Mikroorganismoen mundua: sarrera

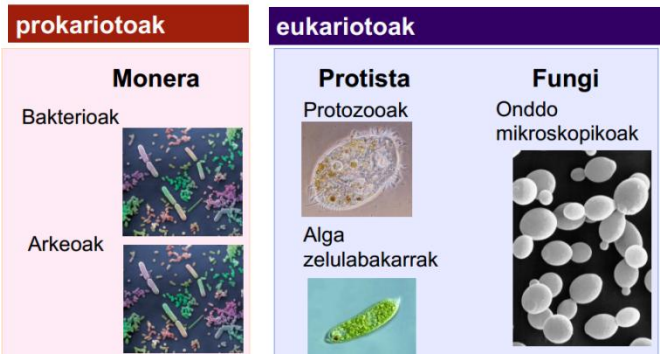
1. Mikroorganismoak: Zer dira?
2. Mikroorganismoen ezaugarriak
3. Mikrobiologiaren historioa: etapa inportanteenak

1. Mikroorganismoak: Zer dira?

Mikroorganismoa: organismo mikroskopiko zelulabakarrak, oso oso txikiak (0.2mikram – 100mikram tartean gutxi gora behera).

Sailkapena:

• Prokariotoak ○ Monera ▪ Bakterioak ▪ Arkeoak Bi hauek morfologikoki oso antzekoak dira. Egituran ordea (horma zelularra, osaera…) oso ezberdinak.	• Eukariotoak ○ Protista ▪ Protozooak (fotosintesirik ez) ▪ Alga zelulabakarrak (fotsint bai) ○ Fungi ▪ Onddo mikroskopikoak Protistakfungiekin alderatuz gero, fungiakfotosintetikoak direla aipagarria da, eta protistak ordea partikulaz (zerbait solidoz) elikatzen dira. Horrez gain, protistak mugikorrak dira, baina fungiak ez.
Txikiagoak Nukleo gabeak Erribosomak badituzte baina erretikulu endoplasmatikoa, Golgiaparatua… ez. (Endomintz sistema eta beste organuluak) Zelula pareta izan dezakete	Handiagoak Nukleodunak Kloroplastoak eta mitokondrioak izan ditzakete, erribosomak, erretikulu endoplasmatikoa…



Fungi erreinuko onddo mikroskopiko baten adibidea SaccharomyCerevisiae da; ardoa, zerbeza, etab. egiteko erabiltzen dena.

Izaki bizidunak:

Orain arte ikusitakoak izaki bizidunak dira. Zer esan nahi du honek?

Ikuspegi biokimikoa:	*Ikuspegi fisikoa:*

▪ Energia lortzeko mekanismoak dituzte
▪ Makromolekulak
  ○ DNA: informazioa gorde
  ○ RNA: proteinak egiteko
▪ Makromolekulen sintesiaren mekanismoak dituzte
	ZELULA (eta bere teoria):
	▪ Unitate mikroskopikoak
	▪ Mintzez inguratuak
	▪ Organismoaren fisiologia mantentzeko behar duten materiala dute

Baina: **birus, biroide eta prioien** kasuan zer? Mikroorganismoak al dira hauek ere?

Mikroorganismo azelularrak:

- Ez dira zelulak.
- Egitura estatikoak eratzen dituzte: ez dira ez hazi ez mugitzen.
- Ez dira beren kabuz ugaltzeko gai ->Hostalaria behar dute. Ondorioz, derrigorrezko bizkarroiak dira.
- ➢ <u>Birusak</u>*:* Azido nukleikoa proteinazko egitura batez inguratuta.
- ➢ <u>Biroideak</u>*:* RNA kate biluziak.
- ➢ <u>Prioiak</u>*:* Proteina zoltzaileak (proteina patogenoak)
- Hauek benetan mikrobiologian ikertzen diren arren, ez dira mikroorganismo unizelularrak (ez bizidunak).

2. Mikroorganismoen ezaugarriak:

- Zaharrak
- Txikiak
- Metabolikoki aldakorrak eta anitzak
- Ugariak, ubikuoak
- …

<u>Txikiak</u>: Masan 1 gizaki = 10^17 bakterio. Abantaila bat dute: azalera/masa oso txikia dute, hau da, azalera handiak bolumen txikia elikatu behar du. Eukariotoekin konparatuz gero, zenbaki hau mila aldiz handiagoa da. Gainera organulurik ez izatean, sinpleagoak dira eta elikagaia errazago bana dezakete.

<u>Metabolikoki aldakorrak</u>: Inguruko aldaketei berehala aurre egin diezaiekete (egokitzapen erraztasuna). *Adib*. Aukerazko anaerobioa: oxigenoarekin eta gabe bizi daiteke.

Fisiologikoki anitzak: (forma fisiologikoak)
Orokorrak:

- Elikagai organiko disolbatuak hartzen dituzte -> protozooak, onddoak, prokariotoak
- Eguzkiaren argia energia lortzeko, oxigenoa ekoizten dute eta karbono dioxidoa asimilatu -> landareak, alga zelulabakarrak, prokariotoak
- Elikagai organiko partikularrak (partikulak jatea, handiak) -> animaliak, protozooak, onddoak*, prokariotoak* (*=partikula baten aurrean entzima ekoizten dute, kanporatu eta honen bidez degradatu egiten dute partikula, ondoren jateko)

Bereziak:

- Eguzkiaren argia erabiltzen dute energia sortzeko baina oxigenoa ekoiztu gabe -> protozooak
- Bakarrik mineralez elikatu ->prokariotoak
- Metano gasez elikatu ->prokariotoak

Ezaugarri fisiologiko bereziei esker egokitu daitezke ingurune ezberdinetara.

Hazten eta moldatzen dira: Elikagaiak hartzeko erraztasuna dute (azal/bol erlazioagatik), ondorioz, baldintzak egokiak direnean, azkar hazten dira (24htan kriston masa lortu geke). Hala ere, naturan ez da guztiz honela izaten, inguruneko baldintzen arabera denbora gehiago edo gutxiago iraungo baitute.
Aldaketen aurkako erantzun azkarra ematen dute, hauek detektatzeko mekanismoak eta mekanismo erregulatzaileak dituztelako.

Ugariak dira: adaptatzeko duten gaitasunagatik.

Funtzioak: lurreko baldintzak mantentzen dituzte, honetarako C, N, O birziklatuz. Adib. Aireko oxigenoaren erdia mikroorganismoek sortua da fotosintesi bidez (bestea landareek). Nitrogeno erabilgarriaren iturri nagusia ere badira (guk ezin dugu sintetizatu Ndun molekulak).

Onak edo txarrak? Denetarik dago, batzuk patogenoak dira, hau da, guretzat txarrak; besteak onurak ekartzen dizkigute. Dena dela, ona/txarra kontzeptua gure ikuspuntuaren arabera da. Gaur egun, guretzat patogenoak direnak gutxi dira, baina onurak ekartzen dizkigutenak ere bai.

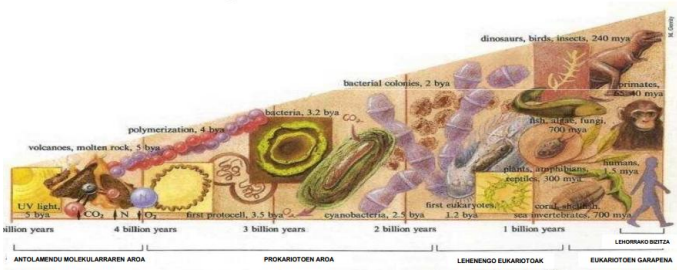
Mikroorganismoen kokapena eskala geologikoan:

Mikroorganismoak oso zaharrak dira.
Historiaren aroak ikuspuntu molekularretik: (urteak ez jakin)

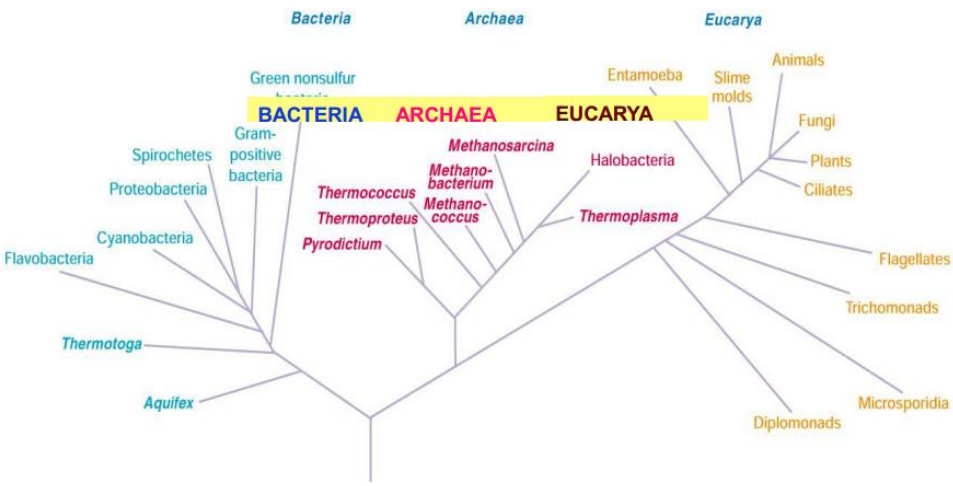
- Duela 5-4 bilioi urte artean: Antolamendu molekularraren aroa
- Duela 4-1,8 bilioi urte artean: Prokariotoen aroa
    - Zehazki duela 3 bilioi urte sortu zen lehen organismo zelularra
- Duela 1,8-1,4 bilioi urte artean: Lehenengo eukariotoak
- Duela 1,4tik aurrera: Eukariotoen garapena

1 bilioi = 1 mila miloi urte, honekin, prokariotoek urte asko izan dituztela gure planetako habitatera moldatzeko eta eboluzionatzeko esan nahi da.

Mikroorganismoak oso zaharrak dira



Eboluzioa zehazki honela izan zen:



3. Mikrobiologiaren historia: etapa inportanteenak

XVII. mendetik gaur egunerarte hiru garai bereizten dira:

1. Aurkikuntza
2. Patogenoak
3. Ekologia

1. Aurkikuntza (XVII-XIX):

- RobertHooke: onddoen gorputz fruitukorrak ikertu zituen, lehen mikroorganismoak deskribatuz. Hau ogi ustelduaren gainean ikusitako iletxoetan egin zuen.
- AntonievanLeewenhoek (1677-1684): lehen mikroskopioa (oso ona) egin zuen eta "animalkuluak" izenez deskribatu zituen behatutako lehen bakterio eta legamiak.

2. Patogeno aldia (XIX-XX):

- Aldi honetan patogeno asko aurkitu ziren.
- Gaixotasunaren eta bakterioen arteko erlazioa erakusteko, bakterio eragilearen kultibo puruak beharrezkoak ziren.
    - <u>Kultibo purua:</u> mikroorganismo mota bakarra duen kultiboa, zelula (espora) bakar batetik sortua. Nola sortzen da?
        - Nahasketa bat asko diluitu ondoren, kultibo solidoan ondo barreiatu behar da, honela kolonia makroskopikoak sortzeko eta kolonia bakoitza zelula batetik sortua izateko. Honela, kolonia horiek puruak izango dira.

- 1876. urterarte kultibo mixtoekin lan egin zuten.

<u>Garai honetako zenbait ikerlari aipagarri (kultibo puruak lortzeko lehen saiakerak):</u>

Uster: kultibo likidoak erabiltzen zituen. Berak lortu zuen diluzio teknikak burutzea.

Schroeter: kultibo medio solidoak erabili zituen. (adib. ogia eta patata)

RobertKoch: alemaniako medikua zen, Berlingo eskolan ikasia. Tuberkulosiaren patogenoa aurkitu zuen eta kultibo medio likidoa gogortzaile batekin (gelatina) erabili zituen. Gainera, ildaskako ereinketa izeneko isolaketa teknika asmatu zuen.

- Koch-en postulatuak (1876)
    1. Mikroorganismo patogeno susmagarria gaixotasunapairatzen duten ostalari gaixo guztiengan aurkitubehar da eta ostalari osasuntsuengan ez da egonbehar
    2. Mikroorganismo ostalari gaixorengandik isolatu etakultibo puruan hazi behar da
    3. Mikroorganismoaren kultibo purua ostalariosasuntsuei inokulatuz gero, hauek ere gaixotasunberdina pairatuko dute
    4. Ostalari berri honengandik ere mikroorganismoberdina isolatu eta kultibo puruan hazi behar da

LouisPasteur: ardoko eta inguruneko mikroorganismoekin lan egin zuen.

- **Berezko sortzapenaren teoria baztertu** zuen bere ikerketei esker. Ez dago berezko sortzapenaren bidez sortzen den bizidunik.
- Mikroorganismoak edonon egoten dira, airean eta hauts partikuletan. **Ubikuoak** dira.
- Hildako animali eta landareen **deskonposaketan** eta **elikagaien eraldaketan** parte hartzen dute.
    - Batzuek **hartzidura** burutzen dute.

3. Ekologia aldia

S. Winogradsky eta M.W. Beijerinck

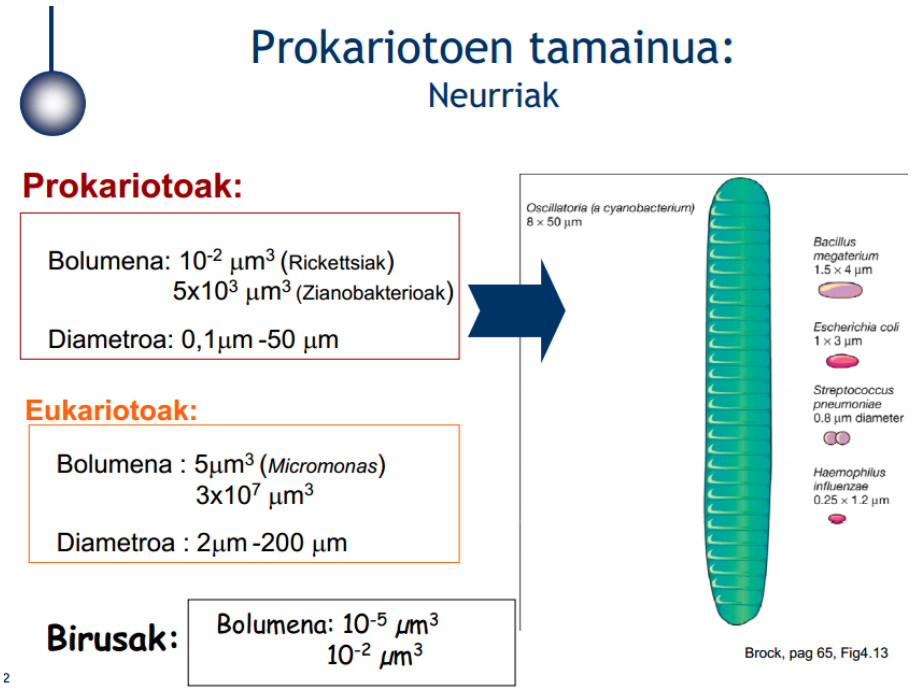
- Mikroorganismoek aldaketa geokimiko asko sortarazten dituzte eta elementuen zikloetan parte hartzen duet (C, N, P eta S-ren zikloetan oso garrantzitsuak)
- Mikroorganismoen zeregina: konposatuak aldatzea, goi mailako organismoek erabili ditzaten.

T. Brock:

- PrinciplesofMicrobialEcology (1966) argitaratu zuen.
- Mikroorganismoek naturan betetzen dituzten funtzioak deskribatu zituen.
    - Organismoen arteko eta ingurugiroarekin mantentzen dituzten harremanak.
- Mikroorganismo komunitate desberdinei buruzko ikerketak egin zituen.

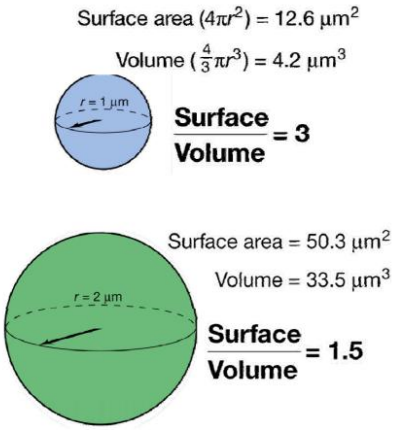
2. **Mikroorganismo prokariotoen egitura eta funtzioa:**
   I. **Morfologia**
   II. **Prokariotoen osagaiak**
   III. **Azaleko geruzak**
   IV. **Horma zelularra**
   V. **Luzakinak**
   VI. **Flageloak**
   VII. **Mugimendua**
   VIII. **Mintz plasmatikoa**
   IX. **Protoplasma**

1. Morfologia



Tamainaz: Eukariotoak>prokariotoak> birusak. Hala ere, prokariotoen barnean neurrian nahiko aniztasun dago.

Txikia izatearen abantailak: azalera/bolumen erlazioa
Txikiak izanda, azalera-bolumen erlazioa handitu egiten dute eta erlazio honen handipena onuragarria da, azalera erabiltzen baitute kanpo ingurunearekin harremanetan jartzeko (elikatzeko).Hala, txikia izateak abantaila ebolutiboa ematen du, errazago eskuratzen baitute elikagaiak.

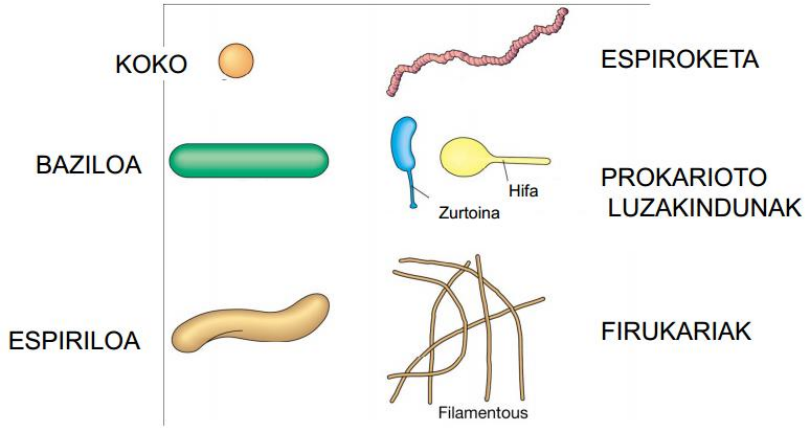


<u>Mugak: gutxieneko tamainua</u>
Prokariotoen eta birusen kasuan, tamaina txikiena mugatuta dago hainbat molekula beharrezkoak direlako. Mugapen hau ezartzen dutenak **molekulak** dira (mugapen molekularra).

Mugak: gehieneko tamainua

Metabolismoa erregulatzeko gaitasunak baldintzatzen du hau, eta sorturiko hainbat muga **estrukturalek** ere (mitokondrio, nukleo, kloroplasto…). Mikroorganismoa geroz eta txikiagoa izan erregulaziorako errazagoa da eta geroz eta handiagoa aldiz, zailagoa. Ondorioz, ingurune aldakorretan mikroorganismo txikiak ugariagoak dira eta errazago egokitzen dira (eboluzioa).

2. Prokariotoen osagaiak



Bakterio batzuk **pleomorfikoak** dira

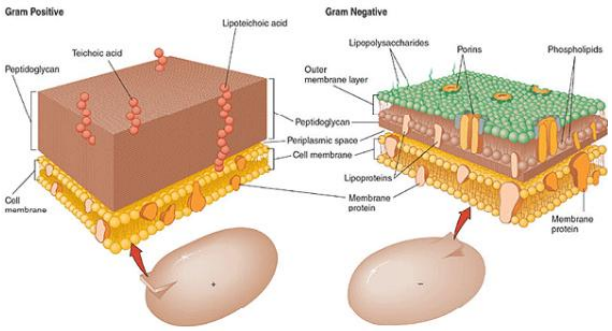
Kokoa: esferikoak
Baziloa: zilindrikoa eta zuzena, makila antzekoa
Espiriloak: baziloen antzekoa baina espiral buelta bakarrarekin.
Espiroketa: espiral buelta bat baino gehiagorekin. Mugimendu eta egitura bereziak.
Bibrioa: borobil erdi bezala (koma)
Prokarioto luzakindunak: toki ezberdinetan kokatzeko zurtoina eta hifa dute.
Firukariak: filamentuak osatuz
Sailkapen gabe: beste itxurak

Pleomorfikoak: inguruneko baldintzen eta bizi zikloaren arabera formaz aldatzen dute. Adib. *Rhizobium* landareen sustraietan sartzean flageloa galtzen dute.

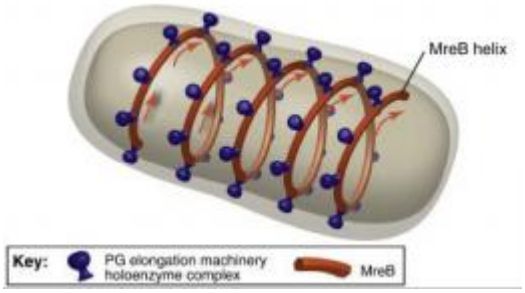
Normalean, mikroorganismo guztiek morfologia bera mantentzen dute.

Nola mantentzen da zelulen morfologia?

- Hormaren bidez: pareta peptidoglikanoaGram (+)



- Proteina berezien bidez: MreB proteinak
    - Soilik baziloetan aurkitu dira mintz plasmatikoaren azpian
    - Bacteria domeinuan soilik aurkitu dira
    - Aktinaren antzekoak diren osagaiez osatuak



Morfologiaren eragina:

- Kokoak: lehortearekiko erresistenteagoak dira, azalera/bolumen baxuena dutelako.
    - Ur gutxiko baldintzetan abantaila dute (elikagai gaitasun txikiena).
- Baziloak: elikagaiak hartzeko eraginkorragoak dira, azalera/bolumen handia dutelako. Batez ere luzeak eta finak direnean gertatzen da hau.
    - Elikagai gutxiko inguruneetan abantaila.
- Espiriloak: morfologia egokia dute ingurune likido biskotsuetan murgiltzeko (sakakortxo mugimendua)

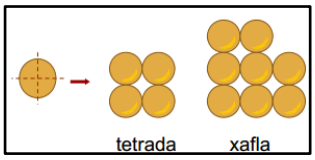
Zelulen elkarteak:

Normalena banatzea da. Genero batzuk ordea, zatitzean batera gelditzen dira, mikroorganismo elkarteak osatuz. Honek zein mikroorganismo den jakiteko baliagarria den informazioa ematen digu.

