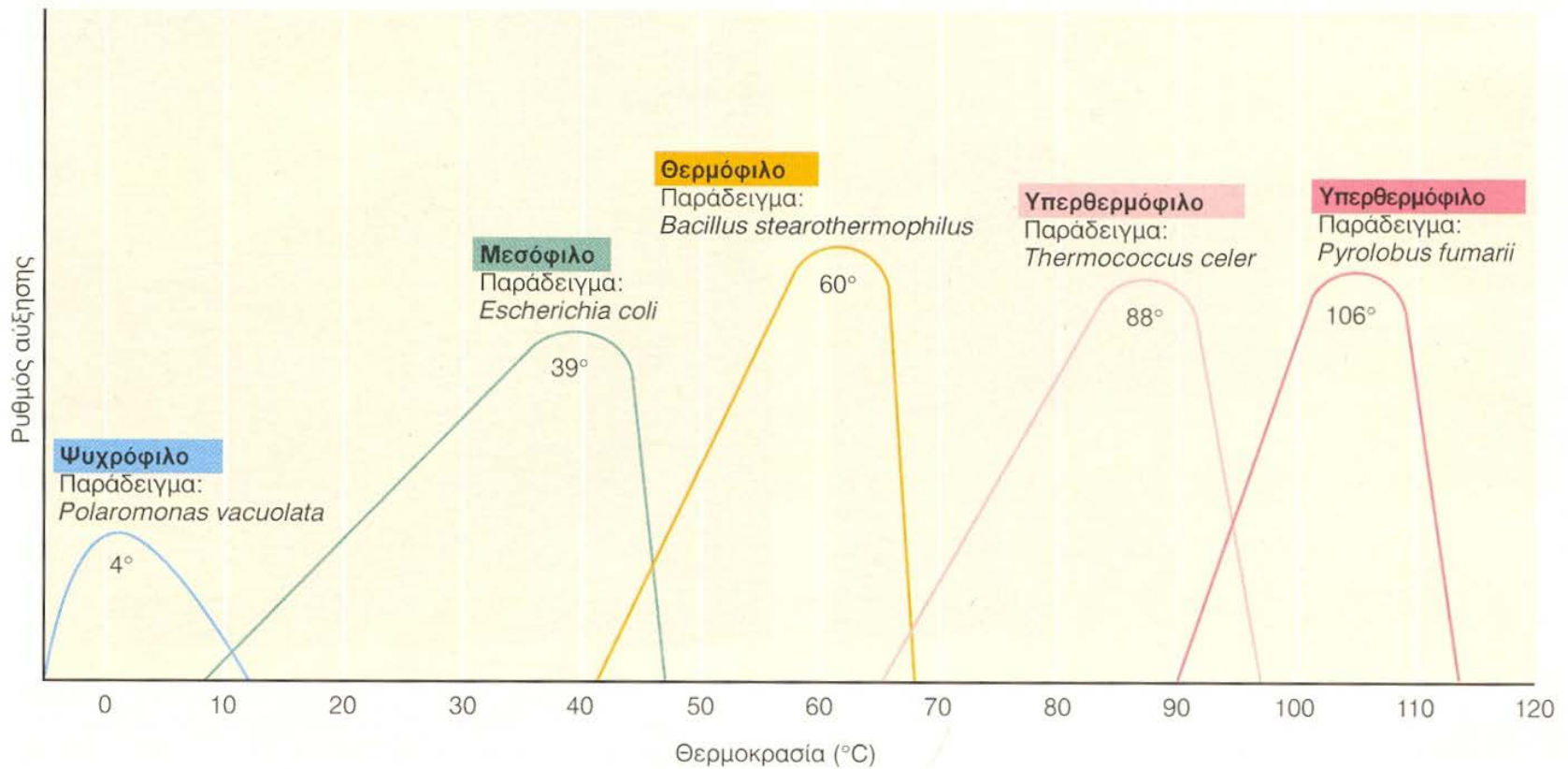
Επίδραση της θερμοκρασίας

- Για κάθε μικροοργανισμό υπάρχει μια **ελάχιστη** θερμοκρασία, κάτω από την οποία δεν παρατηρείται αύξηση, μια **άριστη** θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησης και μια **μέγιστη** πάνω από την οποία η ανάπτυξη είναι αδύνατη.
- Οι 3 τιμές αυτές ονομάζονται **θεμελιώδεις θερμοκρασίες**.



