

# Množení bakterií in vitro

Růst a množení bakterií představuje řadu biochemických a fyzikálních procesů.

**Růstový cyklus** sestává z těchto částí:

- růst buňky – koordinovaná tvorba makromolekul a buněčných složek;
- tvorba septa;
- dělení buňky.

**Generační doba** je doba mezi dvěma děleními.

**Doba zdvojení** je doba, za jakou se počet bakterií zdvojnásobí.

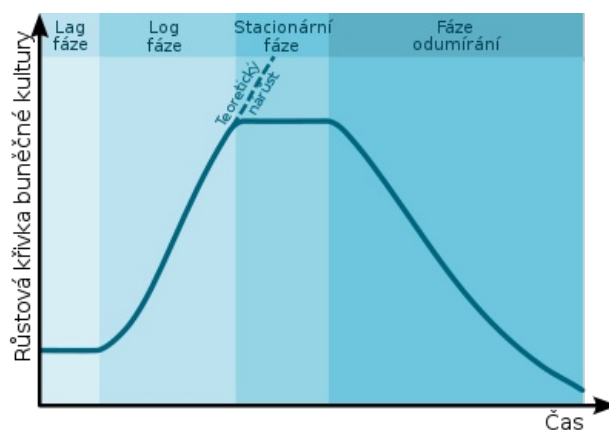
Dělení bakterií probíhá za ideálních podmínek **geometrickou řadou** ve skutečnosti tomu tak není především z těchto důvodů:

- vyčerpání živin (resp. se živiny nedostanou ke všem);
- inhibice zplodinami svého metabolismu.

## Růstová křivka

Růstová křivka znázorňuje závislost počtu živých buněk (v logaritmické stupnici) na stáří kultury. Na růstové křivce popisujeme následující části:

- **lag-fáze** – prodleva v dělení na počátku, probíhá syntéza enzymů, zvětšování objemu, délka fáze závisí na stavu inokula (krátká pokud použity buňky z fáze růstu), počátek dělení má nestálou rychlost;
- **logaritmická (exponenciální) fáze** – konstantní rychlost dělení, závisí na druhu mikroba, teplotě, složení prostředí
  - specifická růstová rychlost je růstová rychlost na jednotku biomasy;
- **stacionární fáze** – buňky už se téměř nedělí, roste množství odpadních produktů, buňky nepřibývají ani neubývají, délka fáze závisí na druhu bakterií a charakteru prostředí
  - $x = Y \times s$
  - $x$  je koncentrace vytvoření biomasy,  $s$  koncentrace spotřebované živiny,  $Y$  růstový výtěžek (informuje o fyziologii rostoucí bakterie);
- **fáze odumírání (autolýza)** (neisserie nebo pneumokoky), indukce enzymů destruujičích buněčnou stěnu, porušení rovnováhy mezi lytickým působením a syntézou stěny;
  - někdy je rychlost konstantní (jediný nepříznivý faktor), většinou však působí několik faktorů, kinetika je tak různá;
  - specifická rychlost hynutí je rychlost úbytku buněk přepočtená na jednu buňku.



Při **kontinuální kultivaci** dochází k udržení v logaritmické fázi, je potřeba zajistit přívod živin a odvod odpadu. Kontinuální kultivaci provádíme v přístrojích zvaných **fermentory**, využívá se například k produkci ATB, přirozeně probíhá v GIT. V přirozených podmínkách se bakterie množí většinou pomaleji v důsledku omezeného přívodu, suboptimální teploty a působení ostatních mikrobů.

V praxi se růst bakterií sleduje **měřením** nárůstu buněčné hmoty, a to následujícími způsoby:

- spektrofotometricky;
- počítáním buněk (mikroskopicky v počítací komůrce);
- kultivačně na zúženém kultivačním médiu na Petriho misce.