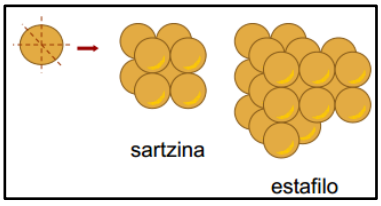
1. Baziloen elkartea: hauek plano bakar baten arabera zatitzen dira.
    a. Diplobaziloa: bi bazilo elkartuta
    b. Estreptobaziloa: bazilo katea

2. Kokoen elkartea: plano desberdinetan gerta daiteke zatiketa.
    a. *Streptococcus*: plano bakarrean
        i. Diplokokoa
        ii. Estreptokokoa

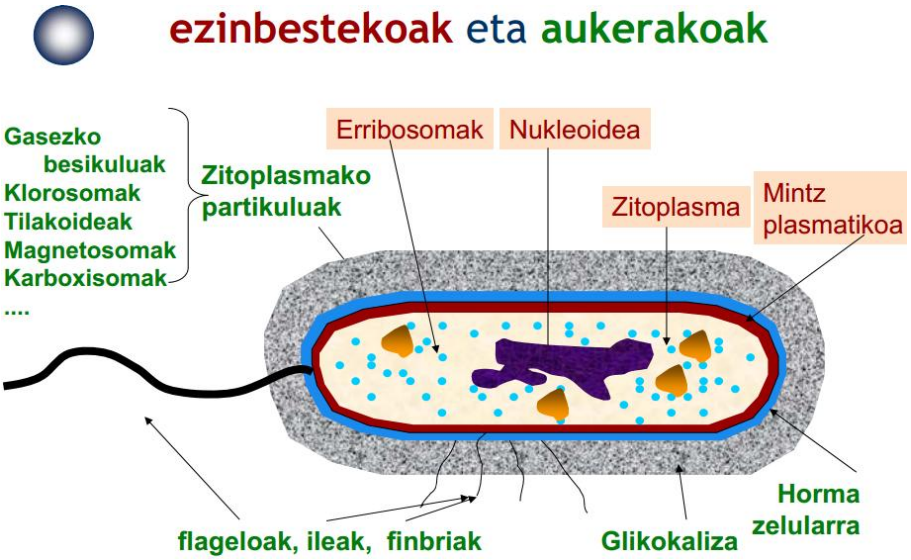
    b. *Micrococcus*: bi planotan
        i. Tetrada (4 koko)
        ii. Xafla (laua)



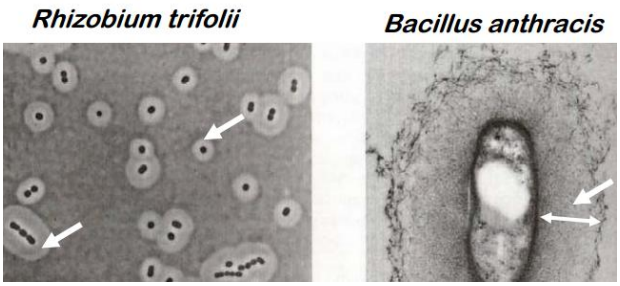
    c. Hiru planotan
        i. *Sarcina* generoa: kuboa (8 koko)
        ii. *Staphilococcus* generoa: (8 baino gehiago)



Prokariotoen osagaiak:



3. Azaleko egiturak



Glikokaliza:
Horma zelularraren gainean agertzen den geruza sendo bat da.

Egitura: 2 mota

- Kapsula: glikokaliza, oso gogorra
- Muki geruza: geruza malgu eta mukitsua

Konposizioa:

- Gehienetan pisu handiko polisakaridoak (polialkoholak, poliaminoazukreak…)
- Gutxitan poliaminoazidoak

Funtzioa:

- Prokariotoen biziraupenarekin zerikusia du.
- Itsasgarritasuna handitu:
    - Patogenoak badira, beste zeluletara itsatsi eta infektatu ahal izateko.
    - Patogenoak ez badira, ur ingurune oligotrofikoetan. Elikagai kopuru txikia dagoenean, azaleretan disolbatutako elikagaiak metatzen dira. Mikroorganismoak azalera horietara itsatsiz gero, elikagai gehiago lortuko du.
- Fagozitosia galaraztea (birulentzia mekanismoa). Patogenoa ezagutzea galarazten du, sistema inmunologikoari aurre eginez.
- Prokariotoa isolatzea: birus, toxiko, etab. kanpoan utziz.
- Lehorketarako erresistentzia: glikokalizean ura metatzen baita, geruza hezea.

4. Horma zelularra

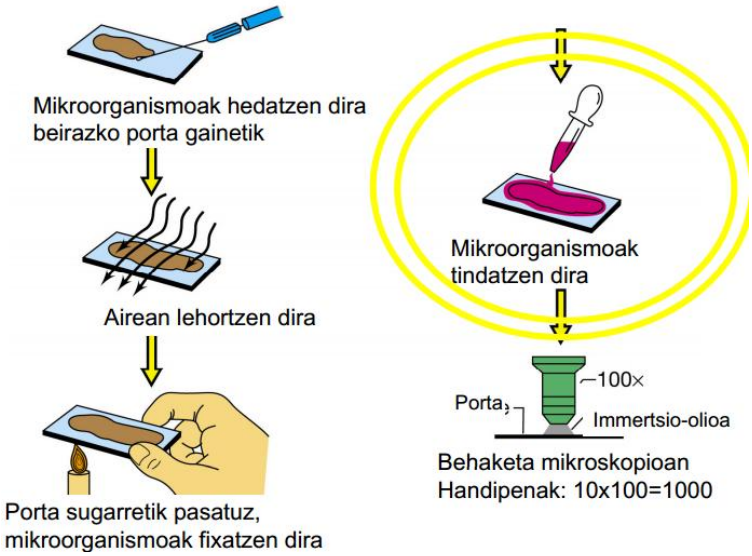
- Mintz plasmatikoaren gainean kokatutako geruza da.
- Egitura eta konposaketa desberdina da bakterio eta arkeoetan.
- Ez da agertzen prokarioto guztietan, baina ia gehienek badute.
- Badira bakterio eta arkeo batzuk ez dutenak hormarik: MIKOPLASMAK

Sailkapena:

- Hauek dira bereizten diren horma motak:
    - Bakteria domeinuan 3 mota daude
        - Gram (+)
        - Gram (-)
        - Mikobakterioena
    - Archaea domeinua
    - Horma gabeak

Bakterioen horma zelularra:

Mikroskopioan behatzeko:



Gram tindaketa:

Lehenengo egin zena da (Cristian Gram, 1884). Hau egiteko lehenik eta behin kultibo purua lortu beharra dago medio batean. Ondoren portaren gainean hainbat bakterio zabaldu, airean lehortu eta porta sugarretatik pasatuz (fixapena), tindatzeko prest egongo da:

1. Urratsa:
    - Tindaketa: kristal bioleta 1min.
    - Zelula guztiak more-urdinez tindatzen dira
2. Urratsa:
    - Tindatzailearen fixapenalugola erabiliz, aurreko tindatzailea hobeto fixatzeko.
    - Zelula guztiak urdinez tindatuta mantentzen dira.
3. Urratsa:
    - Garbiketa: dekoloratu.
    - Dekoloratzailea: alkohola, 20 seg.
    - Zelula batzuk urdin mantenduko dira eta beste batzuk dekoloratu (Gram -) egingo dira.
4. Urratsa:
    a. Kontraste tindatzailea: Safranina (arros-gorria) 3min
    b. Dekoloratzaileakdekoloratutako zelulak larros-gorriz tindatzen dira.

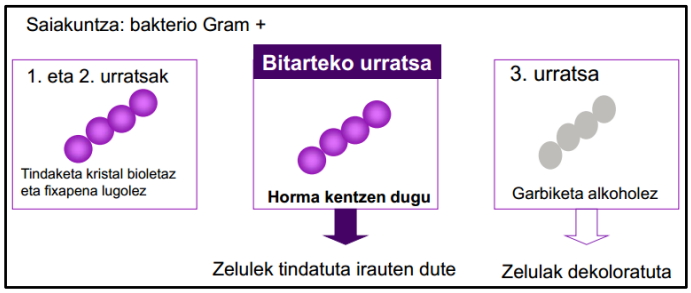
Emaitzen interpretazioa:

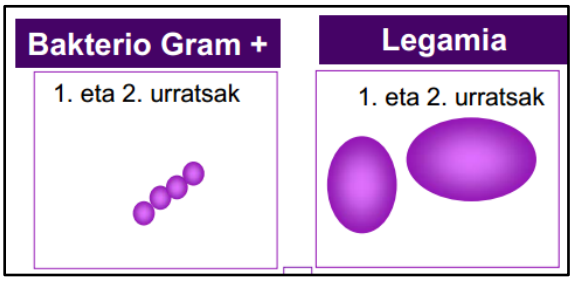
- Moreak: Gram (+)
- Gorriak: Gram (-)

*Kontuz! Batzuetan tindaketa honetan zelulak ez dira tindatzen: horma gabeak direlako!! Adib. Archeoak, mikobakterioak…

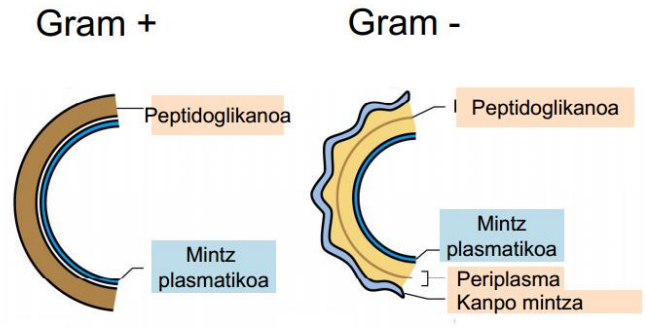
Gram tindaketak ez du hormaren konposizioa adierazten, egitura baizik.

Baieztapen hau bakterioak Gram tindaketan morez tindatu, horma zelularra kendu eta alkoholez garbitzean dekoloratu egiten zirela ikustean egin zuten (Hormak tindatzailea kanpora irtetea eragozten du, baina ez da horma bera tindatzen).Eta gainera, legamiak (kitinazko hormadunak) eta bakterio Gram (+)-ak berdin tindatzen dira.





Hormen ondorioa eta sailkapena:



Gram (+): Horma lodia dute, geruzarik gabe.

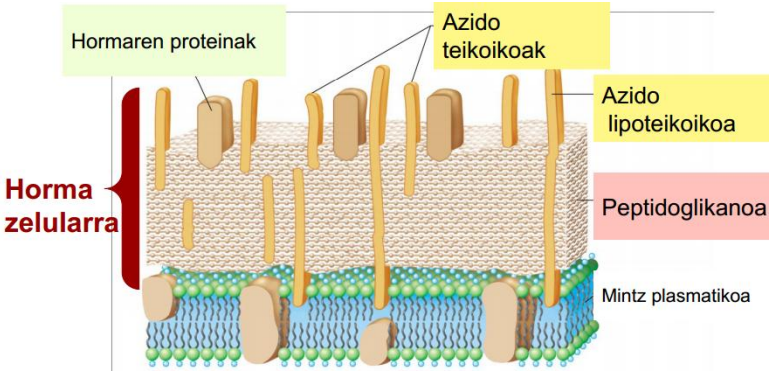
- %90 peptidoglikanoa
- %10 azido teikoikoa (azido lipoteikoikoak)

Gram(-): horma multigeruzatua dute.

- %10 peptidoglikanoa
- Kanpo mintza (lipopolisakaridoak, fosfolipidoak, proteinak)
- Periplasma

->Gram (+)-en horma:

- Lodia
- Osagai nagusia: peptidoglikanoa
- Tartekatuak:
  - Azido teikoikoak
    - Azido lipoteikoikoak (mota bat), mintz plasmatikoari loturik agertzen dira nahiz eta horman egon.
  - Hormaren proteinak (oso gutxi)



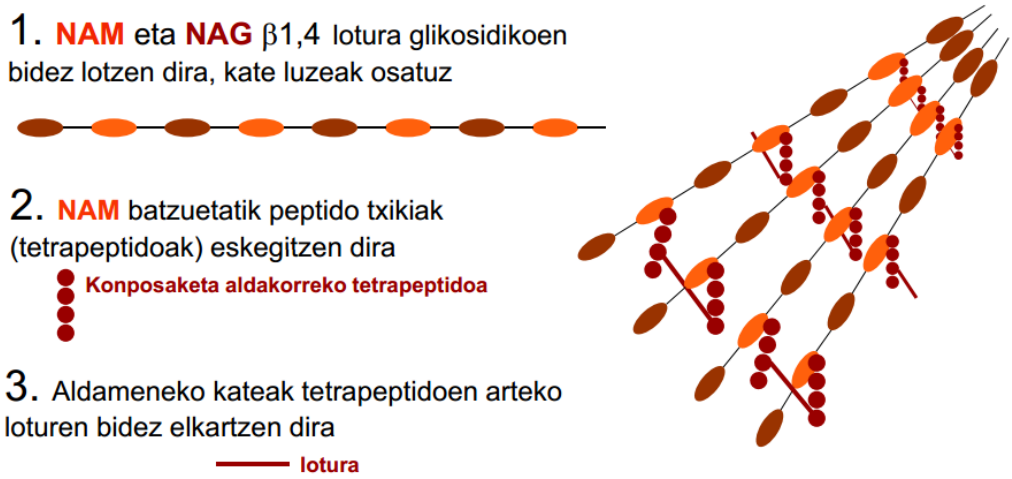
Peptidoglikanoa (mureina):

- Osagai garrantzitsuena da
- Mintz plasmatikoaren gainean dagoen geruza trinkoa da. (pareta gogorra)
- *Bacteria domeinuan* agertzen da: bakterio hormadun guztietan (salbuespen gutxi)

Konposaketa kimikoa:

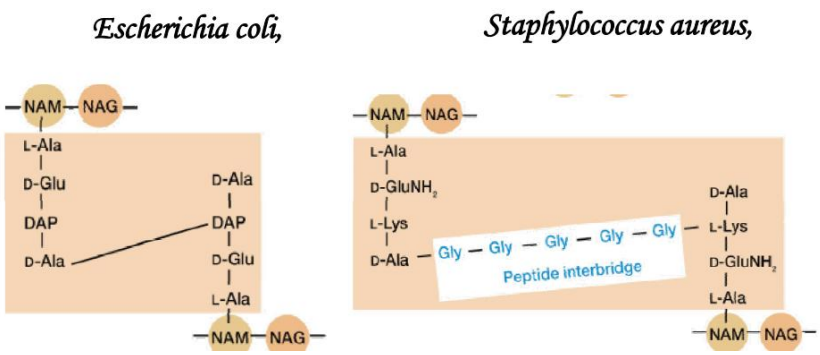
- Bi aminoazukreazetilodun:
  - NAG: N-azetilglukosamina
  - NAM: N-azetilmuramikoa (bacteria domeinuan soilik)
- Aminoazidoak (L eta D)
  - D-alanina, D-glutamikoa (proteinetan inoiz ez da D egituran agertzen)
  - L-alanina
  - Lisina
  - DAP: diaminopimelikoa (bacteria domeinuan soilik)

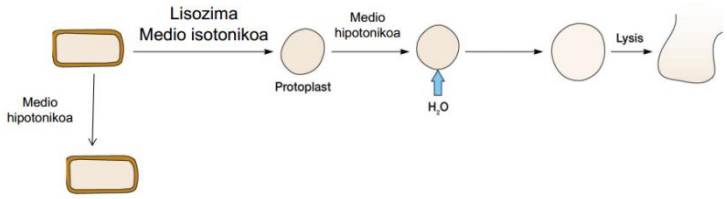
Egitura:



*Tetrapeptidoak adib. D-glukosa, D-alanina…

*Motak:*Tetrapeptidoen konposaketaren eta loturen araberakoak.





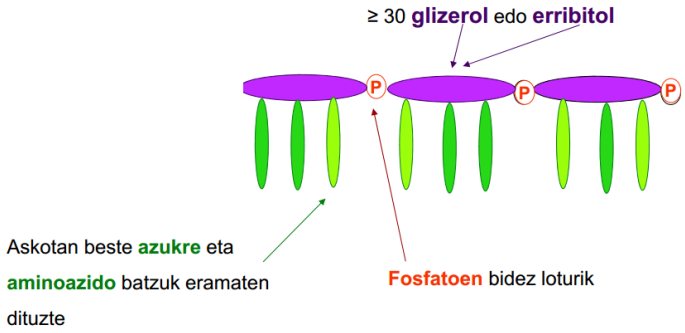
Funtzioak:

- Peptidoglikanoak**morfologia mantendu**.
  - Irudian: lisozimak β(1-4) lotura (NAM eta NAG artekoa) apurtzen du eta protoplastoa hormarik gabekoa (morfologia galduta) eratzen da.
- Peptidoglikanoak**zelularen lisaketa osmotikoari aurre** egin.
  - Irudian: H_2O sartzean lisia gertatzen da. Gram (+)-ei ez.
- Muga hidrofilikoa eratzea, eragile kaltegarri hidrofobikoen aurkako babesa emanez. Gainera, molekula handien aurkako babesa ere bai.

Azido teikoikoak:

Konposaketa:

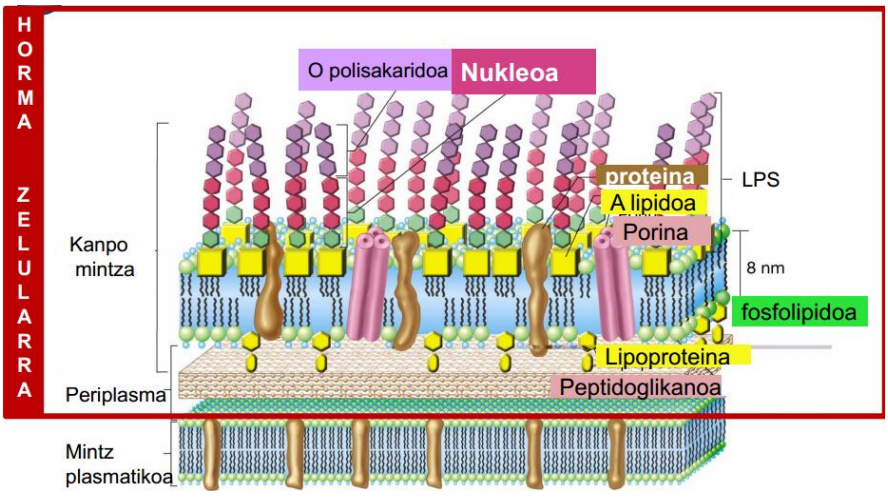
- **Azido teikoikoa**: PeptidoglikanoarenNAM-ei lotuta agertzen dira.
  - Glizerol edo erribitol monomeroak fosfatoen bidez loturik, kate luzeak eratzen dituzte (polisakaridoak).
  - Monomero hauetatik, beste azukre edo aa-k izan ditzakete eskegita.
- **Azido lipoteikoikoa**:
  - Glizerolezkoak beti.
  - Mintz plasmatikoaren lipidoei lotuta agertzen dira.



Funtzioak (bienak):

1. Autolisien jarduera erregulatzen dute azido teikoikoek
   a. Horma zelularraren hazkuntza erregulatzen dute
   b. Zelularen zatiketan parte hartzen dute: horma noiz zatitu behar den.
   *Hormaren hazkuntza tartekatua da. Zati berriak zaharrekin tartekatuta daude eta zatiketa ondoren zelula berriak zati zahar eta berriak izango ditu. Autolisiak zuloak egingo dituzte, horman zuloak zabaldu egingo dituzte eta zati berriak tartekatu ondoren itxi egingo da.
2. Bakterio Gram (+)en antigeno garrantzitsuak dira, gure sistema immuneak ezagutu.
3. Bakterio Gram (+)en azalerako karga negatiboa eragiten dute.
4. Patogenoen itsasgarritasuna ostalariaren azalari emendatzen dute (*streptococcus*)

->Gram (-)-en horma:



- Hauen horma zelularra periplasmatik kanpo mintzerarte da, Gram positiboena baino konplexuagoa.
- Periplasmak hutsik dagoela dirudien arren, peptidoglikanozko geruza argalagoa dago.
- Kanpo mintza: oinarrian mintz plasmatikoaren antzekoa da.
    - Fosfolipidoak
    - Proteinak: porinak
    - Lipopolisakaridoak (LPS)
- Peptidoglikanozko geruza (periplasma) eta kanpo mintza lotzen lipoproteinak daude.

Peptidoglikanoa:

- Konposaketa Gram (+)en antzekoa. Geruza askoz meheagoa.
- Lipoproteinak ager daitezke batzuetan (beti ez): kanpo mintzaren eta peptidoglikano geruzaren arteko zubiak dira:
    - Peptidoglikanoaren azido diaminopimelikoari (DAP) lotzen zaio.
    - Enterobakterio eta beste Gram (-) batzuetan.
- Peptidoglikano motak:
    - Tetrapeptidoaren osagaien arabera.
    - Tetrapeptidoen arteko lotura motaren arabera.

Kanpo mintza:

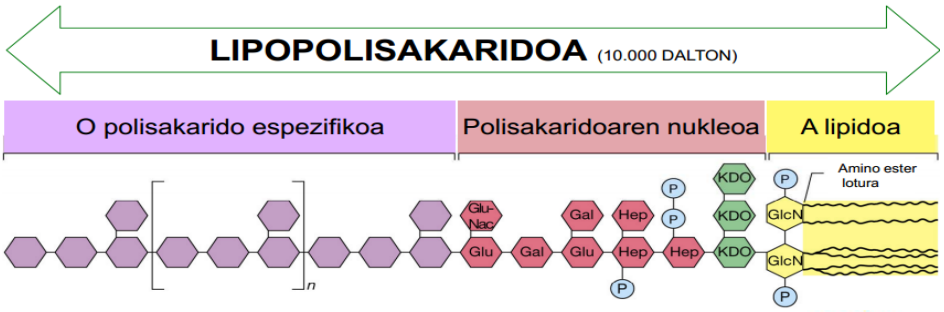
- Bigeruzalipidiko ez oso simetrikoa da. Peptidoglikanozko geruzaren gainean.
- Konposaketa:
    - Fosfolipidoak→ batez ere barnealdean
    - Proteinak
    - Lipopolisakaridoak→ kanpoan
- Beste izen batzuk:
    - Lipopolisakaridozko geruza, LPS geruza… (Adi! Ez daude LPSak soilik)

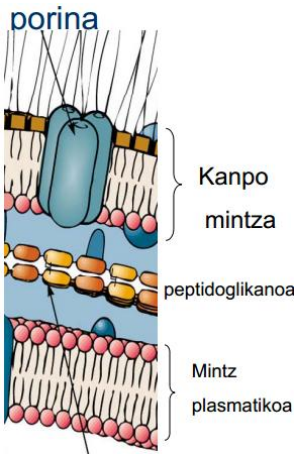
Lipopolisakaridoak:

Molekula luzeak dira. Hiru atal bereizten dira:

1. A lipidoa
    a. Glukosaminazkodisakaridofosforilatua, kate luzeko gantz-azidoekin esterifikatua dagoena.
    b. LPS-aren atal hidrofoboa eratzen du: bigereuzaren barrurantz kokatuta dago.
2. Polisakaridoaren nukleoa
    a. Azuke desberdinez osatua:
        i. Zetodesoxioktonatoa (KDO): beti kanpo mintzean agertzen da, A lipidoari lotuta.
        ii. Heptosak (Hep)
        iii. Hexosak: Glukosa, galaktosa
        iv. N-azetil-glukosamina (GluNac)
3. O polisakarido espezifikoa
    a. LPSaren atal hidrofobikoa, kanporantz kokatua

b. Azukre desberdinez (tetrasakaridoak, pentasakaridoak) osatutako kate luzea.
c. Oso aldakorra generoaren arabera, baina espezifikoa.