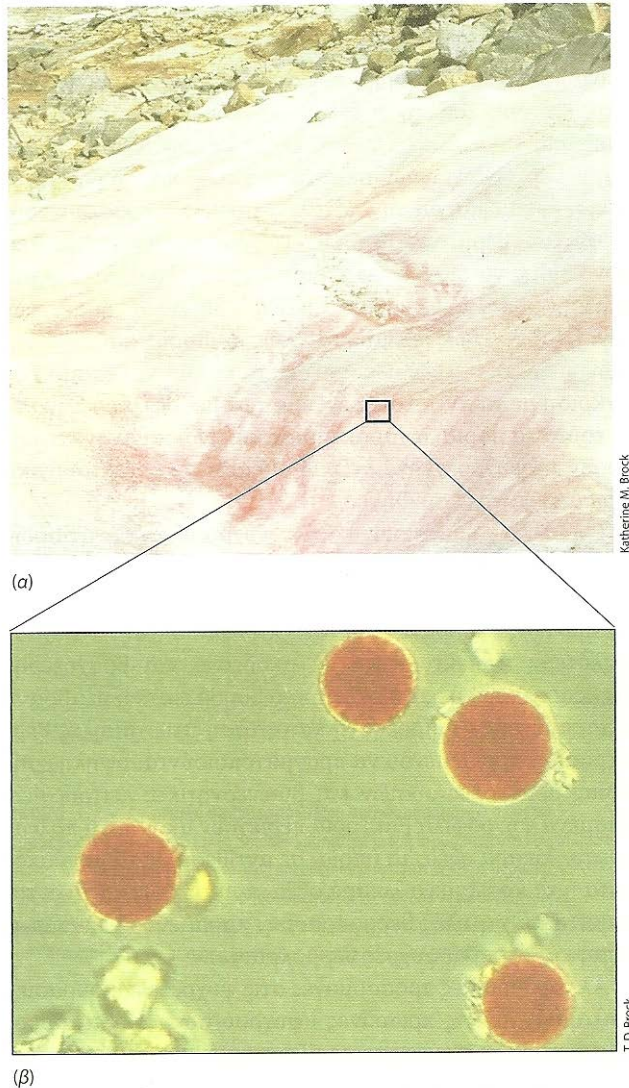
Σχ.132. Επίδραση θερμοκρασίας στον ρυθμό αύξησης.

- Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται μέσα σε καθορισμένα όρια, επιταχύνονται οι μεταβολικές λειτουργίες (επομένως και η αύξηση), μέχρις ενός σημείου πέραν του οποίου έχουμε αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατάρρευση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού οφείλεται σε «ψύξη» της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη μη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και τη μη δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων.
- Οι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να χωριστούν σε 4 κατηγορίες με βάση την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης:
 1. Στους **ψυχρόφιλους**,
 2. Στους **μεσόφιλους**,
 3. Στους **θερμόφιλους**, και
 4. Στους **υπερθερμόφιλους**.
- Μικροοργανισμοί που διαβιούν σε υπερβολικά θερμά ή ψυχρά ενδιαιτήματα ονομάζονται **ακραίοφιλοι**.



Σχ.133. Σχέση θερμοκρασίας και ρυθμού αύξησης ψυχρόφιλων, μεσόφιλων, θερμόφιλων και υπερθερμόφιλων μικροοργανισμών.

- Οι μικροοργανισμοί που αυξάνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (0°C), αλλά έχουν υψηλότερες βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης (20-40°C) ονομάζονται **ψυχροανεκτικοί**.

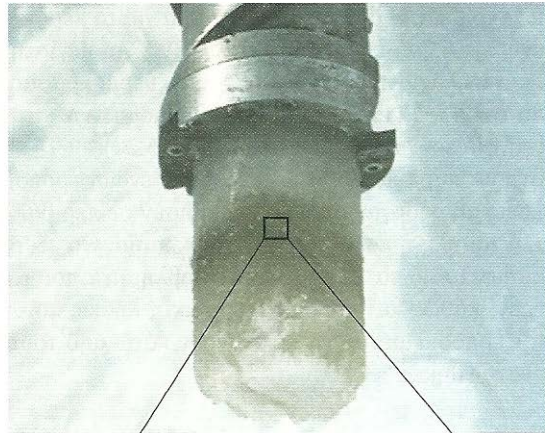


Σχ.134. Φύκη του χιονιού.
(α) Χιονισμένη πλαγιά στη Sierra Nevada (Καλιφόρνια, ΗΠΑ), με κόκκινη απόχρωση λόγω της παρουσίας φυκών.
(β) Μικροφωτογραφία σπορίων κόκκινου χρώματος του φύκου του χιονιού *Chlamydomonas nivalis*. Τα σπόρια βλαστάνουν και δίνουν πράσινα κύτταρα με ικανότητα αυτοκινησίας.

Μοριακές προσαρμογές στην ψυχροφιλία

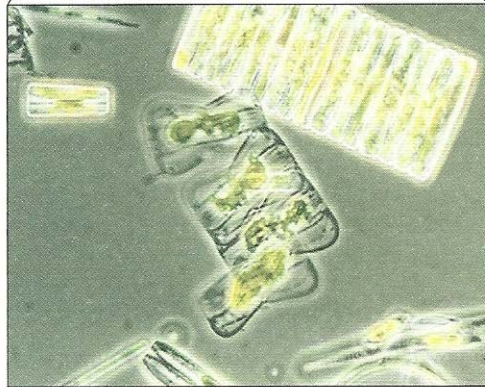
- Τα ψυχροενεργά ένζυμα περιέχουν περισσότερες α -έλικες και λιγότερες β -πτυχωτές επιφάνειες.
- Καθώς η β -πτυχωτή επιφάνεια έχει την τάση να σχηματίζει περισσότερο δύσκαμπτες δομές, η ύπαρξη μεγαλύτερου ποσοστού α -ελίκων επιτρέπει στα ψυχροενεργά ένζυμα μεγαλύτερη ευκινησία στο ψύχος.
- Τα ψυχροενεργά ένζυμα διαθέτουν περισσότερα πολικά και λιγότερα υδρόφοβα αμινοξέα, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ευκινησίας των πρωτεϊνών σε χαμηλές θερμοκρασίες.
- Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των ψυχρόφιλων μικροοργανισμών περιέχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση της ημίρρευστης κατάστασης σε χαμηλές θερμοκρασίες.

- Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί παράγουν πρωτεΐνες «ψυχρού σοκ» ή/και κρυοπροστατευτικές ενώσεις.
- Οι πρωτεΐνες ψυχρού σοκ έχουν πολλές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων η διατήρηση άλλων πρωτεϊνών σε ενεργό μορφή υπό ψυχρές συνθήκες, η δέσμευση mRNA και η διευκόλυνση της μεταγραφής τους.
- Σε αυτά τα mRNA συμπεριλαμβάνονται mRNA που κωδικοποιούν άλλες ψυχρο-λειτουργικές πρωτεΐνες.
- Οι κρυοπροστατευτικές ενώσεις περιλαμβάνουν εξειδικευμένες αντιψυκτικές πρωτεΐνες ή ειδικούς διαλύτες, όπως γλυκερόλη και σάκχαρα, που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σε ψυχρές θερμοκρασίες.
- Οι παράγοντες αυτοί βοηθούν στην πρόληψη σχηματισμού κρυστάλλων πάγου που μπορεί να διαρρήξουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη.



John Gosink and James T. Staley

(α)



John Gosink and James T. Staley

(β)

Σχ.135. Μικροοργανισμοί της Ανταρκτικής. (α) Πυρήνας μόνιμα παγωμένου θαλασσινού νερού από τα στενά MCMurdo της Ανταρκτικής. Παρατηρείται η πυκνότητα της χρωστικής λόγω της χρώσης μικροοργανισμών. (β) Μικρογράφημα αντίθεσης φάσεων φωτοτροφικών μικροοργανισμών από τον πυρήνα πάγου της εικόνας (α).

Κατάψυξη

- Παρόλο που η κατάψυξη παρεμποδίζει τη μικροβιακή αύξηση, δεν προκαλεί κατ' ανάγκην και νέκρωση του κυττάρου.
- Ουσίες που αναμειγνύονται με το νερό (γλυκερόλη, DMSO, κλπ) όταν προστεθούν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις (10-30%) διεισδύουν στα κύτταρα και τα προστατεύουν (**κρυοπροστατευτικά μέσα**).

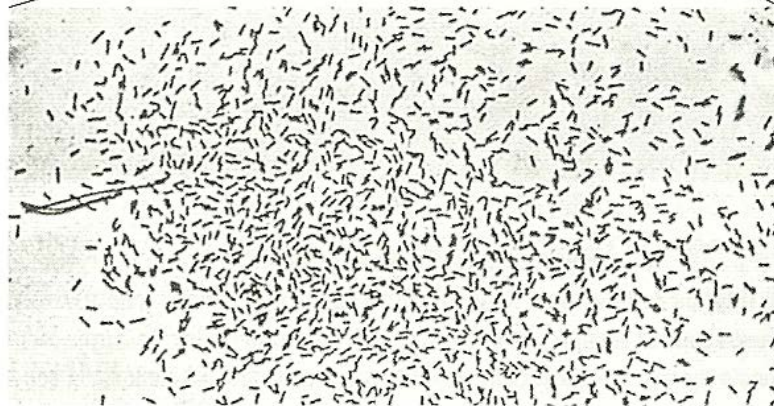
Μικροβιακή αύξηση σε υψηλές θερμοκρασίες

- Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των υπερθερμόφιλων οργανισμών (υπάρχουν πολλά βακτήρια και κυρίως αρχαία).
- Γενικά:
 1. Οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τους ευκαρυωτικούς,
 2. Περισσότερο θερμόφιλοι από όλους τους προκαρυωτικούς είναι συγκεκριμένα είδη αρχαίων, και
 3. Οι μη φωτοτροφικοί οργανισμοί μπορούν να αναπτύσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τους φωτοτροφικούς.



T. D. Brock

(α)



T. D. Brock

(β)

Σχ.136. Ανάπτυξη υπερθερμόφιλων μικροοργανισμών. (α) Το Boulder Spring, μια θερμοπηγή στο Εθνικό Πάρκο Yellowstone (ΗΠΑ). (β) Μικροφωτογραφία μικροαποικίας προκαρυωτών που αναπτύχθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα εμβαπτισμένη σε τέτοια πηγή.