## Biofilm

**Biofilm** je struktura tvořena bakteriemi, která slouží k jejich **adherenci, komunikaci a ochraně**. Také může být faktorem patogenity a virulence. Adheruje k povrchům inertním či anorganickým (vlhké povrchy v přírodě, implantáty, katetry, kanyly) i živým (epiteliální buňky). Je to **složitá struktura** s kanálky (voda přináší živiny a odnáší odpad). Připomíná tkáň vyšších organismů. Na jeho vzniku se většinou podílí **několik druhů mikrobů**.

Biofilm **zvyšuje odolnost bakterií** (před nepříznivými podmínkami prostředí nebo imunitními mechanismy) a umožňuje jejich bohatou komunikaci, což může značně komplikovat léčbu.

# Vznik biofilmu

Přilnutí (adheze) bakterií na povrch (pomocí fimbrií, glykokalyxu, povrchových proteinů atd.) podmíní spuštění genů pro tvorbu extracelulárních polymerů. Další buňky vznikají v **extracelulární polysacharidové hmotě**. Dělením vzniknou tzv. **mikrokolonie**, které rychle rostou. Mikrokolonie se obalí slizem a diferencuje v biofilm. Mohou být tvořeny nejen bakteriemi, ale také vyššími organismy (v těle např. *Candida albicans*). Z biofilmu se mohou uvolnit volné buňky (**planktonické buňky**) a kolonizovat jiná místa.

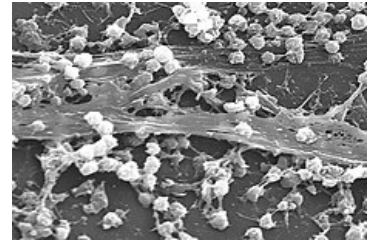
Komunikace bakterií prostřednictvím biofilmu spočívá především ve výměně genetické informace (např. plazmidů) mezi bakteriemi. Tím mohou bakterie získat například rezistenci vůči antibiotikům.

## Quorum sensing

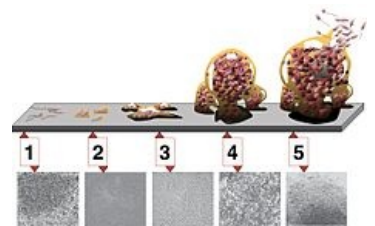
Mechanismy, kterými mohou bakterie vnímat přítomnost jiných bakterií ve svém okolí a přizpůsobovat se jim. Bakterie při svém růstu produkují tzv. **autoinduktory**. V momentě, kdy koncentrace autoinduktorů dosáhne prahové koncentrace, dojde k ovlivnění transkripce genů množících se bakterií. Touto změnou exprese genů mohou podmínit **zastavení růstu** bakterií nebo její další růst. Tímto mechanismem si kolonie udržuje optimální hustotu populace.

Dalším faktorem, který mohou autoinduktory ovlivňovat je **produkce některých metabolitů** (např. produkce proteáz u *Pseudomonas aeruginosa*).

Biofilm lze pozorovat konfokálním laserovým mikroskopem v optických řezech a z nich složit prostorovou strukturu. Tloušťka biofilmu kolísá od několika až do stovky mikrometrů, podle dostupnosti živin.



Biofilm *Staphylococcus aureus* na katetru



5 fází tvorby biofilmu:

1. Iniciální přilnutí, 2. Ireverzibilní přilnutí, 3. Zrání I, 4. Zrání II, 5. Odlučování bakterií a šíření kolonie

## Příklady míst tvorby biofilmu

- **Zubní plak** – viridující streptokoky.
- Periodontitida – v kapsách pod dásní (tvorba polymikrobiálního biofilmu, kam neproniká kyslík), nahromaděná bakteriální hmota, odumřelé buňky a hnisavé buňky situaci zhoršují.
- **Zánět středního ucha** – hemofily.
- Osteomyelitis – *Staphylococcus aureus*;
- Cystická fibróza, k primárním respiračním infekcím se přidávají chronické nebo opakující se infekce. Dochází k ucpávání průdušek a trvalé poškození epitelu. Na tomto poškozeném epitelu se biofilmem usadí *Pseudomonas aeruginosa* a jí podobné.
- Záněty žlučových cest – G– střevní tyčinky.
- Při chronickém zánětu prostaty – bakterie pronikají do prostaty proti proudu moče, akutní prostatitida může přejít v chronickou. Zpočátku je biofilm jen komplikace, později i příčina onemocnění.
- Špatně vyživovaná kůže a podkoží při bércových vředech, na povrchu popálených ploch.
- Nitroděložní tělísko může být příčinou zánětů v dutině pánve a sepse.
- Asistované dýchání – tvorba na stěně trubic. Při nedostatku ošetřování mohou bakterie proniknout až do průdušek a plic.
- Intravenózní **katetry** – koaguláza negativní stafylokoky.
- Umělé srdeční chlopně.
- Kloubní náhrady.
- Kontaktní čočky – při nesprávném užívání se usazuje *Pseudomonas aeruginosa*.
- V urologii je biofilm nejčastější příčinou infekce při **zavedeném močovém katétu**.

## Rezistence buněk biofilmu k antibiotikům

Buňky biofilmu jsou **velmi rezistentní k antimikrobním látkám a dezinfekcím** (až tisíckrát více než buňky planktonické). V lékařské praxi to znamená, že k léčbě nestačí ani vysoké dávky antibiotik. Odolnost je vyjádřena fenotypově – nejde o rezistenci podmíněnou geneticky.

Laboratorní vyšetření citlivosti vůči antibiotikům podává nesprávné výsledky. Bakterie biofilmu jsou rezistentní, ale oproti planktonickým bakteriím se v optimálních laboratorních podmínkách jeví jako citlivé.

Odolné buňky tolerující antibiotikum a setrvávající v těle se obecně nazývají **perzistoři**. V biofilmu se mezi buňkami přenáší geny až tisíckrát úspěšněji, než mezi planktonickými buňkami (podpora přenosu genů rezistence v populaci). Hlenovou hmotou jsou buňky v biofilmu také fyzicky **chráněny před protilátkami**.

## Faktory ovlivňující množení bakterií

- **kyslík**
  - aerobní – *Pseudomonas*, kyslík akceptor elektronů
  - fakultativně anaerobní – enterobakterie
  - anaerobní – klostridia
  - mikroaerofilní – *Neisseria*
  - kapnofilní – meningokoky, gonokoky
- **voda**

- většina hygrofilní (x lyofilizace – sušení zmražených bakterií ve vakuu), k vyschnutí odolnější G+ a acidorezistentní (stafylokoky a korynebakteria na kůži)
- xerofilní – voda na povrchu částic (půda), nokardie, aktinomycety, plísně
- **teplota** – minimální, optimální a maximální růstová teplota – teplotní rozmezí
  - psychrofilny – 0–20 °C
  - psychrotolerantní – yersenie, listerie, salmonelly, S. aureus
  - mesofily – 20–40 °C
  - termofily – nad 40 °C
  - hypertermofily – nad 80 °C
- **hydrostatický tlak** – hlubokomořské
- **osmotický tlak** – většinou hypotonické prostředí, ochrana stěnou
  - hypertonické – plasmolýza (konzervace potravin)
  - halofily – halotolerantní a obligátní (enterokoky, stafylokoky, *Vibrio*) nebo extrémní halofily
- **pH**
  - neutrofilny – většina
  - alkalofily – *Vibrio cholerae*, alkalotolerantní – *Proteus*, enterokoky
  - acidofily – laktobacily
- **oxidoredukční potenciál**
  - aeroby – oxidované prostředí
  - anaeroby – potřeba nízký potenciál
- **záření** – poškození ultrafialovým a ionizačním zářením

## Odkazy

### Související články

- Kultivace buněk a tkání in vitro, význam v medicíně
- Buněčné kultury

### Zdroj

- JANSKÝ, Petr. *Zpracované otázky z mikrobiologie* [online]. [cit. 2012-02-06]. <[https://www.yammer.com/wikiskripta.eu/uploaded\\_files/3804405](https://www.yammer.com/wikiskripta.eu/uploaded_files/3804405)>.