Porinak (proteinak):

- Hiru proteina berdinez osatutako konplexuak dira.
- Kanpo mintza zeharkatzen dute eta zulo txikiak ireki eta itxi egiten dituzte, elikagaiak eta sustantziak sartzea ahalbidetuz.
    - **Porina espezifikoak**: konposatu zehatzak sartzeko irekitzen dira (maltosa, nukleosidoak, Fe…), bestela itxita daude.
    - **Porina ez espezifikoak**: urez beteriko kanalak dira, uretan disolbatutako molekula txikiak bertatik igarotzen dira (aminoazidoak, ioiak…).

Kanpo mintzaren funtzioak (Gram negatiboetan):

1. **Iragazkortasun hautagarriaren** lehenengo hesia da
    - Zenbait molekulekiko iragazkorra da
    - Molekula handien eta molekula hidrofiloen sarrera eragozten du (Zelula babestea)
        - Antibiotiko batzuk
        - Behazun-gatzak: kultibo medioan bakterioentzat toxikoak dira, Gram (-) hazteko erabiltzen dira eta (+)-entzat toxikoak direlako (sartu).
        - Entzima liserigarri batzuk
2. Animalientzat toxikoa da lipopolisakaridoa askotan
    - LPSaren A lipidoa “endotoxina” bat da
    - LPSaren O polisakaridoak sistema immunearen erreakzio gogorra pizten du
        - ERAGIN GARRANTZITSUENA: Sukarra (proteina pirogenikoak aktibatuz sistema immuneak zerbait sartu dela nabaritzen duenean)
        - Odol-hodien dilatazioa
        - Shock hemorragiko larria
        - Ehunen nekrosia

*Azken hiru hauek sintoma larriak dira

Periplasma gunea:

Ez da geruza solidoa, baizik eta gune bat. Gune honetan esanguratsuena peptidoglikanoa da, baina horiez gain, proteinak ditugu. Gram negatiboengan oso ongi ikusten da baina ez gram positiboengan, beraz, Gram (-)etan aztertuko dugu.

Zer da periplasma gunea? Bakterio Gram (-)en mintz plasmatiko eta kanpo mintzaren arteko gune fisikoa da.

Konposaketa:

- Proteinak
    - Entzima hidrolitikoak: elikagaiak degradatzeko
    - B-laktamasak: entzima hidrolitikoak dira baina antibiotikoen aurka dira garrantzitsuak, eraztun β-laktamikoa apurtzen dutelako.
        - (adib. Penizilina desaktibatu)
    - Garraiorako lotze-proteinak
    - Kimioerrezeptoreak: Mugimendua eratzeko (erantzun kimiotaktikoa).
        - Taxiak askotan hemen egoten dira errezeptoreak adibidez argirantz mugitzeko edo elikagaien kontzentrazio handietarantz mugitzeko…
- Peptidoglikano geruza

**Gram positiboengan*

- Ikuspegi fisikotik ez dago, kanpo mintza ez dagoelako.
- Ikuspegi funtzionaletik badago, aipatutako proteinak mintz plasmatikoan eta peptidoglikanoaren artean agertzen direlako

->Beste horma bakteriar batzuk:

Bacteria-en S geruza:

Honi buruz informazio gutxi dugu, bakarrik egitura eta konposaketa

- Gram(+) eta Gram(-) bakterio batzuengan, horma zelularraren gainean
- Planktomizetoak (bakterioak): horma bakarra dute, S geruza
- Proteinazkoak edo glikoproteinazkoak
    - Hauek azpiegitura simetrikoa eginez antolatuta daude: kristal sarea (hexagonoak)
- Ustezko funtzioa: Faktore askoren kontrako babesaeskaitzea. Hauekiko adib:
    - pH
    - Estres osmotikoa
    - Entzima litikoak (fagozitosia)
    - Prokarioto harrapariak: badaude bakterio espezie batzuk harrapariak direnak, eta beste bakterio batzuk elikagaiak lortzeko erabitzen dituzte.

Mikobakterioen horma:

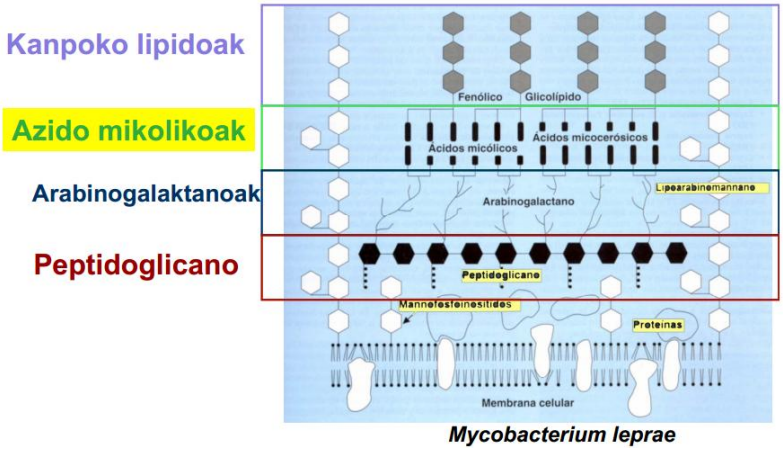
Detektapena:

- Gram tindaketa: kolorerik ez
- Mikobakterioak direla frogatzeko tindaketa berezia:
    - Tindaketa azido alkohol erresistentea = Ziehl-Nielsen tindaketa

Bakterio hauek gehienbat patogenoak dira, eta hazkuntza normalean oso motela da, nahiz eta elikagai kontzentrazio altua eduki. Hau hormaren konposaketarekin eta egiturarekin erlazionatuta egon daiteke.

Hormaren konposaketa:
Beheko partean mintz plasmatikoa dugu, behean zitoplasma eta gorantz horma zelularra duelarik.

Mikobakterioen horma zelularrak oso lodiak dira. Konposaketaz, mintz plasmatikoaren gainean peptidoglikano geruza bat du eta honi lotuta polimero handi batzuk daude, arabinogalaktanoak, azido batzuk… Normalean polimero hauek oso luzeak eta askotan adartsuak dira.



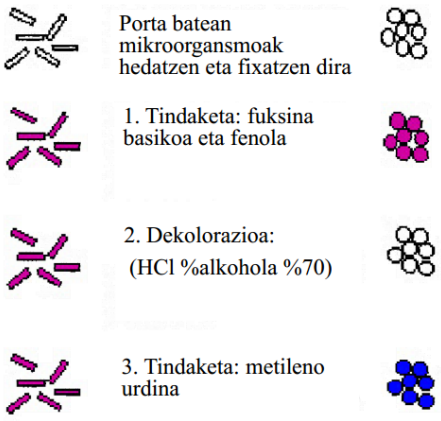
Polimero guzti hauen artean, goiko zonaldean, molekula berezi batzuk aurkitzen dira: **azido mikolikoak** (oso hidrofobikoak). Azido mikoliko hau dela eta, elikagaien sarrera mintz plasmatikorarte oso zaila egiten da, muga hidrofobiko garrantzitsua sortzen baita.

- Ondorioa: Peptidoglikanoaren gainean lipido bereziez osatutako bigeruza dago, lipido nagusiak azido mikolikoak direlarik. Oso oso hidrofobikoa da.

Tindaketa: Ziehl-Nielsen
Tindaketa hau oso garrantzitsua da identifikaziorako. Azido mikolikokopuru altuagatik ezinezkoa daGram tindaketa erabiltzea. Beraz, tindaketa azido alkohol erresistentea egiten da. Mikroorganismo hauek Ziehl-Nielsen (+) edo azido alkohol erresistenteak dira. Honetarako:

Hasi baino lehen, porta batean mikroorganismoak hedatzen eta fixatzen dira. (denak zuriak)
Ondoren:

1. Tindaketa: basikoa eta fenola. Hau ondo gertatzeko beroa ere erabili beharko dugu.
    a. Mikobakterioak: Palito moreak
    b. Beste prokariotoak: borobil moreak
2. Dekolorazioa (HCl %alkohola= %70)
    a. Mikobakterioak: Moreak
    b. Beste prokariotoak: Zuriak
3. Tindaketa: metileno urdina
    a. Mikobakterioak: Moreak
    b. Beste prokariotoak: Urdinak



*Urdinez tindatuta gelditzen direnak ez dakigu Gram+ edo Gram- izango diren.

Archaea-ren horma zelularra:

Archeo bat baldin badugu eta Gram tindaketa erabiltzen badugu, emaitza Gram + edo Gram – izan daiteke, edo bien nahasketa. Beraz, tindaketa hau ez da erabiltzen.

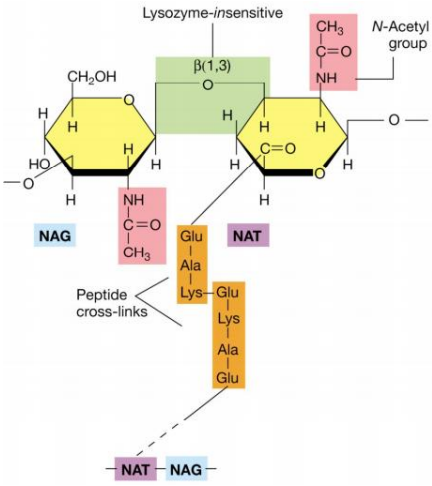
Hormaren eredu asko daude: (baina peptidoglikanorik inoiz ez)

- S geruza: Bakterioen S geruzaren oso antzekoa dela dirudi gaur egun
- Polisakaridozkoa: hau bai izan daiteke konposaketa desberdinekoa
- Sasipeptidoglikanozkoa: peptidoglikanoaren antzekoa (sasimureinazkoa)

Mikoplasmak: hormarik gabekoak dira.

Pseudo-peptidoglikanoa: (sasipeptidoglikanoa)

- NAM, D-aminoazidoak, DAP gabekoak
- NAG
- NAT (N-azetiltalosaminuronikoa)
  - NAG-NAT lotura β(1-3) [bestean β(1-4) zen.]
    - Adib. Lisozima entzimak bestea hausten du baina hau ez.
- Metanogeniko eta halofilo batzuengan agertzen da



*Azken bi hauek ez dugu ikasi beharrik.

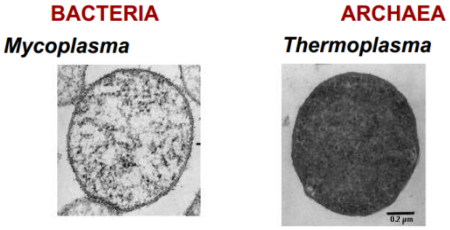
Ondorioa: oinarrizko egitura oso antzekoa da baina molekulak ez, eta loturak ere ez.

->Hormarik gabeko prokariotoak:

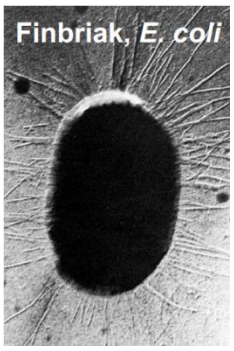
- Bacteria:
  - Mycoplasma: Mintz plasmatikoan esterolak dauzkate (egonkortasun eta zurruntasun handia ematen diete).
- Archaea:
  - Thermoplasma: mintz plasmatiko berezia (monogeruza) aurkezten dute (honek ere egonkortasuna ematen du).

Hauek biak normalean borobilak dira, hormarik ez dutenez ez duelako forma determinaturik hartzen. Gainera, hormaren funtzioa babesa denez, hauek hori gabe gelditzen dira. Ondorioz, mintz plasmatiko bereziak garatzen dituzte, esterolekin (beste prokariotoek ez dituzte) eta beste molekula bereziekin.

Adibidez, thermoplasmen mintz plasmatikoa ez da bigeruza, monogeruza baizik, eta askoz ere egonkorragoa da beste bigeruza asko baino.



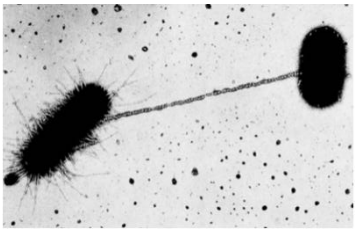
5. Luzakinak



Finbriak:

- Bakterio gram(+) eta gram (-)
- Luzakin motzak, meheak eta zuzenak
- Ugariak izan daitezke: mila baino gehiago zelulako.
- Azaleran zehar uniformeki banatuta.
- **Pilina** proteinaz osatuak
- Funtzioa (gaur egun arte, badirudite itsasgarritasunarekin lotuta daudela)
  - Azalerei lotzeko: bai ingurune natural batean, baita ere patogenoak direnean ostalariari itsasteko.
  - Biofilmen sorrera: (Biofilma: ingurune urtar naturaletan sortzen diren egitura makroskopikoak, mikroorganismoz osatuak). Nola? Material baten gainean itsatsita gelditzen dira mikroorganismoak, elikagai ugari dagoelako edo beste edozein arrazoirengatik, eta hazten doaz zelulak, ugaltzen, eta beste zelula gehiago itsasten, Azkenik, material biskotsuz osatutako makroegituraksortzen dira.
  - Ostalariaren ehuna ezagutzen dute, eta ondoren entzimen bidez sartzen dira

Ileak:



- Gram(-) batzuengan
- Finbriak baino luzeagoak eta loditsuagoak dira
- Kopuru txikiagoan, 1-10ile/zelula (normalean 1 edo 2)
- **Pilina** proteinaz osatuta
- Sintesia plasmidokonjugatzaileek eragiten dute, hauen bidez erregulatuta dago. (Plasmidoa: DNA txiki zirkularra, informazio berezi bat kodifikatuta duena, adib. Antibiotikoekiko erresistentzia)
- Funtzioa
  - Konjugaziorako beharrezkoak, bi zelula lotuz eta iletik materialen transferentzia burutuz (kasu honetan plasmidokonjugatzailea transferituz).
    Plasmidokonjugatzailea transferitzen badu, une horretan beste zelula ere ileak sortzeko gai bihurtzen da.
    - Zelula emailea
    - Zelula hartzailea
  - Ostalariaren ehunei lotura, kontaktua hasteko eta bertan finkatzeko.
  - Astinketa-mugimenduarekin erlazionatuak. Mugikorrak izanda, mekanismo ezberdinak daude horretarako, horietako bat ileak dira.

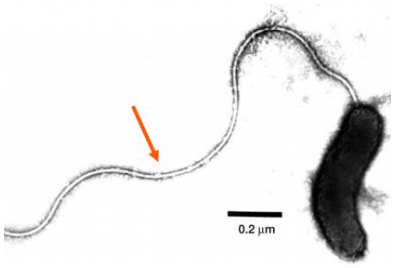
Flageloak:

Hau atal berezi batean ikusiko dugu.

6. Flageloak

Firua bezalakoa da, finbriak baino luzeagoa eta lodiagoa. Egitura zurrun eta mehea osatzen du (lodiera = 20nm, luzera = 15-50µm). Mintz plasmatikotik irteten da (horma zeharkatuz) eta beraien banaketa ezaugarri taxonomikoa da.

Bakterioen flageloaren egitura orokorra:



Bakterioena erabiliko dugu archeoena ez baitakigu oso zehatz.

- GRAM NEGATIBOENA

3 atal ditu: (irudikoaEscherichiaColinera da)

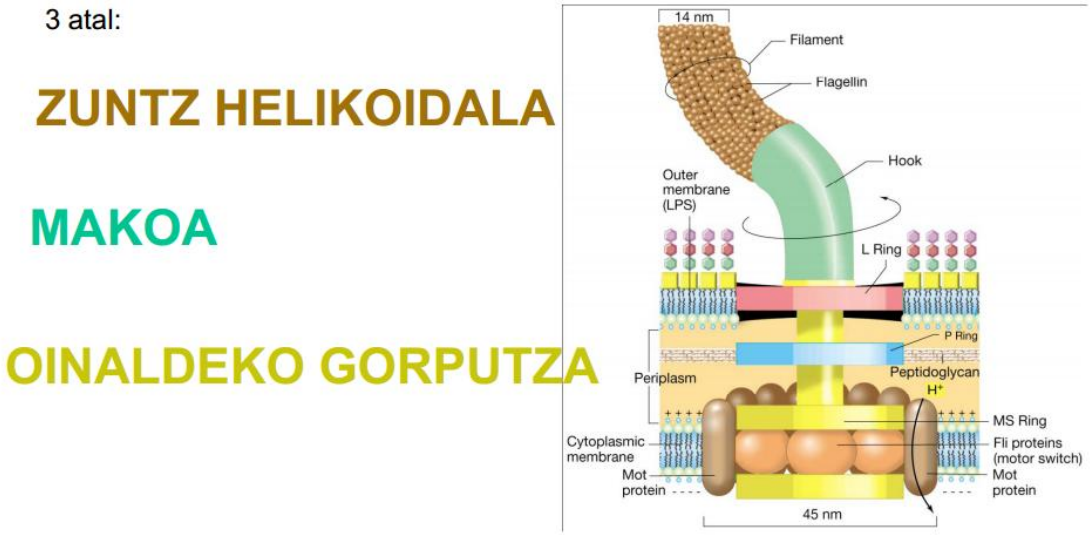
- Oinaldeko zuntza: mintz plasmatikoan eta kanpo mintzean fixatuta, mintz plasmatikoaren gainalderarte.
- Makoa: mintz plasmatikoaren gainaldean, irudian urdinez.
- Zuntz helikoidala: oso luzea da, flagelina eta filamentuz osatua.

Zuntz helikoidala: Biratzen den atala da, zilindro itxurako egitura hutsa, lodiera konstantea duena (15nm gutxi gora behera). Konposaketaz, monomero bakoitza **flagelina** proteina da. Hau makoarekin lotuta dago.

Makoa: zuntza baino pixka bat lodiagoa. Luzeraz, 45-100nm bitartean ditu. Egitura helikoidala da, proteinez osatua. Beste bi atalen arteko lotura gisa jokatzen du.

Oinaldeko zuntza: Zeulan sartuta dagoen atala da, flageloaren motorea. Hiru atalez osatuta dago:

- *Eraztun sistema*: hainbat eraztun dira mintz plasmatikoan, kanpo mintzean eta peptidoglikano geruzan sartuta daudenak. Honela zelularen azaleran ongi finkatuta gelditzen da.
- *Erdiko zilindroa*: errotorea bezalakoa da, birak ematen dituen zatia, kanpokoa mugi dadin. Biraketa hau eragiteko energia erabili behar du.
- *Proteinak*: erdiko zilindroari energia ematen inplikatuta daude.

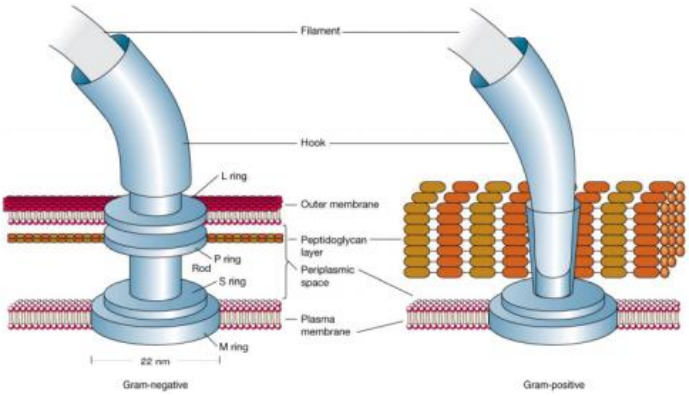


Gram - eta Gram +

- GRAM POSITIBOENA

Hainbat desberdintasun ditu, mintzen egitura ezberdina delako. Honengatik, eraztun gutxiago ditu Gram positiboen flageloak, baina hala ere, oinarrian, mantentzen da.

Mugimendua gertatzeko ezinbesteko eraztunak S eta M dira, horiek biak dituzte, baina Gram (-)ek gainera L eta P dituzte (lipopoolisakarido eta peptidoglikano mailan).

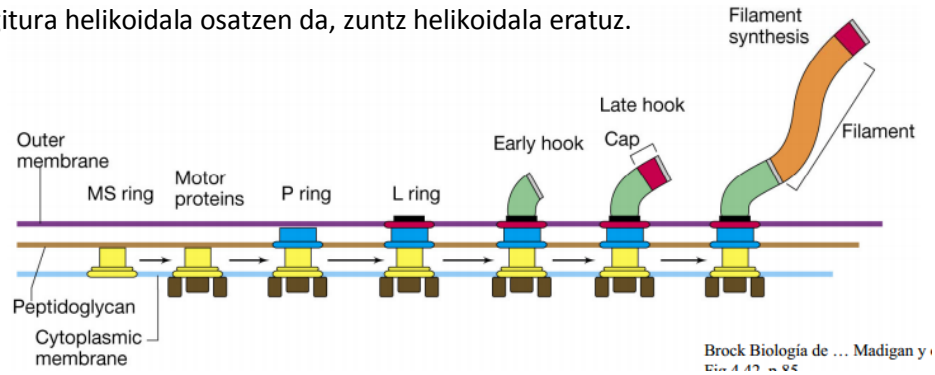


Bakterioen flageloaren sintesia:

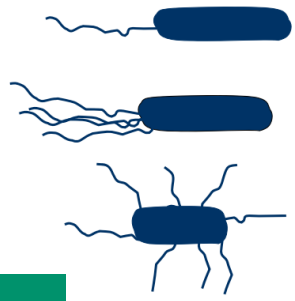
30 genek hartzen dute parte flageloaren sintesian:

- Flageloaren osagaiak kodifikatzen dituztenak
- Mintz plasmatikoan zeharkatzeko garraioa kodifikatzen dutenak

Flagelo bat sintetizatzen denean, lehenik eta behin mintz plasmatikoaren gainean oinaldeko gorputza eratzen da. Errotorea, lehenengo bi eraztunak, beheko proteinak energia lortzeko eta ondoren 3 eta 4. eraztunak ere bai. Jarraian proteina gehiagoz makoa eratzen da eta flagelinari esker egitura helikoidala osatzen da, zuntz helikoidala eratuz.