Μοριακές προσαρμογές στη θερμοφιλία

- Αρκετά θερμοσταθερά ένζυμα συχνά διαφέρουν ελάχιστα όσο αφορά την αλληλουχία αμινοξέων από ένζυμα μεσόφιλων οργανισμών.
- Προφανώς, μια σημαντική αντικατάσταση αμινοξέων σε μία ή μερικές θέσεις του ενζύμου επιτρέπει την αναδίπλωση κατά τρόπο που προσδίδει θερμική σταθερότητα.
- Η θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών στους υπερθερμόφιλους μικροοργανισμούς βελτιώνεται από την παρουσία αυξημένου αριθμού ζευγών ιόντων (μεταξύ θετικού και αρνητικού φορτίου διαφόρων αμινοξέων).
- Επιπλέον, ο έντονα υδρόφοβος χαρακτήρας του εσωτερικού των πρωτεϊνών παρεμποδίζει την αναδίπλωσή τους στο υδατικό κυτταρόπλασμα.
- Ορισμένοι θερμόφιλοι παράγουν, επίσης, σημαντικές ποσότητες διαλυτών, όπως φωσφορική δι-ινοσιτόλη, φωσφορική δι-γλυκερόλη, κλπ, που συντελούν στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών.

- Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί έχουν λιπίδια πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα που επιτρέπουν στις μεμβράνες να παραμένουν σταθερές και λειτουργικές στις υψηλές θερμοκρασίες.
- Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δημιουργούν ένα πιο υδρόφοβο περιβάλλον που συντελεί στη σταθερότητα της μεμβράνης.
- Τα αρχαία δεν περιέχουν καθόλου λιπαρά οξέα στις μεμβράνες τους, αλλά υδρογονάνθρακες από επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπροπενίου με 5 άτομα C συνδεδεμένα με αιθερικό δεσμό σχηματίζοντας συχνά λιπιδική μονοστοιβάδα, δομή πολύ πιο θερμοανθεκτική από την διπλοστοιβάδα.

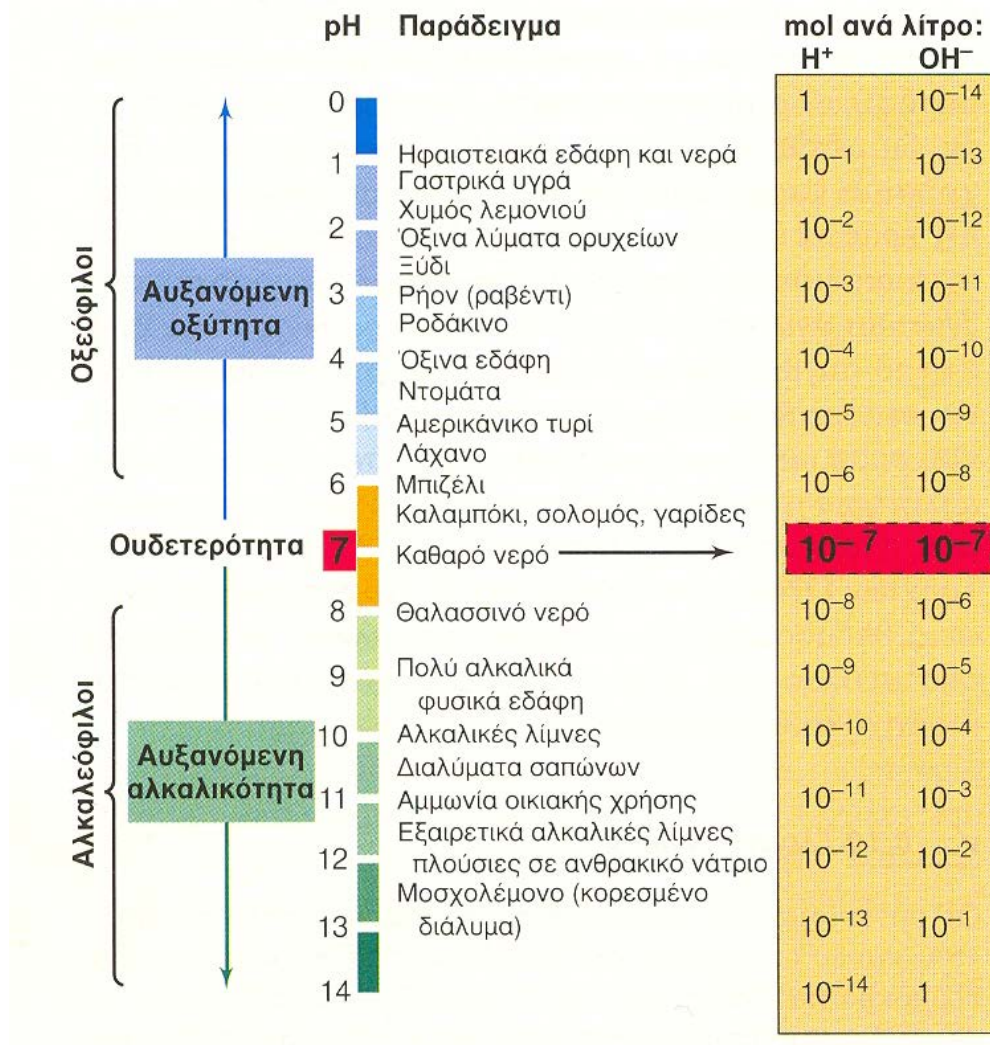
Παράδειγμα βιοτεχνολογικής εφαρμογής της θερμοφιλίας

- Απομόνωση DNA πολυμεράσης από τον θερμοφιλο μικροοργανισμό *Thermus aquaticus* (Taq πολυμεράση).

Η επίδραση του pH στην μικροβιακή αύξηση

- Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται καλύτερα σε πολύ χαμηλές τιμές pH ονομάζονται **οξεόφιλοι**, ενώ αυτοί που αναπτύσσονται σε πολύ υψηλές τιμές pH ονομάζονται **αλκαλεόφιλοι**.

- Λιπάσες και πρωτάσες από αλκαλεόφιλα έχουν βιοτεχνολογική εφαρμογή σε απορρυπαντικά.



Σχ.137. Η κλίμακα pH και η μικροβιακή ανάπτυξη.

- Ο πιο σημαντικός παράγοντας στην υποχρεωτική οξεοφιλία είναι η σταθερότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε χαμηλό pH.
- Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των υποχρεωτικά οξεόφιλων ουσιαστικά διαλύεται σε ουδέτερο pH, γεγονός που σημαίνει ότι απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις H^+ για να διασφαλιστεί η σταθερότητά της.
- Τα αλκαλεόφιλα παρουσιάζουν πρόσθετο ενδιαφέρον λόγω των βιοενεργειακών προβλημάτων που αντιμετωπίζουν:
- **Είναι δυνατόν να αναπτυχθεί πρωτονιοκίνητη δύναμη όταν η εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης είναι τόσο αλκαλική?**
- Η απαιτούμενη ενέργεια προέρχεται από διαβάθμιση ιόντων Na^+ , εκτός της πρωτονιοκίνητης δύναμης.

- Εκτιμάται ότι τα H^+ διατηρούνται πολύ κοντά στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Η άριστη τιμή pH ανάπτυξης αναφέρεται στο εξωτερικό pH (του περιβάλλοντος).
- Το εσωτερικό pH στους περισσότερους μικροοργανισμούς παραμένει σχεδόν σταθερό, κοντά στην τιμή 7.
- Στα ακραία οξεόφιλα και ακραία αλκαλεόφιλα, όμως, το εσωτερικό pH ενδέχεται να διαφέρει αρκετά από την ουδετερότητα.

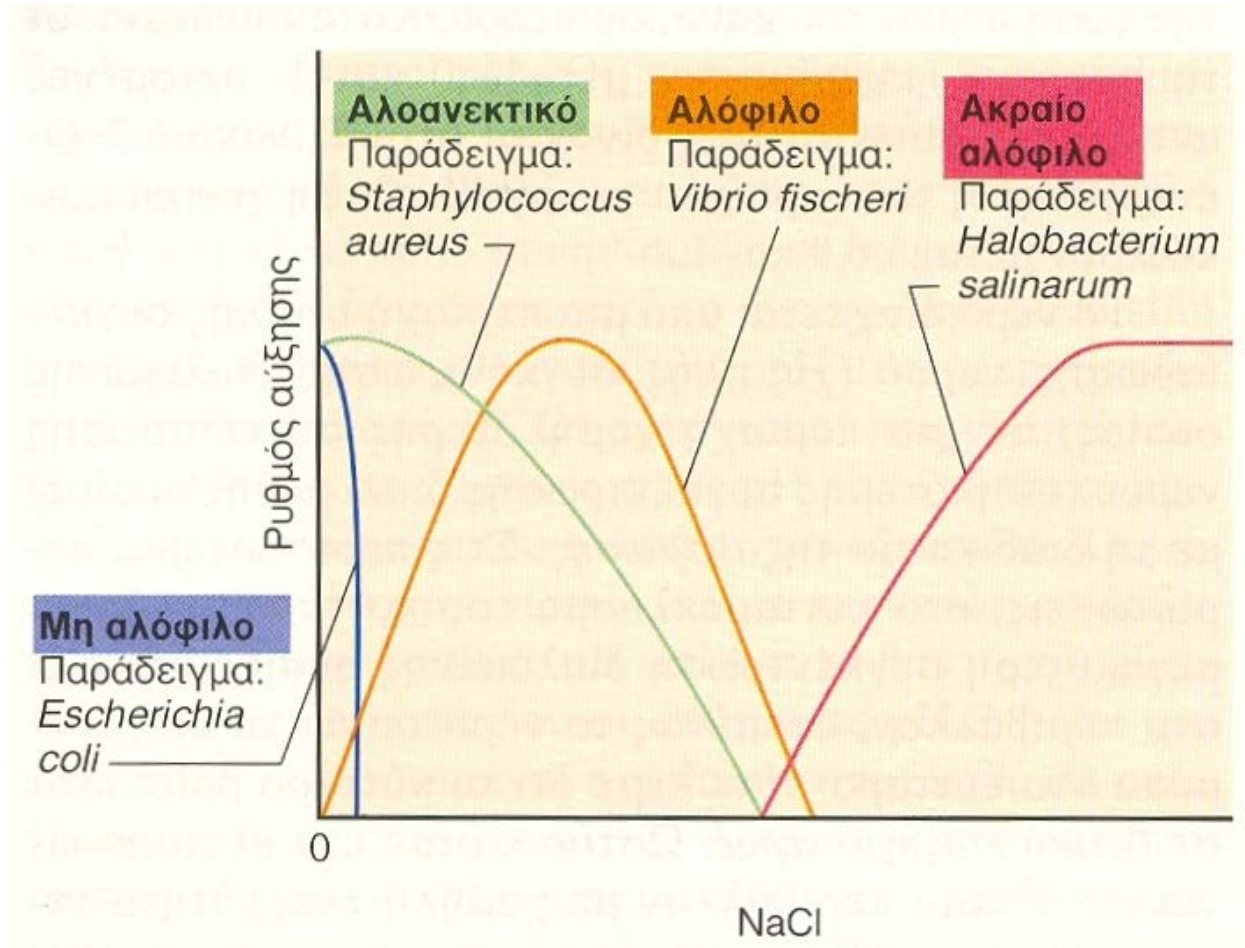
Ωσμωτικά φαινόμενα και μικροβιακή αύξηση