Flageloen banaketa:



- Polarra: zelula mutur batean edo bietan
- Lofotrikoa: flagelo sorta bat zelularen mutur batean edo bietan
- Peritrikoa: Azalera osoan zehar daude

Archaea-en flageloa:

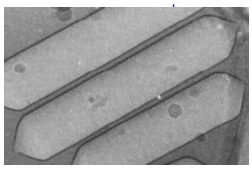
Kontzeptua	Bacteria	Archaea
Flageloen kopurua, mugimendu mota	**≥1 Mugimendu independientea**	**1 /kiribila Mugimendu sinkronizatua**
Lodiera	**Loditsua, barneko kanala sintesirako eta muntadurarako**	**Mehea**
Sintesia	**Flagelina unitateak muturretik muntatzen dira**	**Oinarritik muntatzen da flageloa**
Energia iturria	**Protoien gradientea**	**ATP**

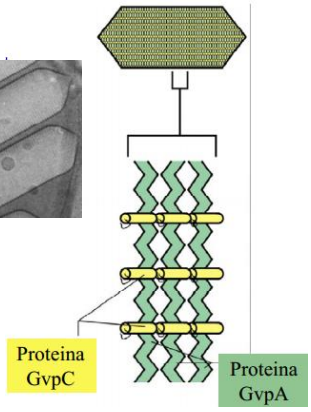
7. Mugimendua

Prokariotoen mugimendua:

- Batzuk mugiezinak
- Beste batzuk mugikorrak
    - Ingurune likidoan
        - Zutabe bertikalean, **gasezko bakuolo**-en bidez (gora edo behera)
        - Edonorantz, **flagelo**-en bidez edo **firuaxial**-en bidez (espiroketak)
    - Azalera solidoaren gainetik, **irristadura**-ren bidez

Gasezko bakuoloak: egitura txikiak dira, prokariotoen zitoplasman sartuak.





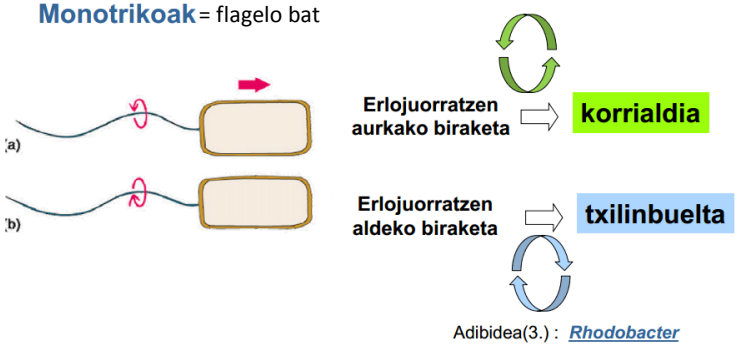
- Egitura zilindrikoak
- Geruza bakarreko mintz batez inguratuta
    - 2 proteina mota
        - Aminoazido hidrofoboak barnerantz
        - Aminoazido hidrofiloak kanporantz
    - Likidoekiko iragazgaitza
    - Gasekiko iragazkorra
        - *Azken bi hauek proteinen egiturari esker dira.
- Eratu ahala, gasez betetzen dira, zitoplasman dauden gasak ere batuz. Bakuoloak metatzen badira: flotagarritasuna.
- Gorantz eta beherantz mugitzeko ur zutabe batean oso lagungarriak dira, izan ere, gorantz joateko beharra dagoenean bakuolo metaketa egiten da eta flotagarri bihurtzen dira, eta beherantz joateko beharra dagoenean gasa ihes egiten uztea besterik ez da bear.
- Prokarioto urtar askoren artean
    - Archea-en artean
    - Bakterioen artean

Flageloen bidezko mugimendua:

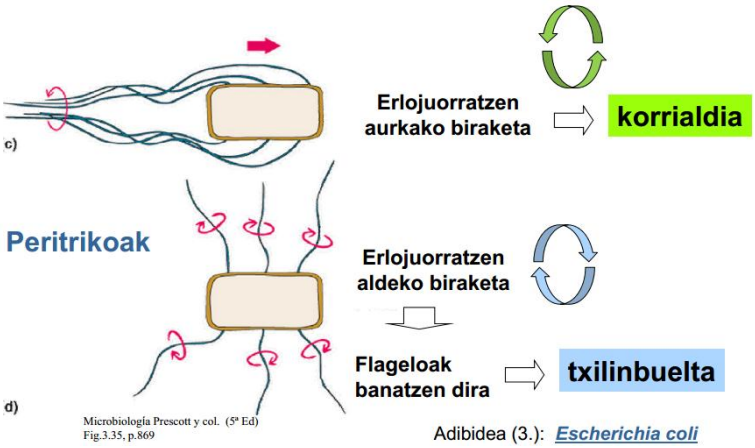
- Biraketa oinaldeko gorputzean sortzen da
    - Fli proteinek biraketaren norabidea zuzentzen dute
    - Mot proteinak mintz plasmatikoan zehar dagoen protoi gradientea energia mugimendua bihurtzen du
    - Biraketa bat = 1000 protoi sartu
- Azken finean biraketaren funtsa energia garraioa da. Protoien gradientea mintz plasmatikoaren eta kanpo mintzaren artean egongo da.
- Lortutako abiadura: 20-90mikrom/segunduko (hau ez jakin). Konparatuz gero zelularen luzera (2mikrom), zelula batek bere luzera 10 aldiz mugituko luke segunduko.

Flageloen bidezko mugimendu motak

- Flagelo bat:
  - Korrialdia: erloju orratzen aurkako biraketa.
  - Txilinbuelta: erloju orratzen aldeko biraketa.



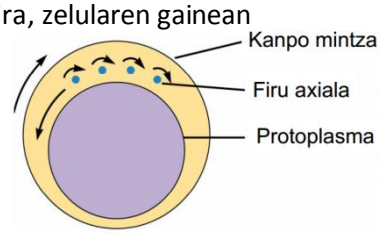
- Flagelo bat baino gehiago: flagelo bakoitzaren mugimendua independentea da, baina mugimendu bat baino gehiago gertatzen dira, aurreko biak lor daitezkeelarik. Ikus irudiak.



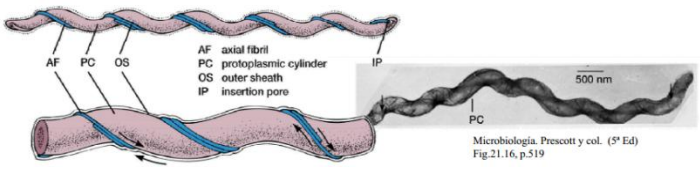
<u>Firu axiala:</u>

Bakterio espiroketoetan. Flagelo moduko bat da, zelula inguratzen duena eta bere mugimenduaren bidez bai zelularen mugimendua zein desplazamendua eragiten du. Flagelo hau mintz plasmatikoaren azpian baina periplasmaren gainean dago, eta flagelo bat edo gehiagoz egon daiteke osatuta = egitura Zuntz axiala edo firu-axiala

- 2-100 flagelo periplasmatikoz osatuta (zuntz axialak)
- Baziloaren bi muturretatik irteten dira, eta erdian biak topatzen dira, zelularen gainean biribilduz (endoflageloak)
- Firu axialak periplasman daude
- Gorputza eta firua kanpo mintzaz inguraturik daude (**kanpo azala**)



Mugimendua (teoria, oraindik ez dakigu ea egia den edo ez):
Flageloak biratu egiten dira alde baterantz, eta mugimendu honen eraginez protoplasmak beste alderantz biratzen du. Honako bi mugimendu hauek gertatzean, zelula sakakortxoa bezala mugitzen da.

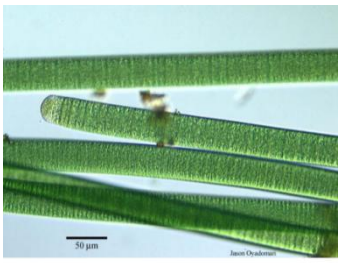


Irristadura-ren bidezko mugimendua:

Bacteria domeinuan maiz. Prokarioto zelulabakarrak edo firukariak, adib: zianobakterio batzuk, mixobakterioak, cytophagales, mikoplasmabatzuk… Hauetan mugimendu mota hau ageri da baina berau burutzeko mekanismo oso ezberdinak izan ditzazkete.

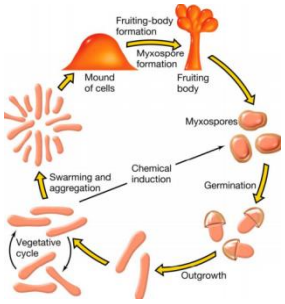
- Lortutako abiadura: 0,02-10mikrom/seg, astiroago.
- Beti azalera solido baten gainetik
- Energia behar du: protoien gradientea
- Zelulek ez dute egitura berezirik erakusten: material mukitsua ekoizten dute kontakturako

Zianobakterioak (izena gogoratu):



Oscillatoria

- Polisakaridoak ekoizten dituzte, hauek beharrezkoak dira mugimendua gertatzeko
- Konposatu mukitsu hauek substratua eta zelularen azalera kontaktuan jartzen dituzte
- Zelula mugitzen da (mekanismoa ez dugu ezagutzen)

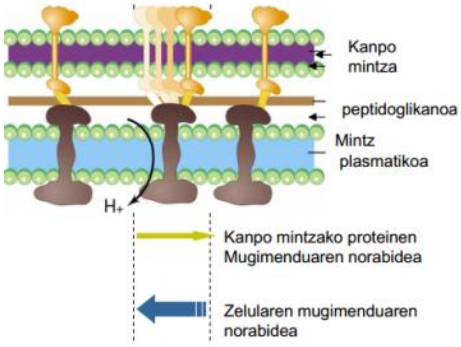


Myxococcus: (hau ez dugu ikasi beharrik, soilik izena gogoratu)

- Fimbriak: zelulabakarrak direnean
- Kanpo mintzaren LPSa: zelulak taldekatzen direnean, soilik etapa batzuetan gertatzen da irristadura

Cytophagales: (honen mekanismuabeakbeeztau ondo ulerketanasik sin+)

- 2 proteina sistema berezi elkar lotuta:
  - Mintz plasmatikoan tartekatuta
  - Kanpo mintzean tartekatuta
- Protoien gradienteak sortutako energiaren bidez mintz plasmatikoaren proteinak mugitzen dira
- Mugimendua kanpoko mintzeko proteinetara heltzen da

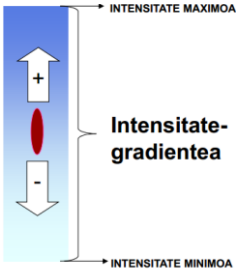


Taxiak:

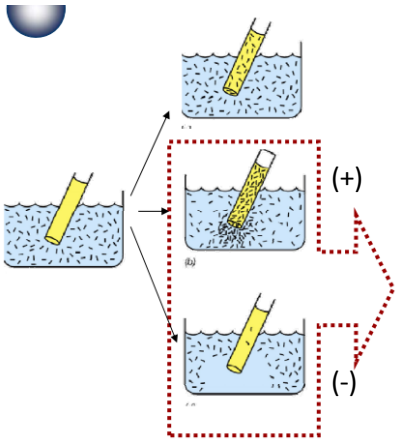
Ingurunean gradiente fisiko-kimiko asko daude: oxigenoa, sulfhidikoa, gatzak, elikagaiak, argia, presioa… Faktore hauen intentsitate egokienetara mugitzen dira askotan bakterioak.

Taxia: gradiente baten aurrean prokariotoek emandako mugimendua. 2 mota:

1. Positiboa (+): kinadarantz mugitu
2. Negatiboa (-): kinadatik aldendu



Taxia guztien artean, ongien ezagutzen ditugunak **kimiotaxiak** dira. Hauek kinada kimikoari erantzuteko egindako mugimenduak dira. Horrez gain, kimioefektoreak ere badaude, hau da, kinada kimikoak, erakargarriak edo uxagarriak izan daitezkeenak.Kimioefektoreak ezagutzeko kimiohartzaileak erabiltzen dira.



Nola zuzentzen dute mugimendua prokariotoek?

Nola dakite norantz mugitu?

Esperimentua: jakiteko ea kimiotaxia gertatzen den edo ez

1. Mikroorganismo isolatuaren kultiboa lortu
2. Likido neutro batean eseki
3. Gure kimioefektorearen disoluzio bat prestatu
4. Soluzio hau gure bakterioen esekiduran jarri
    a. *Argi, froga hau egiteko esekiduran disoluzioaren kontzentrazioa oso baxua edo zero izan behar da eta gure disoluzioa nahiko kontzentratua izan behar da.
5. Honela kimioefektorearen gradiente bat sortuko da, ondorioz, denbora bat itxaron ondoren emaitzak begiratuko dira.

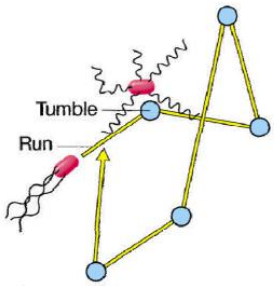
Emaitza posibleak (irudia):

a) Axolagabetasuna: mikroorganismoen hedapena homogeneoa izango da, ondorioz, ez du eraginik.
b) Erakargarrirantz hurbildu: mikroorganismo dentsitate altua saiodian. Ondorioa: kimioefektore (+)
c) Uxagarritik urrundu: kimioefektore/taxia? (-)

Nola zuzentzen dute mugimendua prokariotoek?

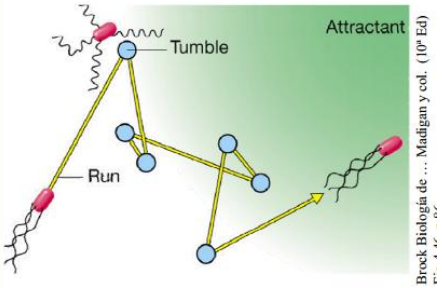
GRADIENTERIK GABE

- Korrialdiak aurrerantz, iraupena konstantea
- Txilinbueltak: maiztasuna konstantea
- **ZORIZKO MUGIMENDUA**

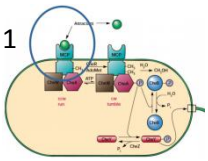


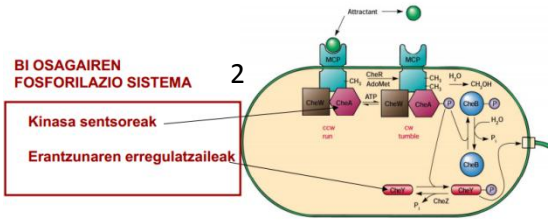
KINADA POSITIBO GRADIENTEAN

- Korrialdiak luzeagoak
- Txilinbuelta gutxiago
- **MUGIMENDU NETO ZUZENDUA**

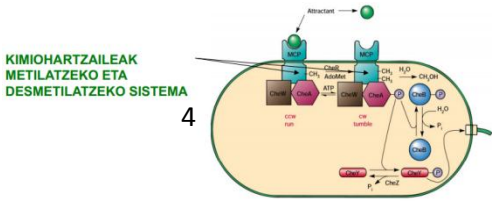


Nola dakite norantz mugitu?

1 

2 

1. Zelulek kimioefektoreak detektatzeko kimiohartzaileak behar dituzte.
2. Mugimendua zuzendu behar dute: erregulazio sistema.
3. Mekanismoa:
    a. Korrialdiak: molekula bat zelula kanpoan jartzen da, transmintz proteina bati eraginez, honek zitoplasmako hainbat molekula fosforilatuz eta flageloari eraginez.
    b. Txilinbueltak: kasu honetan ez dagoenez molekularik lotzeko, ez da ezer fosforilatzen.
4. Kinadaren intentsitatearen aldaketa detektatzeko sistema behar dute: OROIMEN IRAGANKORRA



Kimiotaxia ikusi dugu baina badaude **beste taxia mota batzuk** ere:

Taxia mota	Ezaugarriak
FOTOTAXIA	Argi-intentsitarearekiko emandako erantzuna Bakterio fotosintetikoetan
AEROTAXIA	Oxigeno kontzentrazioekiko erantzuna
pH-TAXIA	Baldintza azido ado alkalinoekiko erantzuna
MAGNETOTAXIA	Lerro elektromagnetikoekiko erantzuna Gorantz edo beherantz mugitzen dira zelulak Magnetosomen bidezkoa

Magnetosomak: bakterio urtar mikroaerofilo edo anaerobioetan. Geruza bakarreko mintz batez inguratuta (lipidoak + proteinak) daude. Barruan magnetita dute (Fe_3O_4). Zelula ilaran jarrita agertzen da eta erabiliak dira eremu magnetikoetan orientatzeko.

Hala ere, garrantzitsuenak kimiotaxia eta fototaxia dira.

8. Mintz plasmatikoa

Zer da mintz plasmatikoa?

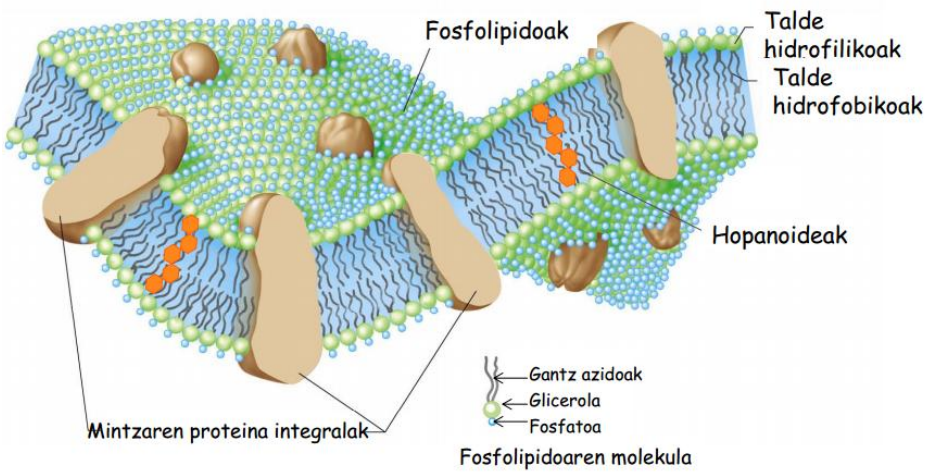
- Mintz unitarioa, 8nmtako bigeruzalipidiko batez osatutakoa
- Zelularen barnekoa ingurutik banatzen duen hesi hautagarria
- Prokariotoen osagai aldaezina: bizitzarako ezinbestekoa

Mintz plasmatikoaren konposaketa kimiko orokorra: beti daude proteinak

BACTERIA	EUCARYA	ARCHAEA
FOSFOLIPIDOAK	FOSFOLIPIDOAK	LIPIDOAK
PROTEINAK	PROTEINAK	PROTEINAK
HOPANOIDEAK	ESTEROLAK	----

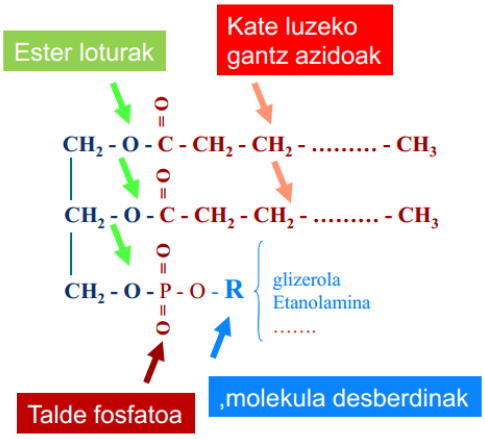
Bakterioen mintz plasmatikoaren egitura: Mosaiko fluidoa

- Egitura orokorra: bigeruzalipidikoa
- Molekula ugarienak: Fosfolipidoak
- Hauengan sartuta: proteina mota asko/desberdinak.
- Bakterioen kasuan noizbehinka hopanoideak ageriko dira sartuta.
- Fosfolipidoen geruza hau ez da batere zurruna, fluidoa baizik. Honengatik, berarengan sartutako proteinak etab. flotatzen bezala daudela imaginatu behar dugu.

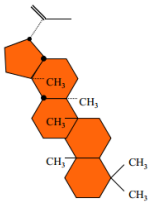


Bakterioen mintz plasmatikoaren konposaketa:

- <u>Fosfolipidoak</u>: kanpo zonaldea hidrofiloa eta barnekoa hidrofoboa egitea ahalbidetzen dute. Hauen egituraren oinarria glizerol molekula da.
    - *Zonalde hidrofiloa*: 3. Karbonoari ester loturaren bidez fosfatoa dago lotuta, eta honi loturik glizerola, etanolamida, edo beste molekularen bat egon daiteke.
    - *Zonalde hidrofoboa*: 1 eta 2. Karbonoari ordea ester loturaren bidez kate luzeko gantz azidoak daude loturik.



- Proteinak: oso garrantzitsuak dira ikuspuntu kuantitatibotik, mintzaren pisu lehorraren %70 proteinak dira (>200 mota desberdin). Funtzioa anitzekoak daude.
    - Batzuk kanporantz edo barnerantz begira: proteina periferikoak
    - Batzuk bigeruzan sartuta: proteina integralak



Diplopteno

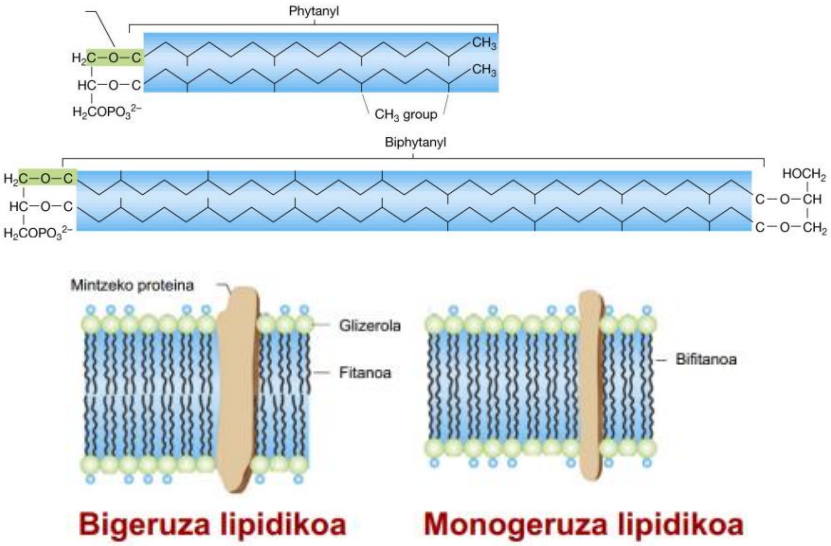
- Hopanoideak: zelula eukariotoetan askotan esterol ezberdinak aurkituko ditugu mintzari egonkortasuna ematen. Bakterioen kasuan ordea, hopanoideak ematen diote funtzio hori.
    - Nahiko **hidrofoboak** dira: zona hidrofobikoan kokaturik daude
    - **Egonkortzaileak**
- **ARGI!! Mycoplasma salbuespena da, ez du hopanoiderik. Izan ere,horma zelular gabeko mikroorganismo patogenoak dira, eta beraien egitura egonkortzeko animalietako esterolak erabiltzen dituzte (hau ziurrenik animalien patogenoak direlako da).

Arkeoen mintz plasmatikoa: konposaketa

Lipido mota ugarienak ez dira fosfolipidoak! 3 desberdintasun daude:

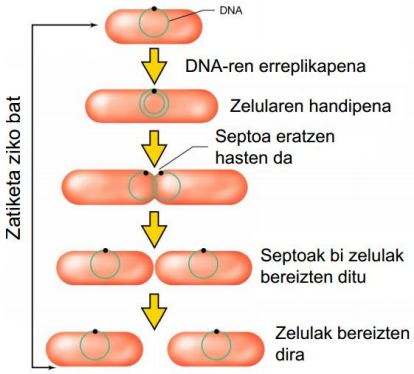
1. Batzuetan fosfato taldea agertu daiteke lipidoekin lotuta baina beste batzuetan ez.
2. Gainera oinarrizko molekula glizerola den arren, glizerola lipidoekin lotuta dago eter loturen bidez, eta ez ester. Ondorioz, molekula hauen ezaugarri kimikoak fosfolipidoen aldean desberdinak dira.
3. Azken desberdintasuna, lipido hauek kate isoprenoideak direla izango da, 5Cz osatutako kate luzeak. Ondorioz, hainbat isoprenorekin eratutako kate isoprenoideak izango dira.
4. Horrez gain:
    a. Glizerolarendieterra: sortzen diren egiturek batzuetan zonalde hidrofoboa eta besteetan zonalde hidrofiloa izan dezakete
    b. Di-glizerolarentetraeterra: bi zonalde hidrofilo eta erdikoa hidrofoboa izan ditzakete. Azken egitura hau soilik arkeoetan ikusi izan da.

Ondorioz, **monogeruzalipidikoa** duela esaten dugunean, di-glizeroltetraeterrez osaturiko geruza da. **Bigeruzalipidikoa** ordea, glizeroldieterrarekin osatzen dena da. Lehenengoa egonkorragoa da. Arkeo batzuetan biak ere ager daitezke.



Bacteria: Bigeruza	*Archaea*: Monogeruza/bigeruza
Fosfolipidoak: • Glizerola 3P • Gantz azidoak • Ester loturak Proteinak • Hopanoideak	Lipidoak: • GlizerolaP • Kate isoprenoideak • Eter loturak Proteinak

Mintz plasmatikoaren (orokorrean) funtzioak:



- Material genetikoaren errepikapenean zeregina du:
  - Material genetikoa zitoplasman aske dago, baina erreplikazioa mintz plasmatikoari lotuta gertatzen da. Horrez gain, aldi berean zelula hazi egiten da (biomasa gehitu) eta ondoren zelula zatitu egingo da. Zatiketa gertatzen denean ere loturik dago DNA mintzera.
- Zelularen gune metaboliko garrantzitsuena
  - Elektroi garraio kateak: arnasketan, fotosintesian… inplikatuta egongo da eta honi esker zelulak energia lortuko du. Elektroi garraio kate honek protoiak ponpatzen ditu. Mintz plasmatikoa protoiekiko iragazkaitza da. Honi esker, mintz plasmatikoan zehar protoi gradientea, pH gradientea eta potentzial elektrikoa sortzen da. Honela mintza energizatzen da, eta indar protoi-motriza eratzen da.

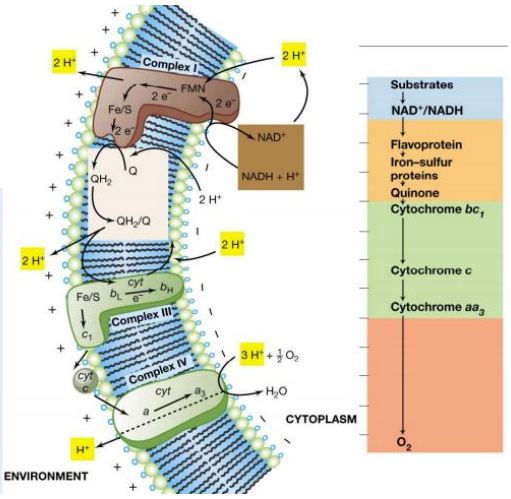
Adibidea:
Elektroi garraio katea, azken hartzailetzat oxigenoa duena

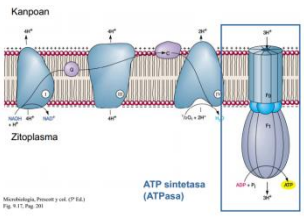
Mintz plasmatikoa H^+ -ei iragazkaitza

Mintz plasmatikoan zehar:
protoien gradientea
pH-aren gradientea
potentzial elektriko

Mintza energizatzen da

INDAR PROTOI-MOTRIZA





  - ATPa sintetizatzeko tresneria: ATPasak mintz plasmatikoan sartuta daude eta protoien gradientea erabiliz ATP sintetizatuko dute.
  - Pigmentu fotosintetikoak: mintz plasmatikoan sartuta
  - Entzima biosintetikoak: mintz plasmatikoan sartuta
- Iragazkortasun hautagarria duen hesia
  - Garraio mekanismoak: zelulak elikagaiak kanpotik hartu eta hondakinak kanporatu

Mintz plasmatikoaren hesi hautagarria (iragazkortasun hautagarria): garraio mekanismoak

Zelula prokariotoak:
- Elikagaiak kanpotik hartzen ditu
- Metabolismoaren hondakinak kanporatzen ditu

Baina:
1. Mintz plasmatikoa <u>bigeruzalipidikoa</u> da
2. <u>Mintzaren barneko zonaldea hidrofobikoa da:</u> molekulen kargak eta tamainak molekulen garraioa oztopatzen dute.

3. Normalean kanpo-elikagai kontzentrazioa zitoplasmarena baino txikiagoa da: garraioa askotan gradientearen kontrakoa izan behar da

Arazo hauek eta garraio zailak errazteko mintzak mekanismo ezberdinak ditu.

Garraio motak:

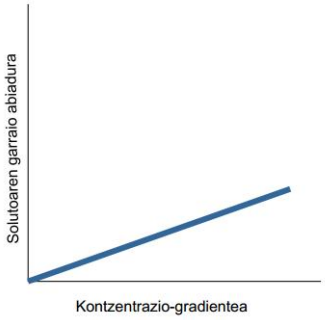
- Energia gastu gabekoak:
  - Garraio pasiboa
    - Difusio geldoa
    - Difusio lagundua
- Energiaren menpekoak
  - Garraio aktiboa
    - Ioien gradientearen menpeko sistema
      - Uniportea
      - Sinportea
      - Antiportea
    - Lotura-proteinen menpeko sistema
  - Talde translokazioa

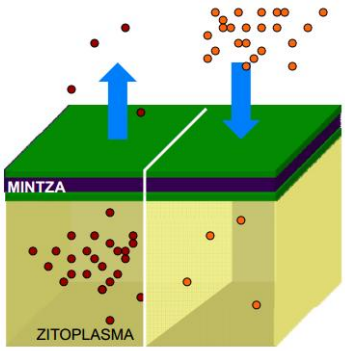
Difusio geldoa: gradientearen aldekoa da BETI (prozesu fisiko bat). Arazorik gabe zeharkatzen duten molekulak, bai kanporantz eta bai barrurantz.

Elikagaiak:

- Karga elektriko gabeko molekula txikiak:
  - Ura, oxigenoa, karbono dioxidoa
- Molekula txiki liposolugarriak:
  - Gantz azidoak, alkoholak, bentzenoa…

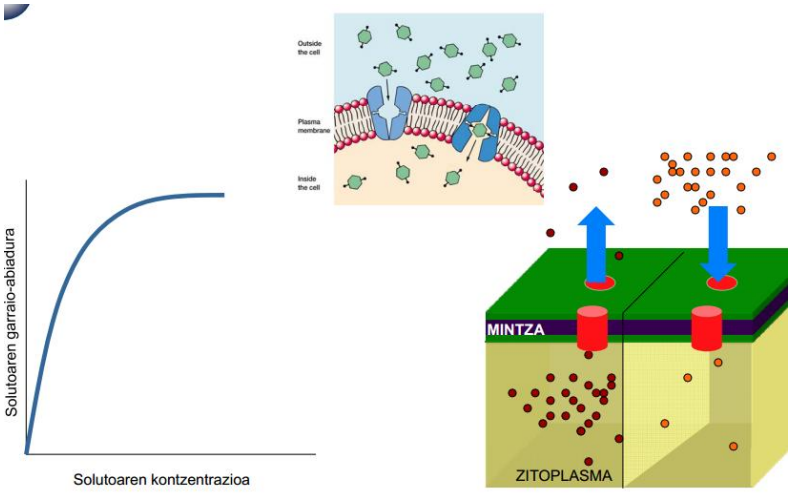
Prozesuaren zinetika:
Garraio zinetika lineala du, hau da, kontzentrazio-gradientea (ezberdintasuna) txikia bada, solutuaren garraio abiadura ere txikia izango da. Handia denean ordea, handia.





Difusio lagunduta: gradientearen aldekoa BETI (energia beharrik ez). Entzimen bidezkoa da, zehazki "permeasek" hartzen dute parte hemen. Substratuarekiko espezifikoak dira hauek.

Prozesuaren zinetika:
Asetze zinetikaren antzekoa da: Solutuaren kontzentrazioa txikia denean, garraio abiadura lineala da eta nahiko azkarra. Solutuaren kontzentrazioa handia denean ordea, permeasakasetu egiten dira eta gehienezko garraio-abiadura maximoa eta konstantea lortzen da.

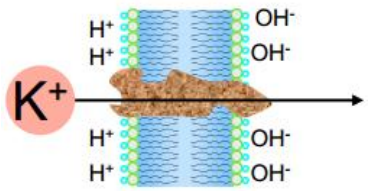


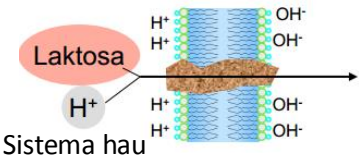
Ioi gradientearen menpeko sistema:

- Sistema honek mintz plasmatikoan zehar dagoen PROTOIEN GRADIENTEA behar du energia lortzeko
- Nola lortzen da protoien gradientea?
    - Elektroi garraio katearen bidez
        - Arnasketa
        - Fotosintesia
    - ATPasaren bidez: batzuetan ATPasakATPa erabiliz protoien gradientea eratzen du. Hau ez da ordea normalean gertatuko dena, izan ere, berez ATP sintasa da molekula hau, hau da, ATPa sintetizatzeko da.
- Zein molekula mota garraiatzen da?
    - Azukre asko
    - Aminoazidoak
    - Ioi ez-organikoak (nitratoa, sulfatoa, …)

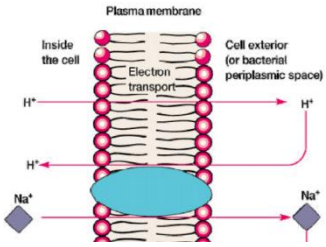
Mota orokorrak:

1. UNIPORTEA: molekula bakar bat norantza batean garraiatzen da. Kanpoko kontzentrazioa oso altua denean, kanpotik barrura gertatzen da garraioa.
    a. Irudiko kasuan, potasioa positiboki kargatuta dago, eta kanpoan orokorrean karga positiboa da. Karga hau beste aldera pasatzean, mintza desenergizatzen da, kargak egonkortu egiten direlako.





2. SINPORTEA: bi molekula desberdinak norantza batean garraiatzen dira. Sistema hau azukre neutroak eta ioi ez-organiko negatiboak sartzeko erabiltzen da (sulfatoa, fosfatoa…).
    a. Irudiko kasuan, protoia pasatzean energia askatzen da, eta energia hori nahikoa da laktosa elikagaia sartzeko, ondorioz, biak garraiatuko dira barnera.
3. ANTIPORTEA: bi molekula desberdinak (karga mota berekoak) bi norantzetan garraiatzen dira.
    a. Irudiko kasuan, elektroi garraio kate baten bidez protoiak ateratzen direla ikusten da. Antiportearen sistemaren bidez, protoi baten sarreraren energia sodio ioi baten kanporatzea burutzeko erabiltzen da.

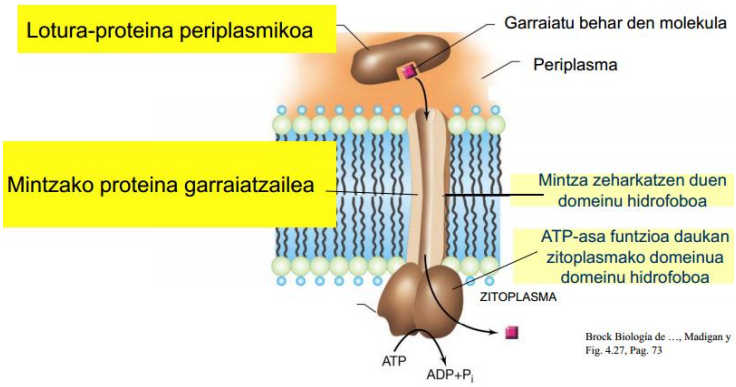


*Argi! Askotan garraio mota ezberdinak akoplatuta daude molekula berezi baten garraioa lortzeko.

<u>Lotura-proteinen menpeko sistema:</u>

Afinitate handiko eta lotura espezifiko baten bidez, proteinei guri interesatzen zaizkigun sustantziak atxikitzen zaizkie, baita kanpoko elikagaien kontzentrazioa oso baxua denean ere. Honela, hainbat sustantzia barnera daitezke.

- Beste izen bat: ABC sistema, ATP BindingCassette
- ATP beharrezkoa da
- Oso afinitate handiko proteina espezifikoak
    - Azukre batzuk, aminoazidoak, gantz azidoak, sulfatoa, fosfatoa, proteinak (kanporatzeko), …
- Prokariotoengan eta eukariotoengan



Sistema honen osagaiak:

1. **Lotura-proteina periplasmikoa**: Hauek dira berehala sustantziak harrapatzen dituztenak eta garraiatu behar diren molekulei lotzen direnak. Hau prozesuaren lehene etapa da.

2. Bigarren etapa molekularen garraioa da, mintzean zehar. Honetarako, **mintzeko proteina garraiatzailea** dago inplikatuta. Honek lotura-proteina periplasmatikotik hartzen du sustantzia eta energiaren bidez egiten du. Beharrezkoa den energia sustratu honen garraioa lortzeko ATP bat hidrolizatuz lortzen du (begiratu marrazkixanbehealdian), ATPasa funtzioa daukan zitoplasmako domeinu hidrofilo baten bidez.

Talde translokazioa:

- Garraiatzen den bitartean, molekularen konposaketa aldatzen da.
    - Honengatik ezin dezakegu esan gradientearen aldeko/kontrako garraioa dela, ez baitago gradienterik.
- Aldaketa kimikoak energia behar du.
- Proteina batzuk behar ditu
- Zein molekula mota garraiatzen da?
    - Azukreak, purinak, pirimidinak, gantz azidoak
- Oso arrunta prokariotoengan, batik bat anaerobioetan.

Nola funtzionatzen duen adibide gisa: E. coli:

5 proteinez osaturiko sistema bati esker egiten da. Proteina motak:

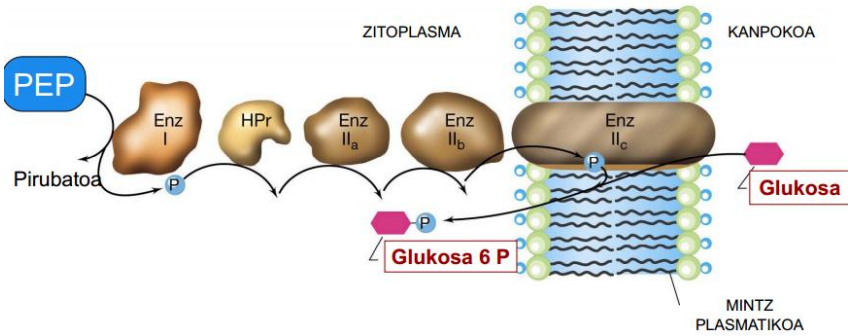
a) OROKORRAK: sustrato askoren garraioan erabiliak, lehen biak.
b) SUSTRATUAREKIKO ESPEZIFIKOAK: Sustratu espezifiko baten garraiorako, azken hirurak.

Horrez gain,

i. Mintzeko proteinak
ii. Proteina askeak

Adibidean: Glukosa sartzen da zitoplasmara. Garraio prozesu honetan glukosa hori fosforilatu egiten da eta glukosa 6P gisa iristen da. Honelako kasuetan energia altuko talde fosfatoa normalean PEP izaten da. Aurretik aipaturiko entzima guztien bidez, PEPek talde fosfatoa ematen dio entzimetako bati eta garraiatua izango da entzimaz entzimahartzailerarte. Ikuspuntu energetikotik sistema honek besteen aldean abantaila handia du, izan ere, energia mantendu egiten da, E altuko konposatu batetik beste batera pasatzen baikara (beste sistemetan normalean galdu).

Escherichia coli: Karbohidratoen garraiatzeko fosfotransferasa sistema



Makromolekulen garraioa:

Makromolekulak:

- Proteinak
- Polisakaridoak
    - Zelulosa, almidoia, glukogenoa…
- Lipidoak

Molekula hauek garraiatzeko prokariotoek barneratu aurretik apurtu egiten dituzte. Honetarako, likido asko badago kanpoan, prokariotoek entzima batzuk eratu eta kanporatu egingo dituzte. 2 mota:

- Entzima extrazelularrak: Zelularen inguruan aske dauden entzima hidrolitikoak.
- Ektoentzimak: Zelulari lotuta egongo diren entzima hidrolitikoak.

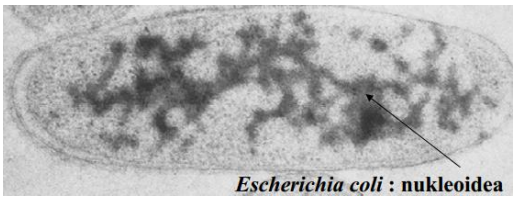
Honela, monomeroak lortzen dituzte eta barneratu ditzakete.

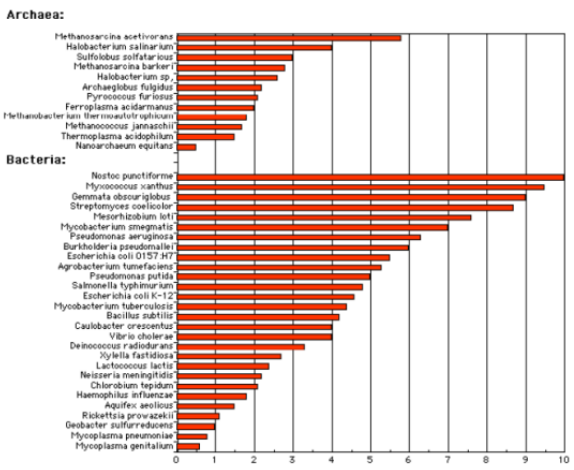
Kromosomaren antolaketa (mintz plasmatikoari lotuta):

Kromosomaren ezaugarriak	PROKARIOTOAK	EUKARIOTOAK
Zenbat	1	2 edo gehiago
Molekula mota	Kate bikoitzeko DNA borobila (salbuespenak daude, batzuk lineala)	Kate bikoitzeko DNA lineala
Beste molekula batzuk	RNA, proteina gutxi, ioiak, poliaminak (Archaean, histonak bezalako proteinak agertzen dira)	Histonak
Informazio genetikoa	Gene osoak	Gene zatituak (introna + exona)
Aldaketa zelularra	Nukleoidea: egitura dentsoa eratuz, baina zitoplasman barreiatuta	Nukleoa

Kromosomak zelula bizitzeko ezinbestekoa den informazio genetikoa eramaten du (ezinbestekoa ez dena ere eraman dezake). Hauetaz aparte, plasmidoak existitzen dira, informazio genetiko gehigarria daramatenak. Ez dira bizitzeko funtsezkoak.

Prokariotoennukleoidea:
DNA kromosomiko tolestuak eratutako egitura da. Gel dentso batean dago, protoplasman.





8. Protoplasma

Prokariotoen protoplasma:

- Mintz plasmatikoaren azpian dagoena
- 2 osagai:
    - Nukleoidea
        - Erribosomak
    - Zitoplasma
        - Zitosola (H_2O, partikulatuta ez dagoena)
        - Zitoplasmako partikulak
            - Gasezko bakuoloak (mugimenduarekin asoziatuta ur zutabetako prokoariotoetan)
            - Klorosomak
            - Tilakoideak (fotosintesiarekin lotuta)
            - Magnetosomak
            - Karboxisomak

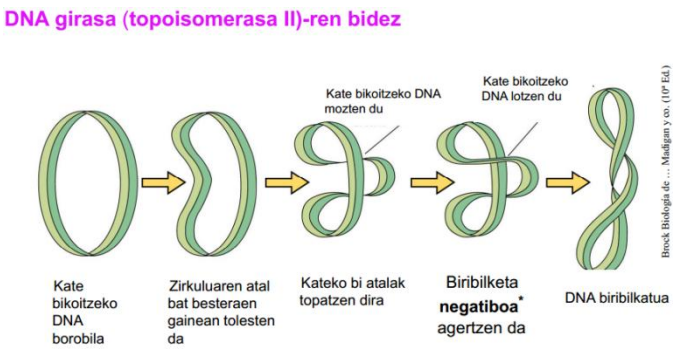
<u>Prokariotoennukleoidea: egitura</u>

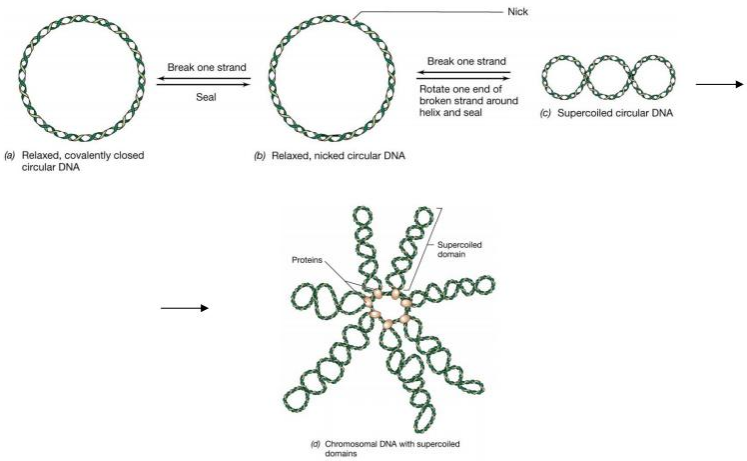
Aurreko grafikoan tendentzia bezalako bat ikus daiteke genoma handidunak aske bizi direna eta txikiagoak dutenak patogenoak direla. Baina ez da ziurra.

Kromosomen tamainua:
Prokariotoaren kromosoma: 1mm-ko luzera. Prokariotoarentamainua: 2-3µm-ko luzera. Ondorioz, kromosmoa tolestu eta kiribildu egin behar da. Honetarako, *DNA girasa (topoisomerasa II)* erabiltzen da.