- Η διαθεσιμότητα του νερού εκφράζεται από την **ενεργότητα νερού**.
- Ως ενεργότητα νερού a_w ορίζεται το πηλίκο της τάσης ατμών του νερού στο δείγμα προς την τάση ατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία.

$$a_w = \frac{P}{P_o} \quad (17)$$

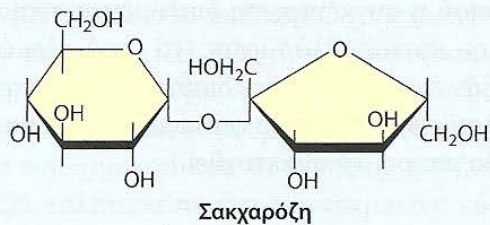
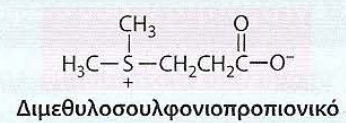
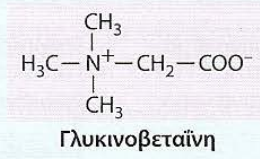

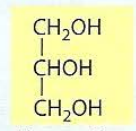
- Οι τιμές της a_w κυμαίνονται στο εύρος 0-1.
- Οι μικροοργανισμοί που διαβιούν σε ενδιαιτήματα υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων ονομάζονται **αλόφιλοι**.
- Οι **αλοανεκτικοί** μικροοργανισμοί μπορούν να ανεχθούν μείωση στην a_w του περιβάλλοντός τους, αλλά γενικά αναπτύσσονται καλύτερα απουσία αλάτων (ή διαλυμένων ουσιών που οδηγούν σε μείωση της a_w).
- Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων ονομάζονται **ακραίοι αλόφιλοι**.

- Μικροοργανισμοί που διαβιούν σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων ονομάζονται **ωσμόφιλοι** και αυτοί που αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης νερού **ξηρόφιλοι**.



Σχ.138. Επίδραση της συγκέντρωσης Na^+ στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

- Όταν ένας μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε περιβάλλον με χαμηλή ενεργότητα νερού, αυξάνει την εσωτερική συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών με στόχο την πρόσληψη νερού.
- Αύξηση της εσωτερικής συγκέντρωσης διαλυμένων ουσιών μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω άντλησης ανόργανων ιόντων μέσα στο κύτταρο από το περιβάλλον, είτε μέσω πρόσληψης ή σύνθεσης οργανικών διαλυτών ουσιών.
- Η διαλυμένη ουσία που χρησιμοποιείται στο εσωτερικό του κυττάρου για τη ρύθμιση της ενεργότητας νερού του κυτταροπλάσματος πρέπει να μην αναστέλλει τις βιολογικές διεργασίες (συμβατές διαλυμένες ουσίες).
- Τέτοιες ουσίες είναι σάκχαρα, σακχαροαλκοόλες ή K^+ (σε ορισμένα ακραία αλόφιλα αρχαία και βακτήρια).

Οργανισμός	Κύρια κυτταροπλασματική διαλυμένη ουσία	Ελάχιστη a_w για την ανάπτυξη	
Μη φωτοτροφικά βακτήρια/Κυανοβακτήρια του γλυκού νερού	Αμινοξέα (κυρίως γλουταμινικό ή προλίνη ^α)/σακχαρόζη, τρεαλόζη ^β	0,98-0,90	 <p>Σακχαρόζη</p>
Θαλάσσια κυανοβακτήρια	α - Γλυκοζυλογλυκερόλη	0,92	
Θαλάσσια φύκη	Μαννιτόλη ^β , διάφοροι γλυκοζίτες, διμεθυλοσουλφονιοπροπιονικό	0,92	 <p>Διμεθυλοσουλφονιοπροπιονικό</p>
Κυανοβακτήρια αλμυρών λιμνών	Γλυκινοβεταΐνη	0,90-0,75	 <p>Γλυκινοβεταΐνη</p>
Αλόφιλα μη οξυγονοπαραγωγικά πορφυρά βακτήρια	Γλυκινοβεταΐνη, εκτοΐνη, τρεαλόζη ^β	0,90-0,75	 <p>Εκτοΐνη</p>
Ακραία αλόφιλα αρχαία και ορισμένα βακτήρια	KCl	0,75	
<i>Dunaliella</i> (αλόφιλο πράσινο φύκος)	Γλυκερόλη	0,75	 <p>Γλυκερόλη</p>
Ξηροφιλικό και ωμοφιλικό ζυμομύκητες	Γλυκερόλη	0,83-0,62	
Ξηροφιλικό νηματοειδείς μύκητες	Γλυκερόλη	0,72-0,61	

Σχ.139. Ορισμένες συμβατές διαλυμένες ουσίες.

Οξυγόνο και μικροβιακή αύξηση

- Οι **αερόβιοι** μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλήρους οξυγόνωσης.
- Οι **μικροαερόφιλοι** μικροοργανισμοί είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν οξυγόνο σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές του αέρα (λόγω της μειωμένης ικανότητάς τους για αναπνοή ή επειδή περιέχουν κάποια μόρια ευαίσθητα στο οξυγόνο).
- Οι **προαιρετικά (ή δυνητικά) αερόβιοι** μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα είτε υπό αερόβιες, είτε υπό αναερόβιες συνθήκες.
- Οι μικροοργανισμοί που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν οξυγόνο ονομάζονται **αναερόβιοι**.

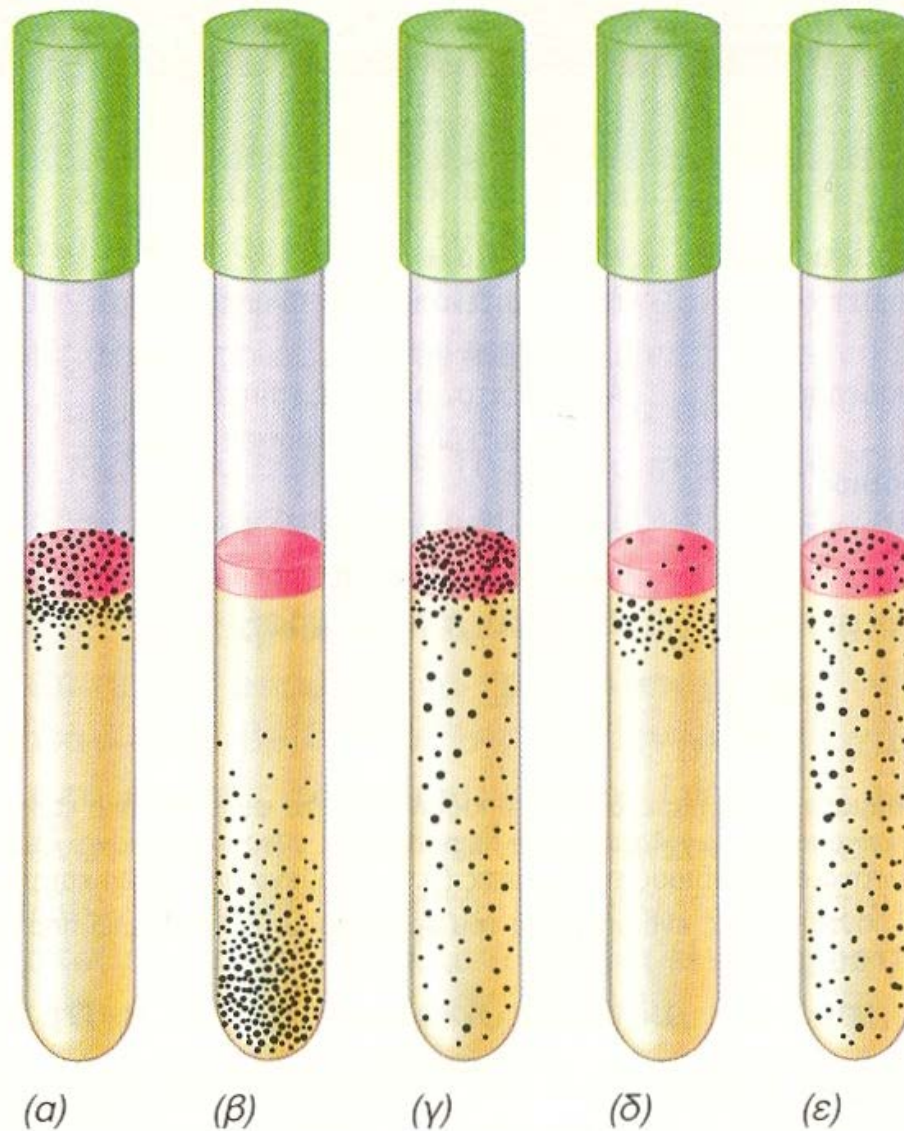
- Υπάρχουν 2 τύποι αναερόβιων μικροοργανισμών:

1. Οι **αερανεκτικοί αναερόβιοι**, οι οποίοι ανέχονται την παρουσία οξυγόνου και αναπτύσσονται, αν και δεν μπορούν να το χρησιμοποιήσουν, και

2. Οι **υποχρεωτικά αναερόβιοι**, οι οποίοι παρουσία οξυγόνου αναστέλλουν την ανάπτυξή τους ή θανατώνονται.