Toleste prozesua (*DNA girasa (topoisomerasa II)-ren erabilera*):

1. Kate bikoitzeko DNA borobila
2. Zirkuluaren atal bat bestearen gainean tolesten da
3. Kateko bi atalak topatzen dira *(kate bikoitzeko DNA mozten du)*
4. Biribilketa **negatiboa*** agertzen da *(kate bikoitzeko DNA lotzen du)*
5. DNA biribilkatua





Prozesuan sortzen diren egiturak eta bukaerakoa mantentzeko, karga elektrostatikoak erabiltzen dira:

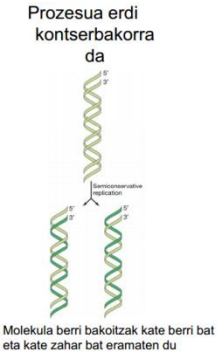
Bacteria:

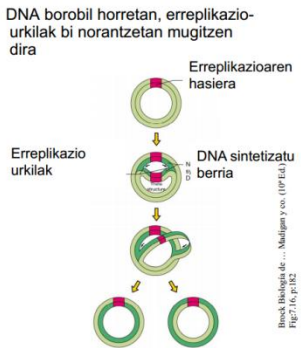
- Poliaminak: espermia…
- Ioiak: Mg^{2+}…
- Pisu molekular txikiko proteina basikoak (DNAri lotzeko eta superkiribilak mantentzeko)

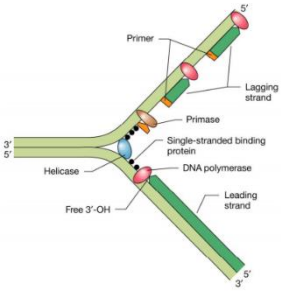
Archaea:

- …

Toleste prozesu honen ondorioz, nukleoideak egitura bereziak hartzen ditu.







DNA-ren erreplikazioa

Prozesua erdi kontserbakorra da, molekula berri bakoitzak kate berri bat eta kate zahar bat eramaten du.
DNA borobilean erreplikazio urkilak bi norantzatan mugitzen dira.

Prozesua:

1. DNA molekula deskiribilkatzen da eta bi kateak mozten dira
2. DNAren bi kateak erreplikatzen dira
3. Atzeratutako katearen zati berriak lotzen dira

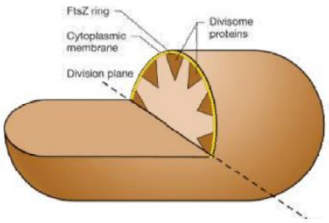
Parte hartzen duten mintz plasmatikoko proteinak: helikasak, DNA girasak, DNA polimerasak, primasak, DNA ligasak…

Nola banatzen da erreplikatutako material genetikoa zelula-semeen artean?*(24. or. goiko irud)*

DNAren erreplikazioa mintz plasmatikoan ematen da. Jarraian, zelularen handipena gertatzen da, eta septoa eratzen hasten da. Septoa bi DNAk banantzen hastea da, eta horrez gain, pareta peptidoglikano bat eratzea bien artean. Septoak bi zelulak bereizten ditu azkenean egitura bitan guztiz bananduz.

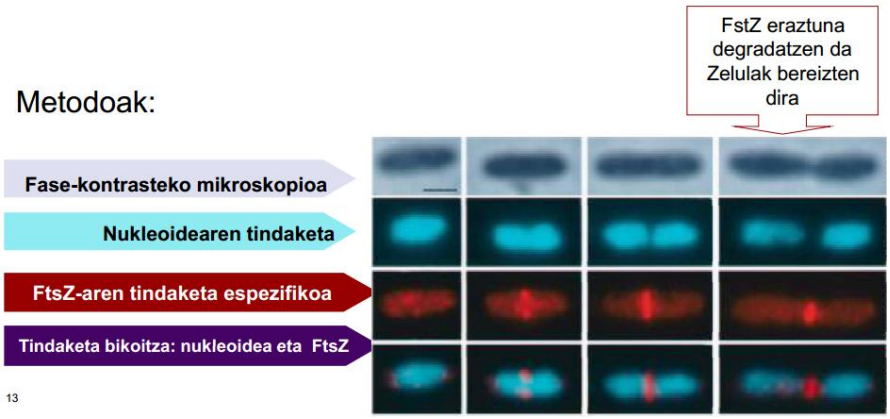
Septoa: zelularen erdiko zonaldean prozesu berezia ematen da, izen honekin deitua. Prozesu honetan, dibisoma eratzen da DNAren erreplikazioa eman ondoren. Hau sortzeko FTS proteinek hartzen dute parte. FTS motak:

- FtsZ eraztuna: polimerizatu egiten da mintz plasmatikoaren azpian (eraztuna eratuko du). Honetarako energia behar da, eta hau GTPasa erabiliz lortzen da. Polimerizatuta geratuko da, honetarako energia behar delarik. FTSA bidez lortzen da energia hau (ATPasafutnzioa du)
- FtsA: ATPasa funtzioa
- ZIP A



Laburbilduz: zelula banantzeko, nukleoidea banatzen hasten den unean ftsZ eraztuna osatzen da, eta zelula bitan zatitu behar den unean degradatua da.

FtsZ PROTEINEZ OSATUTAKO ERAZTUNA *E. coli* BAKTERIOENGAN



<u>Plasmidoak:</u>

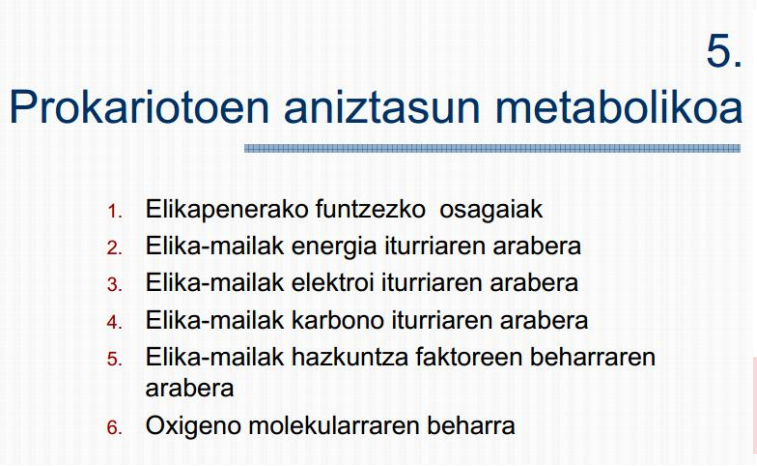
- Bizitzeko ezinbestekoa ez den elementu genetikoa da. Modu batean esateko, gehigarria da, hobeto bizitzeko baldintza batzuen aurrean balio baitu.
- Kromosomaren kanpokoa
- Kate bikoitzeko DNA borobila
- Maiz prokariotoengan, gutxitan eukariotoengan

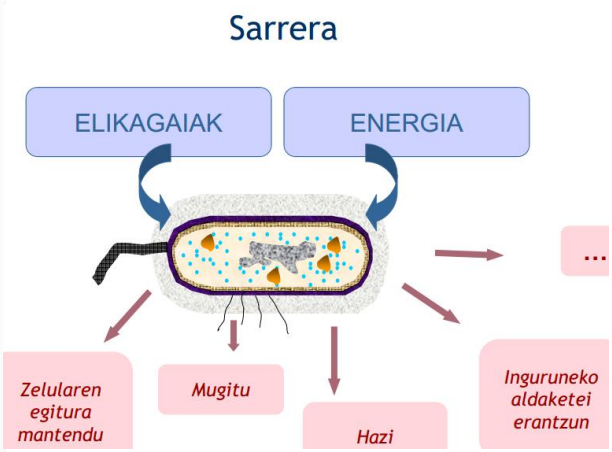
Ezaugarriak:

- Erreplikazioa independentea da
- Plasmido batzuk konjugatiboak dira
    - Bakterio batzuek ileak dauzkate -> ileen bidez zelulen arteko kontaktua ematen da
    - Ile konjugatiboa bada, plasmidoa transferitu daiteke
- Kopien kopurua: plasmidoaren araberakoa da (100, 200…)

Funtzioak:

- Ez da ezagutzen
- Antibiotikoekiko erresistentzia ematea
- Gaitasun entzimatiko batzuk ematea
- Toxinen, proteinen… ekoizpenerako gaitasuna ematea

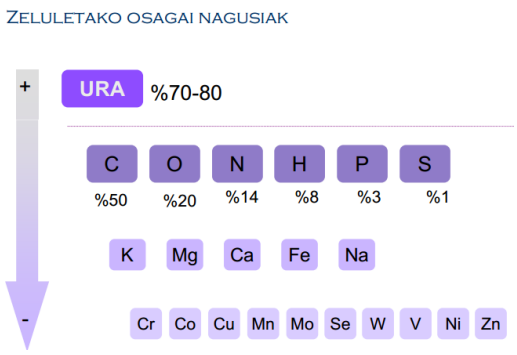




1.Elikapenerako funtsezko osagaiak:

Zeluletako osagai kimiko nagusiak:

- Ura (%70-80): mikroorganismoak bizirik mantentzeko ura jarri behar da.
- Pisu lehorra (gutxi gorabehera %25): ura kenduta gelditzen dena, elikagaiak deitua.
  - Makroelikagaiak: beharrezkoak dira kopuru handitan, gehiengoa (%95) hartzen dute. Kultibo-medioetan gehituko ditugu. Beheko ilarakoak goikoekin konbinatuak agertzen dira askotan, adib. Magnesio sulfatoa
    - C (%50), O (%20), N (%14), H (%8), P (%3), S (%1)
      - K, Mg, Ca, Fe, Na
  - Mikroelikagaiak: beharrezkoak dira baina kopuru txikitan (%5). Aurrekoen ezpurutasun bezala, adib. magnesio sulfatoa badago ez da guztiz purua izango eta manganeso pixka bat izan dezake (kultibo medioan ez dira gehitzen, makroelikagaien artean agertzen dira hautsean):
    - Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Se, W, V, Ni, Zn



Nola agertzen dira elikagaiak?

- Molekula txikitan: CO_2, etab. Txikiak direnez, erabilera zuzena dute, erraz garraiatzen dira eta. (Hau laborategian ematen da, naturan gutxiagotan)
- Makromolekuletan: kanpoko digestioa burutu behar dute mikroorganismoek hauek barneratzeko. Honetarako ektoentzimak (zelularen gainean lotuta geratzen direnak) eta entzima extrazelularrak (kanpora jariatutakoak) erabiltzen dira. Hidrolitikoak dira

entzima hauek. Ondoren, molekula txikitan deskonposatzen direnez, monomero horiek erabilera zuzena dute.

Izaki bizidunek hazteko behar dituzten osagaiak:

- Elikagaiak
- Energia
- (Hazkuntza faktoreak): molekula organikoak ezin badituzte sintetizatu adib.

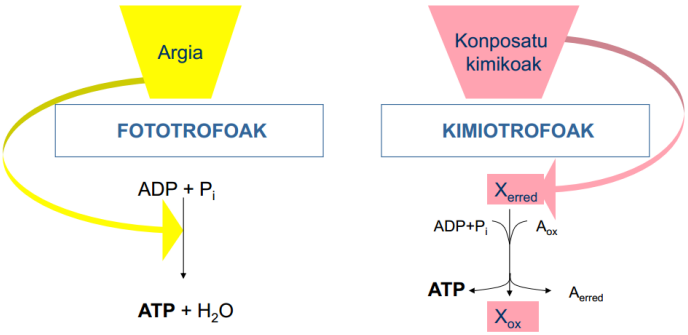
Elika-mailetan sailkatzeko irizpideak

- Energia-iturria
- Elektroi-emailea
- Karbono-iturria
- Hazkuntza-faktoreen beharra

2. Elika-mailak energia iturriaren arabera

Lur planetan **energia iturria eguzkiaren argia** da. Organismo **fototrofoak** arduratzen dira energia hori harrapatu eta erabiltzen, adibidez ADP + Pi -> ATP + H_2O eratzeko. Organismo fototrofo hauek eukariotoak (adib. landareak) zein prokariotoak izan daitezke.

Horrez gain, **energia iturri gisa konposatu kimikoak** ere erabili daitezke. Honetaz organismo **kimiotrofoak** arduratzen dira. Hauek oxidazio/erredukzkio erreakzioen bidez eta beste hainbat erreakzioren bidez, beraien elikagaiak eraldatu ditzakete.



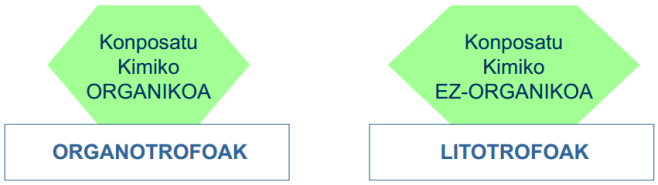
Bi kasuetan gertatzen dena: ENERGIA-ITURRIA -> ENERGIA ZELULARRA.

Prozesu honetan beti dago inplikatuta elektroien garraio sistema bat. e^- garraio sistemarako ezinbestekoa da elektroi emailea den zerbait, kasu honetan energia-iturritik atera beharko litzateke.

- Kimiotrofoetan: askotan zuzenean sustantzia hori da elektroi emailea. Adibidez, glukosa.
- Fototrofoetan: argiak ez du elektroirik ematen, baina molekula edo konplexuren bat elektroiak ematera induzitzen du, duen energiaren bidez. Landareen kasuan adibidez urak ematen du elektroia.

3. Elika-mailak elektroi-emailearen arabera:

- **Organotrofoa**: konposatu kimiko organikoa bada elektroi-emailea.
- **Litotrofoa**: konposatu kimiko ez-organikoa bada elektroi-emailea. Adib. landareen kasua.



KATEGORIA TROFIKOAK	ENERGIA-ITURRIA	ELEKTROI-EMAILEA
FOTOLITOTROFOAK Landareak, algak, prokarioto batzuk	Argia	Konposatu ez-organikoak H_2O, H_2S, S, H_2...
FOTOORGANOTROFOAK Prokarioto batzuk	Argia	Konposatu organikoak
KIMIOLITOTROFOAK Prokarioto batzuk	Konposatu kimikoak	Konposatu ez-organikoak H_2S, S, H_2, Fe^{2+}, NH_4^+, NO_2, CO
KIMIOORGANOTROFOAK Animaliak, protozooak, onddoak, prokarioto gehienak	Konposatu kimikoak	Konposatu organikoak

4. Elika-mailak karbono-iturriaren arabera:

Karbono iturriaren arabera, bi organismo mota sailka ditzakegu:

- **Autotrofoak**: CO_2 da beraien karbono iturri bakarra.
  - Landareak, algak, prokarioto batzuk
- **Heterotrofoak**: CO_2 erabiltzeaz gain, beste konposatu karbonodun batzuk behar dituzte (molekula organikoak).
  - Animaliak, protozooak, onddoak, prokarioto batzuk

Bi elikagai maila hauek erlazionatuta daude aurreko sailkapenekin, baina erlazio hori ezta oso zehatza:

- Fotolitotrofoak: gehienak autotrofoak dira, baina ez guztiak.
  - Ongi hazten dira baldintza hauetan: kultibo-medio ez-organikoa (+H_2O beti) + argia (inkubaketa argi iturria) + CO_2 (airekoa)
- Kimiolitotrofoak: gehienak autotrofoak dira hauek ere.
  - Ongi hazten dira baldintza hauetan: kultibo-medio ez-organikoa (+H_2O) + CO_2 + konposatu ez-organiko erreduzitua
- Fotoorganotrofoak: gehienak heterotrofoak dira.
  - Ongi hazten dira baldintza hauetan: kultibo-medio organikoa (+H_2O) + argia
- Kimioorganotrofoak: gehienak heterotrofoak dira.
  - Ongi hazten dira baldintza hauetan: kultibo-medio organikoa (+H_2O) [Molekula organiko hauek energia iturri, elektroi emaile eta elikagaiak izango dira aldi berean]

Adibide bat: Alcaligeneseutrofus

Mikroorganismo hau inguruko baldintzen arabera, glukosarekin hazi daiteke edo $H_2 + O_2 + CO_2$arekin ere bai. Nola sailkatu dezakegu?

- Glukosarekin hazten denean: Kimioorganotrofoa da
- $H_2 + O_2 + CO_2$arekin hazten denean: Kimiolitotrofoa da.

Honako aldakortasun hau adierazteko, eta dena bateratzeko, **terminologia** hau erabiliko dugu:

1. Derrigorrezkoa: behar dituen mota bateko molekulak agortzen badira hil egingo da, soilik kategoria trofiko batekoa da.
2. Aukerazkoa: honek inguruan dituen baldintzek bere kategoria trofikoa aldatzen dutela esan nahi du. Adibidez, aurreko kasuan, *aukerazko kimiotrofoa* da. Kimiotrofoa aukeratu dugu beti sistema sinpleena esan behar delako.
    a. Ordena (sinpleenetik konplexuenera):
        i. Fototrofia
        ii. Kimiotrofia
        iii. Litotrofia
        iv. Organotrofia

5. Elika-mailak hazkuntza-faktoreen beharren arabera:

Hazkuntza-faktoreak zelularen hazkuntzarako beharrezkoak diren konposatuak (organikoak) dira, zeintzuek zelulak ezin dituen sintetizatu. Normalean:

- Aminoazidoak
- Purinak eta pirimidinak
- Bitaminak, lipidoak…

Arazoa molekula horren bide biosintetikoak apurtuta edo geldituta daudenean sortzen da. Kasu hauetan, ingurunean hazkuntza-faktorea ez badago, mikroorganismo hori ez da haziko.

Hazkuntza-faktorea behar izatearen araberako **sailkapena**:

- **Prototrofoa**: ez ditu behar molekula horiek, sintetizatzeko gai da.
    - Hauek ez dute hazkuntza faktoreen beharrik.
- **Auxotrofoa**: behar du. Esan beharra dago zerekiko den auxotrofoa, adib. glizina…
    - Hauek hazkuntza faktoreen beharra dute.

6. Oxigeno molekularraren beharra (gehien behar duenetik gutxien behar duenera):

1. Derrigorrezko aerobioak: O2-a ezinbestekoa dute, azken elektroi-hartzailetzat erabiltzen dutelako (arnasketa aerobioa).

2. Aukerazko anaerobio arruntak: O_2-a dagoenean erabiltzen dute efizienteagoa delako (arnasketa aerobioa, baina O_2-rik gabe ez dira hiltzen (hartzidura edo arnasketa anaerobioa).

3. Mikroaerofiloak: O_2-a beharrezkoa dute baina oso kontzentrazio txikian. (Hobeto hazten dira $[O_2]<0,2atm$). Badirudi oxigeno molekularrak entzima batzuk desaktibatzen dituela.

4. Anaerobio aerotoleranteak (aukerazko anaerobio aerojasankorrak): Ez dute O_2-rik erabiltzen baina ez dira O_2-arekiko sentikorrak. Organismo hauek normalean hartzitzaileak dira, hartzidurak erabiliko dituzte beti. (Adibidez, azido laktikoaren bakterioak.)

5. Derrigorrezko anaerobioak: Inoiz ez dute O_2-rik erabiltzen ez onartzen (toxikoa).

Nola jakin zein motatakoa den kolonia bat*(ikus beste apuntiak)*?
Zonalde aerobio bat duen saiodi bat jartzen da eta bakterioak non hazten diren ikusten da.

a) Derrigorrezko aerobioa: gunea aerobioan hazten dira
b) Derrigorrezko anaerobioa: gune aerobiotik urrunduta hazten dira
c) Aukerazko anaerobioa: gehiago hazten da oxigenoa dagoen gunean baina gune anaerobioan ere haz daiteke. Izan ere, oxigenoa dagoen gunean energia aerobioa ere lortzen du, ondorioz, E asko lortuko du (gehiago modu anaerobioan baino) eta hazkuntza hobea izango du.
d) Mikroaerofiloa: gune aerobiotik pixka bat urrunduta hazten dira, beraientzako [ ] egokian
e) Anaerobio aerotoleranteak: berdin hazten dira bi guneetan

Oxigeno molekularrarekin lotutako arazoak:

Arnasketa aerobioan lortu beharko litzatekeena honakoa da: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$

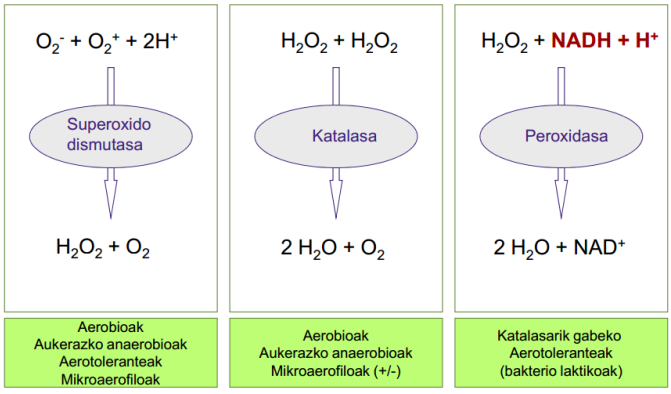
Zergatik ez dira hazten organismo anaerobioak (derrigorrezkoak) gune aerobioetan?

Oxigeno molekula toxikoa izan daitekeelako (erreakzioa ez da gertatzen behar bezala):

- Superoxido anioia: $O_2^- e^- \rightarrow O_2^-$
- Peroxidoa: $O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
- Hidroxilo erradikala: $H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^-$

Hauek desegiteko entzimak:

- Superoxidodismutasa: oxigenoaren erradikalak apurtzen ditu (O_2^--ak)
  - Oxigenoarekin hazten diren mikroorganismo guztietan: aerobioak, aukerazko anaerobioak, aerotoleranteak, mikroaerofiloak
- Katalasa: peroxidoa agertzen denean desegiteko balio du.
  - Aerobioetan, aukerazko anaerobioetan eta mikoraerofiloetan (+/-)
- Peroxidasa: peroxidoa apurtuko du ura sortuz. Kasu honetan beharrezkoa du NADH + H^+ bere lana burutzeko.
  - Katalasarik gabeko aerotoleranteetan (bakterio laktikoak) garrantzitsua da



**Derrigorrezko anaerobioek ez dutenez entzimarik, ez dute O2-rik onartzen.

Galderak (1):

Zein eredu trofikotan sailkatuko zenituzke ondoko mikroorganismoak?

- *Pseudomonas*: ilunpetan, azido azetikoa

Kategoria trofikoa: KIMIOORGANOTROFOA. Kimiotrofoa da, argia ez baita beharrezkoa (ez da fototrofoa). Horrez gain, azido organikoa jarri dugunez, organotrofoa ere bada. Heterotrofoa erebada.

- *Chlorobium*: argia, sulfurua

Kategoria trofikoa: Fotolitotrofoa. Fototrofoa argia behar duelako eta litotrofoa elektroi emailea behar duelako.

- *Nitrosococcus*: ilunpetan, NH_4Cl

Kategoria trofikoa: Kimiolitotrofoa da. *[Galdu in naiz.]*

- *Chloroflexus*: argia, glukosa, lisina

Kategoria trofikoa: Fotoorganotrofoa. Horrez gain, aminoazidoa agertzen denez, auxotrofoa da.

*Gainontzekoak lisinarakoprototrofoak, ez dute kultibo mediora lisina gehitu beharrik.