- Κατά την ανάπτυξη αναερόβιων καλλιεργειών είναι δυνατόν να προστεθεί ένας **αναγωγικός παράγοντας** (ουσία που αντιδρά με το οξυγόνο και το ανάγει προς H_2O), π.χ. το θειογλυκολικό.

- Στο θρεπτικό μέσο μπορούμε να προσθέσουμε **ρεσαζουρίνη**, η οποία παρουσία οξυγόνου αλλάζει χρώμα, υποδεικνύοντας τον βαθμό οξυγόνωσης του θρεπτικού.



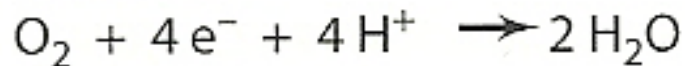
Σχ.140. Μικροβιακή ανάπτυξη (α) Αερόβιων, (β) Αναερόβιων, (γ) Προαιρετικά αερόβιων, (δ) Μικροαερόβιων και (ε) Αερανεκτικών αναερόβιων. Στο θρεπτικό μέσο (θειογλυκολικό ζωμό) έχει προστεθεί λίγο agar, για να διατηρείται το υγρό σε ηρεμία, και ρεσαζουρίνη.

Τοξικές μορφές οξυγόνου

- Κατά την αναπνοή, παράγονται έντονα τοξικές μορφές οξυγόνου, όπως **ανιόν σουπεροξειδίου O_2^-** , **υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2** και **υδροξυλική ρίζα $OH\cdot$** .
- Οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένζυμα που καταστρέφουν τις τοξικές μορφές οξυγόνου.
- Τα πιο κοινά ένζυμα είναι η **καταλάση**, η **υπεροξειδάση**, η **δισμουτάση σουπεροξειδίου** και η **αναγωγάση σουπεροξειδίου** (βρίσκεται σε ορισμένους υποχρεωτικά αναερόβιους προκαρυώτες).

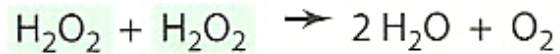
Αντιδράσεις	Προϊόντα
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$	(Σουπεροξειδίο)
$O_2^- + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$	(Υπεροξειδίο του υδρογόνου)
$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^\bullet$	(Υδροξυλική ρίζα)
$OH^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$	(Νερό)

Συνολικά

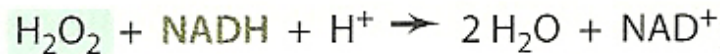


Σχ.141. Σχηματισμός τοξικών μορφών οξυγόνου κατά την αναπνοή.

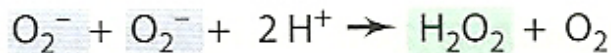
- Η δισμουτάση σουπεροξειδίου είναι απολύτως απαραίτητη στα αερόβια κύτταρα, ενώ στην απουσία αυτού του ενζύμου οφείλεται μάλλον η τοξικότητα του O_2 στους υποχρεωτικώς αναερόβιους μικροοργανισμούς.
- Η δισμουτάση απουσιάζει και από ορισμένους αερανεκτικούς αναερόβιους οργανισμούς (όπως από τα οξυγαλακτικά βακτήρια), αλλά οι οργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν Mn^{2+} ανεξάρτητα από πρωτεΐνες για να πραγματοποιούν την μετατροπή του O_2^- σε H_2O_2 και O_2 .
- Μια τέτοια αντίδραση θα μπορούσε να λειτουργεί ως πρόδρομη μορφή δισμουτάσης υπεροξειδίου στους αρχέγονους οργανισμούς.
- Αυτή η άποψη υποστηρίζεται ακόμα από το γεγονός ότι όλες οι γνωστές δισμουτάσες σουπεροξειδίου περιέχουν έναν μεταλλικό συμπάραγοντα, συνήθως Mn^{2+} , αλλά και Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.



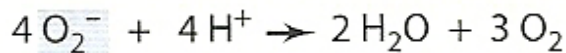
(α) Καταλάση



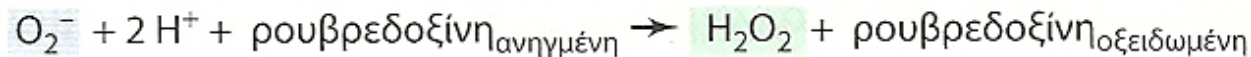
(β) Υπεροξειδάση



(γ) Δισμουτάση του σουπεροξειδίου



(δ) Συνδυασμός δισμουτάσης του σουπεροξειδίου/καταλάσης



(ε) Αναγωγή του σουπεροξειδίου

Σχ.142. Καταστροφή τοξικών μορφών οξυγόνου.