Galderak (2):

Zein mikroorganismo mota (elika-maila) aurkituko dugu…*(falta direnak guk egiteko)*

- **Hondartzako uretan?**
  - Algak badaude: Fotolitotrofoak
  - Fotoorganotrofoak
  - Kimioorganotrofoak, hondartzako uretan materia organikoa dagoelako
- **Gizakien heste lodian?**
  - Kimioorganotrofoak, materia organikoa dagoelako eta argirik ez
  - Gehienak aukerazko anaerobioak edo derrigorrezko anaerobioak. Aerotoleranteak ere egongo dira. Hau, oxigenoa ez dagoelako da, normalean baldintzak anaerobioak dira
- **Piper-poto batean?**
- **Ahoan?**
- **Saharako basamortuan?**
- **Itsasoko hondoan (600m)?**
- **Lurzoruan (50cm)?**
  - Kimioorganotrofoak, kimiolitotrofoak, biak izan daiteke, lurrean materia organiko eta inorganikoa dagoelako

Galderak (3):

Oxigenoaren beharrari dagokionez, nolakoak dira ondoko mikroorganismoak?

- *Streptococcus*: O_2-a bai: hartzidura. O_2-rik ez: hartzidura

Anaerobio aerotolerantea da.

- *Rhizobium*: hazteko $[O_2]<0,2atm$

Mikroaerobioa

- *Escherichia*: O_2-a bai: arnasketa aerobioa. O_2-rik ez: arnasketa anaerobioa

Aukerazko anaerobio tipikoena da, oxigenoa dagoenean erabiliko baitu. Gainera, hartzidura mota desberdinak egin daitezke.

- *Pseudomonas*: O_2-a bai: arnasketa aerobioa. O_2-rik ez: ez da hazten

Derrigorrezko aerobioa

- *Clostridium*: O_2-a bai: hazkuntzarik ez. O_2-rik ez: hartzidura

Derrigorrezko anaerobioa

Galderak (4)

	ELKAR BIZITZA	**O2-aren BALDINTZAK**
Derrigorrezko aerobioa – derrigorrezko anaerobioa	Ez	-
Derrigorrezko aerobioa – Aukerazko anaerobioa	Bai	Oxigenoa dagoenean
Aukerazko anaerobioa – anaerobio aerotolerantea	Bai	Beti
Derrigorrezko aerobio – Anaerobio aerotolerantea	Bai	Oxigenoa dagoenean
Derrigorrezko anaerobioa – anaerobio aerotolerantea	Bai	Oxigenoa ez dagoenean

PROKARIOTOEN METABOLISMOA: SARRERA

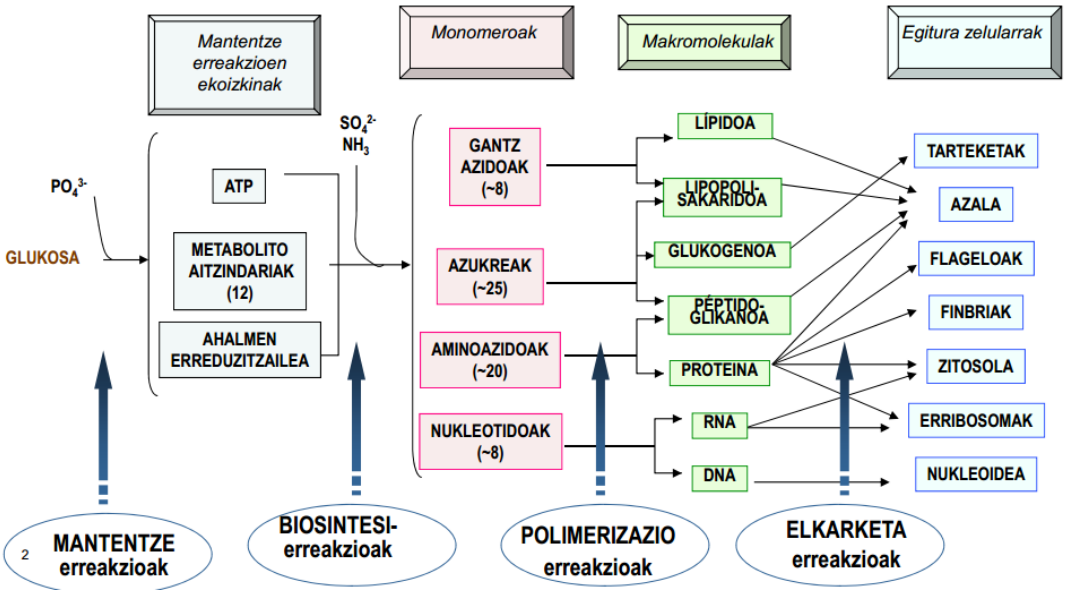
1. Metabolismoaren eskema orokorra
2. Elektroi-garraiatzaileak
    a. Erredox erreakzioak
3. Energiaren sorrera
4. Metabolito aitzindariak

Metabolismoa: zeluletan gertatzen diren aldaketa kimiko guztiak. Erreakzio honen ondorioa baldintzak egokiak badira zelula berri baten sintesia izango da.

Aldaketa kimiko edo erreakzioen sailkapena ondorioaren arabera: *(Adibidea: bakterio kimioorganotrofoa)*

1. Metabolismoaren eskema orokorra

(adibidea: bakterio kimioorganotrofoa)



Glukosatik abiatzen gara. Bera izango da energia emailea, karbono iturria eta elektroi emailea. Horrez gain, fosforo bat ere gehituko dugu.

Mantentze erreakzioak: Metabolito aitzindariak (13), ahalmen erreduzitzailea eta ATP edo energia zelularra lortzeko, mikroorganismoak burutuko dituen erreakzio kimikoak.

Biosintesi erreakzioak: Honen bidez, zelula kimioorganotrofoak aurretik aipatutako metabolito aitzindariak, ATP eta ahalmen erreduzitzailea; gantz azidoak, azukreak, aminoaziodak eta nukleotidoak eratzeko erabiliko ditu. Horiez gain, NH_3 eta SO_4^{2-} ere erabiliko ditu honetarako.

Polimerizazio erreakzioak: Aurrekoetatik makromolekulak eratzea.

Elkarketa erreakzioak: Makromolekuletatik egitura zelularrak eratzea.

Mikroorganismo gehienetan biosintesi, polimerizazio eta elkarketa erreakzioak oso antzekoak dira. Baina mantentze erreakzioak ez, oso desberdinak dira, eta gainera mota askotakoak izan daitezke. Hau kategoria trofiko ezberdinetako mikroorganismoak ditugulako da:

- Kimioorganotrofoak, kimiolitotrofoak, fotoorganotrofoak, fotolitotrofoak

Guztiek lortzen dituzte ahalmen erreduzitzailea, energia eta metabolito aitzindariak baina oso modu ezberdinetan.

Erreakzioen sailkapena (liburu batzuetan ageri da):
Katabolismoa: Energia erabilgarria sortzeko gertatzen diren erreakzio kimikoak. Mantentze erreakzioak hemen.
Anabolismoa: zelulan gertatzen diren erreakzio biosintetiko guztien batura. Biosintesi, polimerizazio eta elkarketa erreakzioak hemen.

Nola lortzen dute energia zelular hori harrapatzea?

Energia-iturria (elektroi emailea) → Elektroi garraioa → Energia zelularra.
Prozesu hau garatzeko erredox erreakzioak gertatzen dira.

Arbeleko adibidea:
Sufrearen kimiolitotrofoa den organismo aerobio bat dugu.

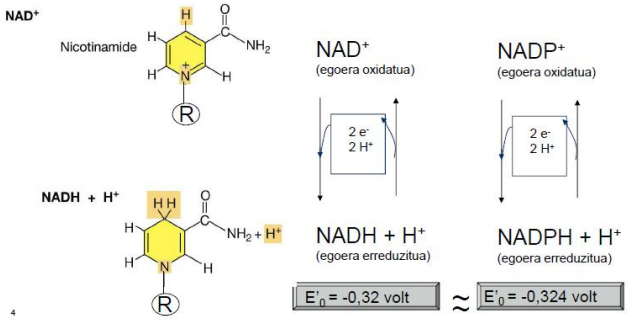
- Energia iturria eta elektroi emailea sufrea izango da: SH_2
- $SH_2 \rightarrow O_2$ Sufretik 8 elektroi garraiatzaile kate batera pasatuko dira, azkenik hauen hartzailea oxigenoa izango delarik.
    - Ondorioz: $SH_2 + 2O_2 \rightarrow SO_4 + 2H^+$

2. Elektroi-garraiatzaileak:

- Zeluletan gertatzen diren **erredox-erreakzioen bitartekaritzat** jokatzen duten konposatuak dira
- Lehenengo emaileak elektroiak honelako molekulei ematen dizikie, eta hauek elektroi-azken-hartzailera pasatuko dituzte
- Prozesu honetan **elektroi-garraiatzaileak erredukzioak eta oxidazioak** jasaten ditu
- Bi elektroi-garraiatzaile mota
    - Disolbagarriak: zitoplasman jokatzen dutenak
    - Mintzeko garraiatzaileak: elektroi-garraio-katean

Elektroi garraiatzaile disolbagarriak:

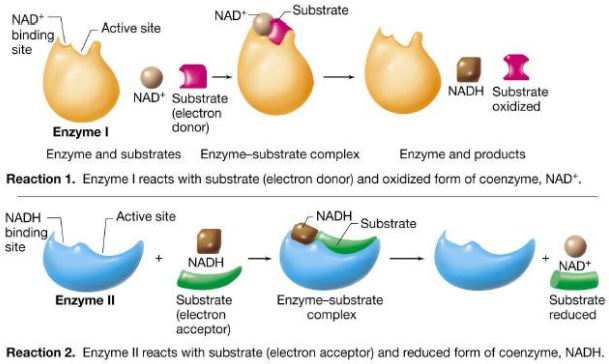
- Garrantzitsuenak: Piridin nukleotidoak
    - Nikotinamida-adenin-dinukleotidoa (NAD^+)
    - Nikotinamida-adenin-dinukleotido-fosfatoa ($NADP^+$)
- Beste batzuk:
    - $FADH_2$



Hauek buruturiko erredox erreakzioak: $NAD^+/NADH+H^+$:

Lehenengo molekularen kasuan, substratua oxidatu egiten da, NAD^+ erreduzituz (mantentze erreak.). Honenbestez, ondoren elektroiak emateko beharra badago, NADH horretarako kapaza izango da.

Bigarrenean, NADH zitoplasman disolbatuta dago. Hau hartzen du, eta honen bidez substratuari elektroiak transferitu daitezke (biosint), oxidatuta dagoena erreduzituz eta NAD^+ lortuz. NAD^+ hau zitoplasman aske geldituko da, eta berriro hasiko litzateke zikloa.



Mintzako elektroi garraiatzaileak:

I konplexuaren zitioplasma aldeko gunea: NADH-deshidrogenasarena:

- Mintzako barneko zonaldean, proteina periferiko bezala.
- $NADH + H^+$ da bere emailea
- H^+ eta e^- garraiatzen ditu (hartzen ditu)

I konplexuaren mintz barruko gunea: Flaboproteinak:

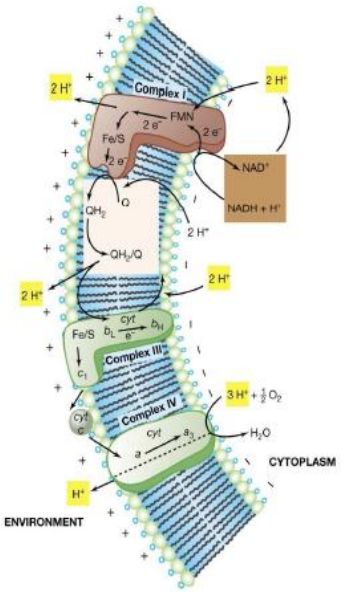
- Mintzeko proteina integralak dira
- Erriboflabinaren deribatua daukate (FMN edo FAD)
- Protoiak eta elektroiak garraiatzen ditu

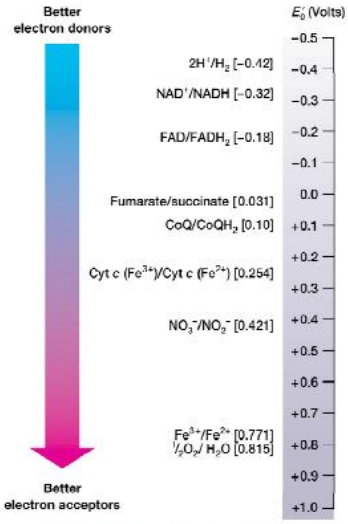
I konplexuaren enviroment gunetik gertuen dagoen zatia: Burdina-Sufre proteinak:

- Bakarrik elektroiak garraiatzen ditu
- Protoiak kanporatzen dira

Zurizko gunea: Kinonak:

- Oso konposatu hidrofoboak
- Mintzako lipidoetan solugarriak
- Elektroiak eta protoiak garraiatu
- Beharrezkoak diren protoiak zitoplasmatik hartzen dituzte



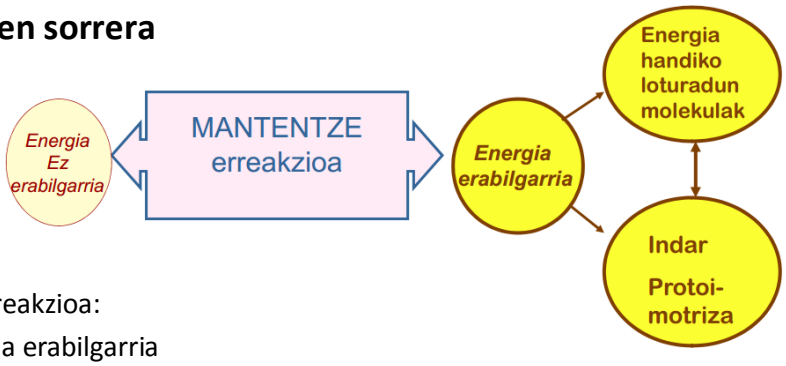


III. konplexuaren mintz barneko gune luzeena: Zitokromoak:

- Bakarrik elektroiak garraiatzen ditu
- Protoiak kanporatzen dituzte

e^- garraio kate osoa kontutan hartuta, erredox potentzialaren (Eº) balioak handitu egiten dira lehen emailetik azken hartzailerarte. Gainera, protoien gradientea sortzen da.

3. Energiaren sorrera



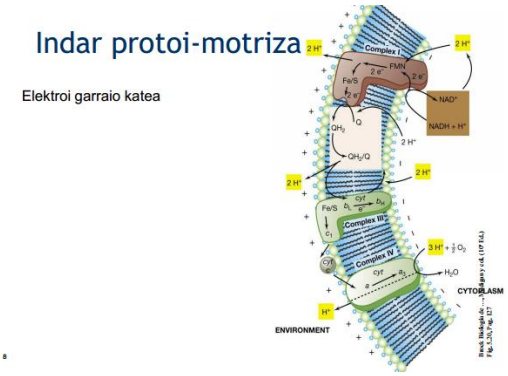
Mantentze erreakzioa:

- Energia erabilgarria
  - Energia handiko loturadun molekulak
  - Indar protoi-motriza
- Energia ez erabilgarria. Hauek mantentze erreakzioen bidez energia erabilgarri bihurtu daitezke. (Adib, Redox erreakzioak)

Indar protoi-motriza:

Mintza protoiekiko iragazkaitza da.
Mintzean zehar gradientea eratzen da.

- Protoien gradientea:kanpoan handiagoa eta barruan txikiagoa
- pH-aren gradientea: kanpoan azidoagoa eta barruan basikoagoa
- Potentzial elektrikoaren gradientea: kanpoan positiboa eta barruan negatiboa



Gradiente hauen bidez, energia erabilgarria gordetzen da: protoien indar eragilea.

<u>Indar protoi-motriza zertarako behar da?</u>

- Garraio aktiboa: elikagaiak gradientearen aurka barneratzeko
- Flageloen mugimendua
- Elektroiak alderantziz garraiatzeko (e^- katean beste norabidean)
- ATP sorrera

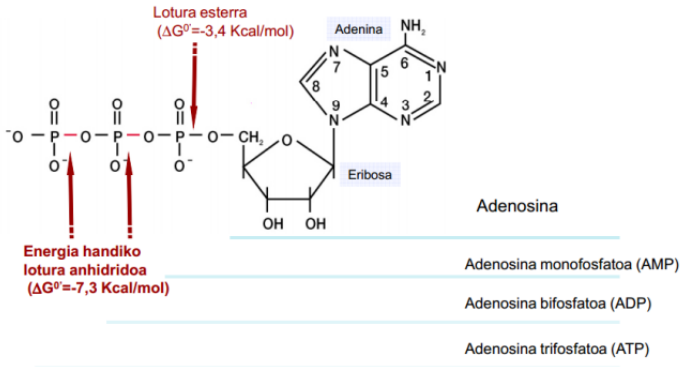
Energia handiko loturadun molekulak:

Molekula hauen funtzioak:

- Mantentze erreakzioetan sortutako energia harrapatzea
- Metabolismoan jokatzen duten bitartekariak aktibatzea

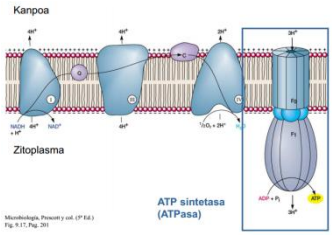
Garrantzitsuenak:

- ATP, GTP, CTP
- Azil-S-CoA
- PEP (fosfoenolpirubato)

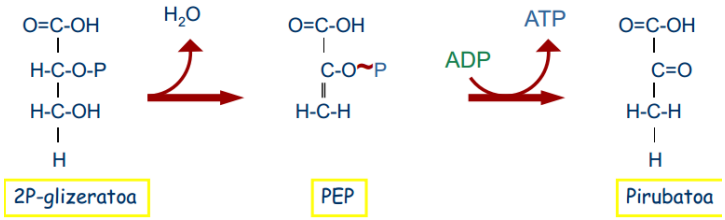


ATP: molekula honen kasuan energia handiko loturak daude, 3 fosfatoen loturak adibidez (1 lotura esterra eta beste biak lotura anhidridoa).

<u>ATP sortzeko mekanismoak:</u>



1. *Elektroi garraioaren bidezko fosforilazioa*: elektroien garraioaren bidez, protoi gradientea sortzen da eta indar protoi-motriza erabiltzen da ATPa sortzeko.
    a. Arnasketa eta fotosintesia gertatzen denean mekanismo hau inportanteena da energia sortzeko.
        i. Arnasketa denean: oxidazio-fosforilazioa
        ii. Fotosintesia denean: fotofosforilazioa
2. *Substratuaren mailako fosforilazioa*: sistema hau oso garrantzitsua da hartzidura burutzen duten mikroorganismoengan. 2P-glizeratoa→ PEP →Pirubatoa. Prozesu honetan oinarria molekula organiko bat da, gure adibidean 2P-glizeratoa. Hau deshidratatuz, PEP, energia handidun molekula bat sortzen da. Jarraian, energia handidun molekula hau ATPa sintetizatzeko erabil daiteke.



4. Metabolito aitzindariak:

- Mantentze-erreakzioetan sortutako konposatuak
- Biosintesi guztien oinarria dira: 13 molekula hauek beharrezkoak diren molekula guztiak sintetizatzeko nahikoa dira.
- Adibideak:

- **Glukosa 6 fosfatoa**
- **Fruktosa 6 P-a**
- **Erribosa 5 P-a**
- **Eritrosa 4 P-a**
- **Sedoheptulosa 7 P-a**
- **Glizeraldehido 3 P-a**
- **3 Fosfoglizeratoa**
- **Fosfoenolpirubatoa**
- **Pirubatoa**
- **Azetil-koentzima A**
- **α-zetoglutaratoa**
- **Sukzinil-CoA**
- **Oxalazetatoa**

5.KIMIOORGANOTROFOAK

1. Sarrera
2. Metabolismo nagusia
3. Arnasketa:
   - aerobioa: ezaugarri orokorrak
   - anaerobioa: ezaugarri orokorrak,, motak
4. Hartzidura: ezaugarri orokorrak eta motak
5. Azukreak ez diren konposatuen erabilera:
   - Karbohidratoak, Proteinak, Lipidoak, C1 konposatuak

1. Sarrera

Prokariotoek energia iturria eta elektroi emailea beharrezkoak dituzte, eta askotan molekula bera da biak.

Soilik hauen mantentze erreakzioak ikusiko ditugu. Gogoratu: mantentze errekazioetan molekula organiko bat erabiltzen dute. Molekula organiko horiek C bat baino gehiago izan behar dituzte […].

Metabolismo zentrala edo nagusia: metabolito aitzindariak, energia (ATP) eta ahalmen erreduzitzailea ($NADH+H^+$), arnasketa (energia, NAD^+) edo hartzidura (NAD^+) egiteko.

2. Kimiorganotrofoen metabolismonagusia/zentrala:

Zein molekula organiko? Glukosa

- Substratu unibertsala delako
- Bere degradazioaren bidez lortuko dugu:
  - ATPa
  - Ahalmen erreduzitzailea
  - Metabolito aitzindariak

Metabolismo zentralaren bideak:

Bide batzuk **orokorrak** dira:

- Mikroorganismo guztietan daude
  - *Baina gerta daiteke etapa guztiak funtzionalak ez izatea

- Glukolisia
- Pentosa fosfatoen bidea
- Azetil-Ko A –ren sintesia
- Azido trikarboxilikoen zikloa

Bide batzuk **espezifikoak** dira:

- Mikroorganismo mota batzuetan bakarrik aurkitzen dira

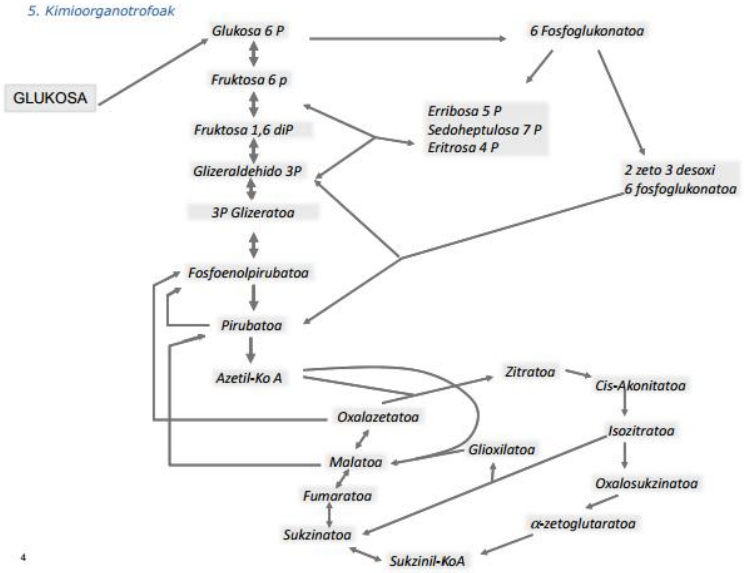
- *Entner-Doudoroff bidea*
- *Glioxilatoaren zikloa*
- *Fosfoenolpirubatoaren sintesia*
- *Pirubatoaren sintesia*

Bide hauen bidez prokariotokimioorganotrofoek honakoak lortzen dituzte:

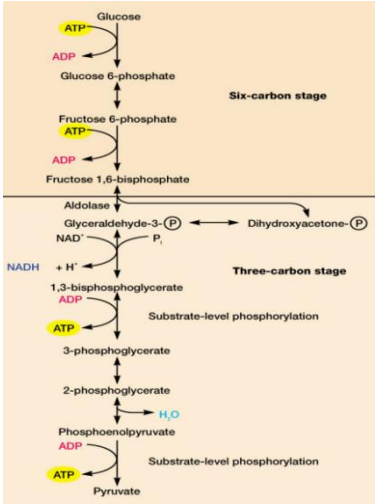
- Metabolito aitzindariak
- Energia (hala ere, honen parte gehiena lortzeko badaude beste sistema batzuk)
- Ahalmen erreduzitzailea

Bide hauek elkarrekin lotuta daude, izan ere, zitoplasman gertatzen dira eta bertan dena nahastea erraza da. Gainera, metabolito aitzindari batzuk komunak dira.

Bide guztien eskema:



Bide orokor eta espezifikoetan aipaturiko 8 horiek ikusiko ditugu. Helburua: bakoitzean zein metabolito, zenbat energia, eta ahalmen erreduzitzailea. Entzimak… ez zaigu interesatzen.



Glukolisia:
Glukosaren oxidazioa pirubatorarte da.

<u>Energia:</u> glukosa hau aktibatzeko 2 ATPren gastua dago. Baina, glukosaren oxidazioan 4 ATP sortzen dira. Produkto netoa: 2 ATP, esan daiteke glukolisianATPa sortzen dela.

<u>Ahalmen erreduzitzailea</u>: sortzen da. 1NADH

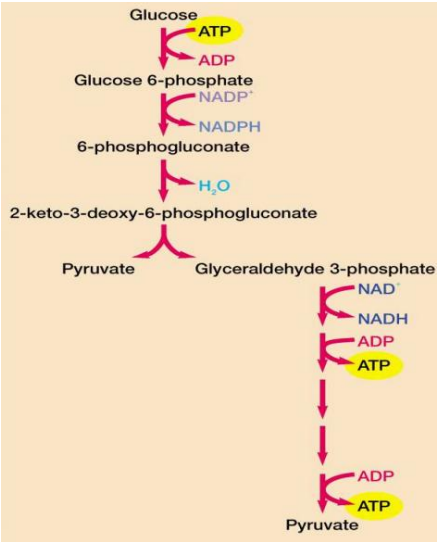
<u>Metabolito aitzindariak</u>: Glukosa 6P, Fruktosa 6P, Glizeraldehido 3P, 3-fosfoglizerato, PEP eta pirubatoa.

Pentosa fosfatoen bidea:
Nahiko konplexua da glukolisiarekin konparatuta.

<u>Ahalmen erreduzitzailea</u>: sortzen da, izan ere, 2NADPH sor daiteke, prozesu biosintetikoetan parte hartzeko.

<u>Metabolito aitzindariak</u>: Erribosa 6P, Seudoheptulosa 7P

<u>Energia:</u> ez da lortzen.



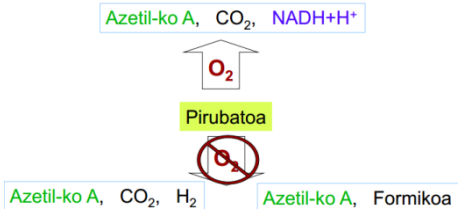
Entner-doudoroff bidea:
Pseudomonas taldeko mikroorganismoetan agertzen da adibidez, hau da, oso mikroorganismo berezietan. Mikroorganismo honen kasuan, glikolisia ez da gertatzen. Hemen, glukosa batetik 2 pirubato lortzen dira, hasierako erreakzio batzuk ezberdinak izanez baina G3Ptik aurrerakoak berdinak.

Energia: Energia behar da (1ATP), baina 2 ATP ekoizten direnez, produktu neto positiboa (+1ATP)

Ahalmen erreduzitzailea: sortzen da, NADH.

Metabolito aitzindariak: Glukosa 6P, pirubato… (enaizaiau)

Azetil-CoAren sintesia:
Mikroorganismo guztietan gertatzen dira, baina hemendik sortzen diren produktuak desberdinak izango dira inguruneko baldintzaren arabera.



- Aerobiosia: Azetil-CoA, CO2 eta NADH+H+ sortzen dira.
- Anaerobiosia:
  - Azetil-CoA, CO2 eta H2 edo
  - Azetil-CoA eta azido formikoa sor daitezke.

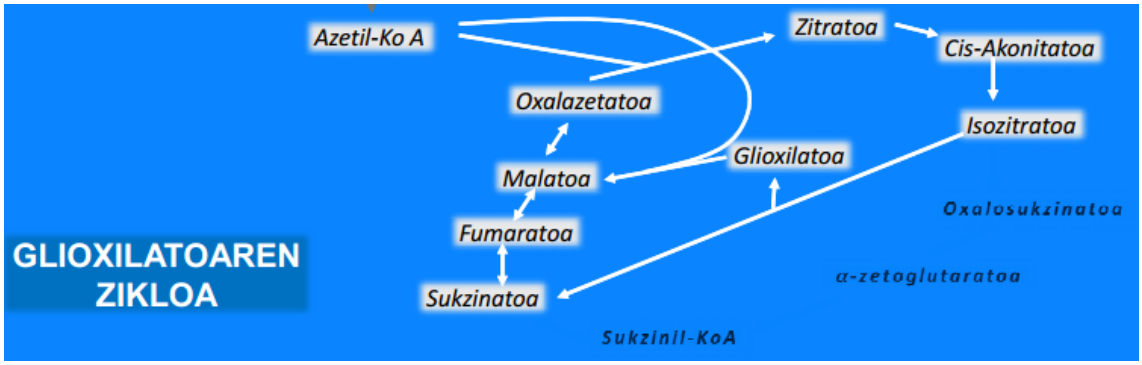
Azido trikarboxilikoen zikloa:
Mikroorganismo batzuetan ziklo honen etapa batzuk inaktibatuta daude eta honek arazoak sor ditzake.

Energia: GTP moduan sortzen da.

Ahalmen erreduzitzailea: 2NADH sortzen dira. Hau da azido trikarboxilikoen zikloaren produktu garrantzitsuena.

Metabolitoaitzindariak: OA, alfaKG eta sukzinil-CoA

Glioxilatoaren zikloa:
Azido trikarboxilikoaren zikloarekin lotuta dago. Oso garrantzitsua izango da mikroorganismoek azetatoa (edo azido azetikoa) daukatenean sustratu gisa. Izan ere, azetatoarekinazetil-CoA sortzen da. (*Hemen falta da bakoitza zer*)



Erreakzio anaplerotikoak:

Fosfoenolpirubatoaren sintesia:
Honetarako OA edo pirubatoa erabili behar dira. Gainera, PEP sortzeko energia beharrezkoa da:

- OA + ATP → PEP + CO2 + ADP
- Pir + ATP → PEP + …

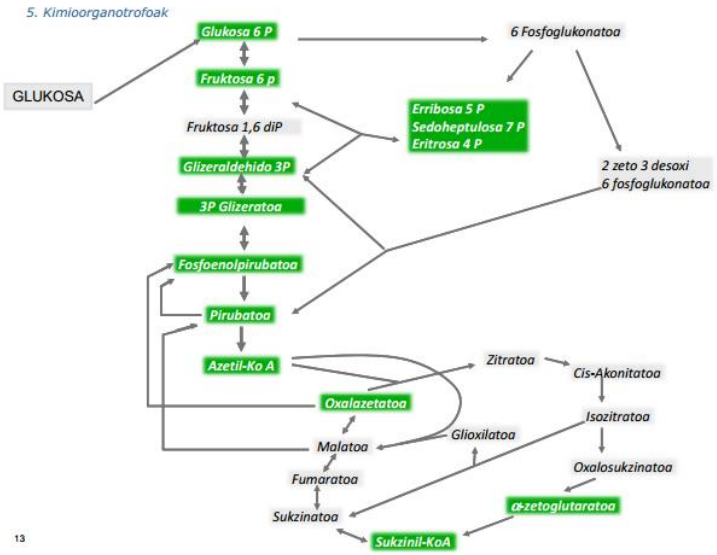
Pirubatoaren sintesia:
Sustratua azido organikoa denean da garrantzitsua, hau da, mikroorganismo hauek azido organikoak jaten dituztenean. Pirubatotik glukosaren sintesia egin daiteke.

- Malatoa + NAD^+ → Pir + $NADH+H^+$

Laburbilduz,

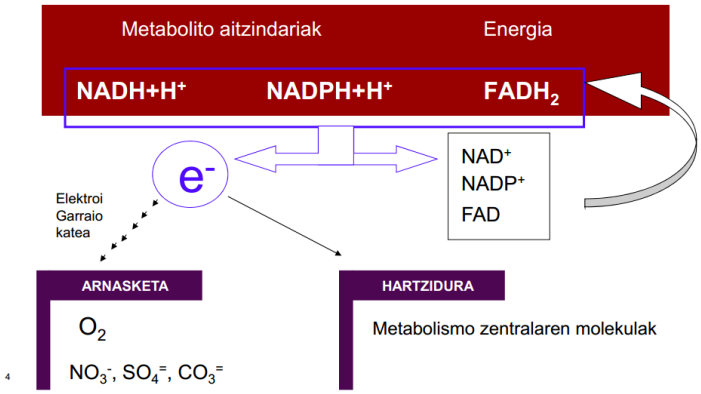
Bidea	Mikroorg.	Noiz	Aitzind.	Energia	Ahalmen erred.
Glukolisia	Gehienetan	Karbohidratoak	+	+	+
Pentosa-P bidea	Gehienetan	Pentosak	+	-	+
Entner-doudoroff	Askotan, batzuetan glukolisiaren lekuan	Karbohidratoak Glukonatoa	+	+	+
Azetil-CoAren sintesia	Guztietan	Aerobiosian Anaerobiosian	+ +	- -	+ -
Azido trikarboxilikoaren zikloa	Gehienetan	Aerobiosian Anaerobiosian	+ (+)	+ -	+ -
Glioxilatoaren zikloa	Bakterio aerobioak	Azetatoa Gantz azidoak	+	-	+
Erreakzio anaplerotikoak	Gehienetan	Azido organikoak	+	0/-	0/+

Metabolito aitzindariak zein diren laburtuta:



Guk jakin behar duguna: bide metaboliko bakoitzean zein sortzen den. Gainera, energia eta ahalmen erreduzitzailea non gertatzen den ere jakin behar dugu.

3. Arnasketa



Arnasketa: Beti dago elektroi garraio katea eta elektroi horien azken elektroi hartzailea. Arnasketako molekulak oso oxidatuak izango dira. Oxigenoa arnasketa aerobiokoa da eta nitratoa, SO_4 edo CO_3 arnasketa anaerobiokoak.

Hartzidura: Ez dago elektroi garraio katerik eta hartzidurako metabolismo zentralaren molekulak elektroiak harrapatuko ditu eta azken produktuak askotan molekula organikoak izango dira.

ARNASKETA AEROBIOA: ezaugarri orokorrak

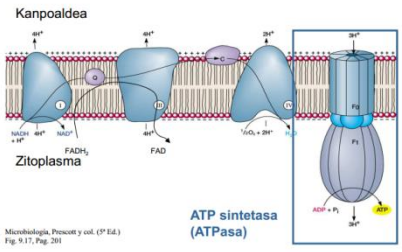
Metabolismo honen bidez energia asko sortzen da: substratua guztiz oxidatzen da (CO_2 arte). CO_2 molekularen maila oso baxua delako askatzen da energia asko. Horrez gain, ura ere azken produktua da. Askatzen den energia guztitik ATP asko sortzen da.

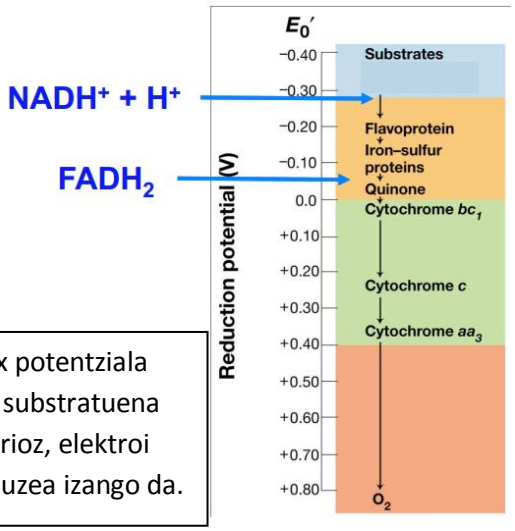
Ahalmen erreduzitzailea:

- NADPH+H^+biosintesirako erabiltzen da
- NADH+H^+ eta $FADH_2$→ elektroiak elektroi garraio katera
    - Oxigenoa: elektroi azken hartzailea
    - O_2/H_2O Eº' oso elektropositiboa→ elektroi garraio kateak luzeak dira

Ondorioa: Protoi gradiente handia. ATParensintesirako…

ATP-aren sorrera oxidazio-fosforilazioaren bidez





Oxigenoaren erredox potentziala oso positiboa da eta substratuena oso negatiboa, ondorioz, elektroi garraio sistema oso luzea izango da.

Energia lortzeko metabolismo zentralean ATP gutxi batzuk eta GTP bat sortzen da eta ahalmen erreduzitzailea, protoien gradientea eratzeko eta ATPa sintetizatzeko erabiltzen da.

ARNASKETA ANAEROBIOA: ezaugarri orokorrak

Zer da?Konposatuen oxidazioa azken elektroi hartzailea oxigenoa ez dagoenean:

- Ez-organikoa (normalean hauek dira): NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}
- Organikoa (espezie batzuetan): fumaratoa

Zein mikroorganismo motatan?

- Aukerazko anaerobioak
- Derrigorrezko anaerobioak

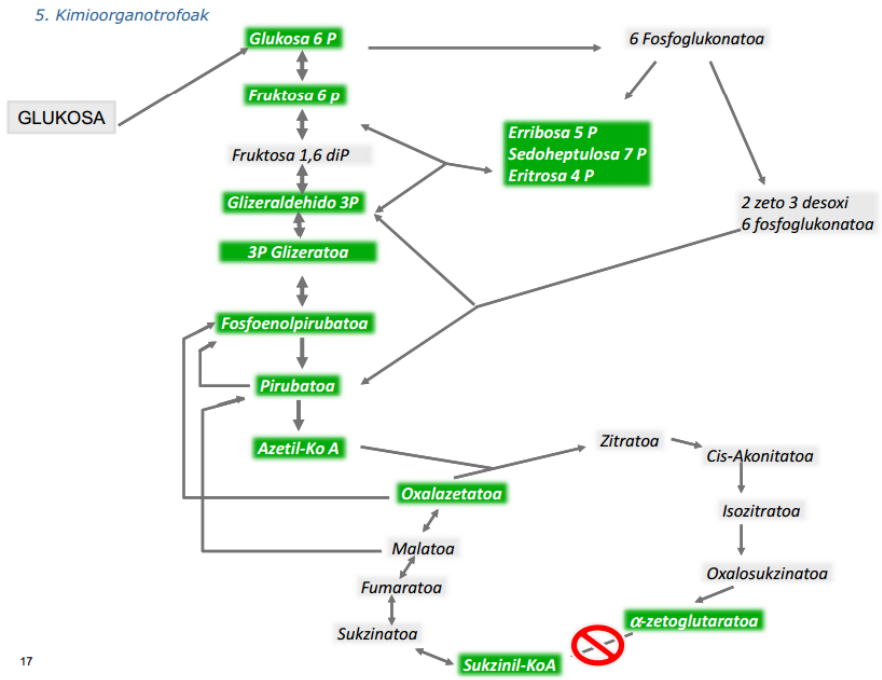
- Gehienak kimioorganotrofoak dira. Guk hau ikusiko dugu.
- Gutxi batzuk kimiolitotrofoak dira

Nolako metabolismoa?

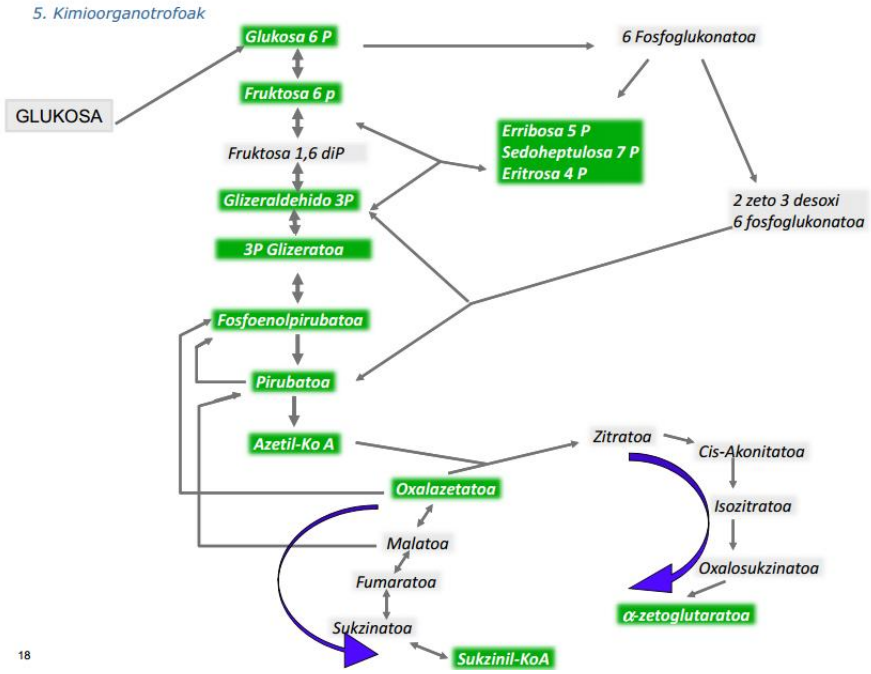
Metabolismo zentrala ikusitakoa bezala, baina:

- Azetil-CoA-ren sintesia (anaerobioetan).
    - Izan ere, metabolismo zentralaren bide komunetan pirubatotik oxigenoa izan edo ez, produktu ezberdinak lortzen genituela ikusi genuen.
- ATZ (azido trikarboxilikoaren zikloa) moztuta dago alfa-zetoglutaratoaren mailan
    - Alfa-zetoglugarato-DHasaanaerobiosianinaktibatua dago

Ondorioak:



Arazoa: alfa-zetoglutaratoa metatu egingo da baina sukzinil-CoA eta oxalazetatoa ez dira sintetizatuko. Hauek metabolito aitzindariak direnez, derrigorrezkoa dute metabolitohoiek lortzea. Ondorioz, beste mekanismo bat erabiliko dute hori lortzeko: azido trikarboxilikoaren ziklo erreduktiboa:



Hau gerta dadin ordea, mikroorganismo hauek oxalazetatoa sintetizatu behar dute, energia erabiliz. Nola?

- PEP + CO_2 → OA + Pi
- Pirubatoa + CO_2 + ATP → OA + ADP + Pi (*Karboxilasa*)

Beraz, kimioorganotrofo hauen kasuan, metabolito aitzindariak lortzeko energia erabili behar dute, eta horrez gain, ahalmen erreduzitzailearen gastua ere egongo da.

Laburtuz,

Nola lortzen dute metabolito aitzindariak?

- ATZ erreduzitzailea

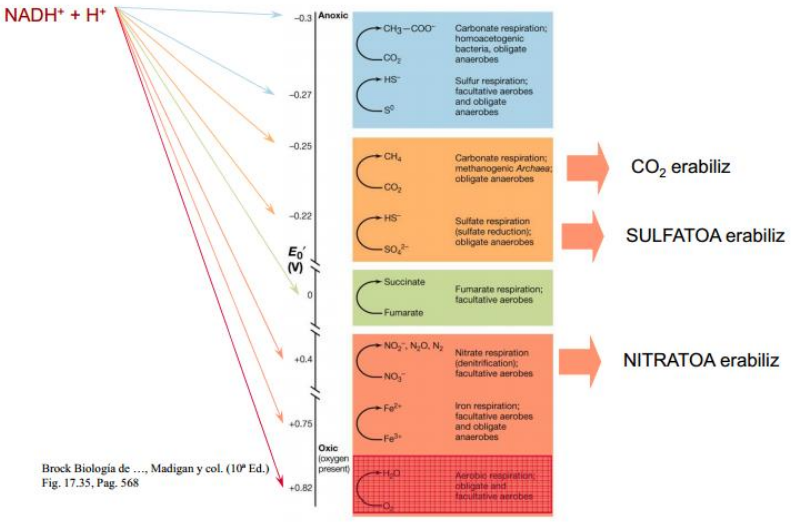
Nola lortzen dute ahalmen erreduzitzailea?

- Metabolismo zentralaren bidez
- Baina NADH batzuk erabiltzen dira ATZ erreduktiboan

Nola lortzen dute energia?

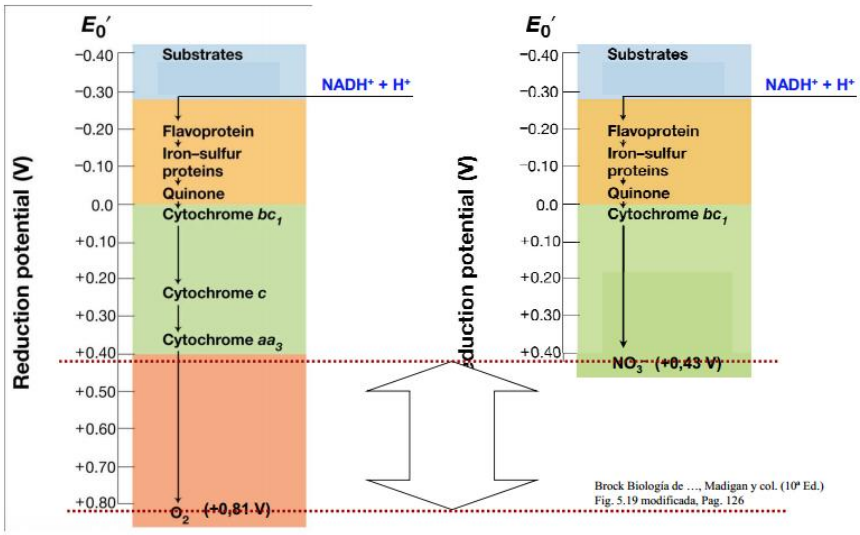
- Substratu mailako fosforilazioen bidez
- Oxidazio-fosforilazioaren bidez, baina…

ARNASKETA ANAEROBIO MOTAK



Orokorrean, NADH+H$^+$ sortzen dira baina energia gutxiago lortzen da arnasketa anaerobioan. (urdin, naranja, berde, naranja fuerte = anaerobiosian; gorri = aerobiosian)

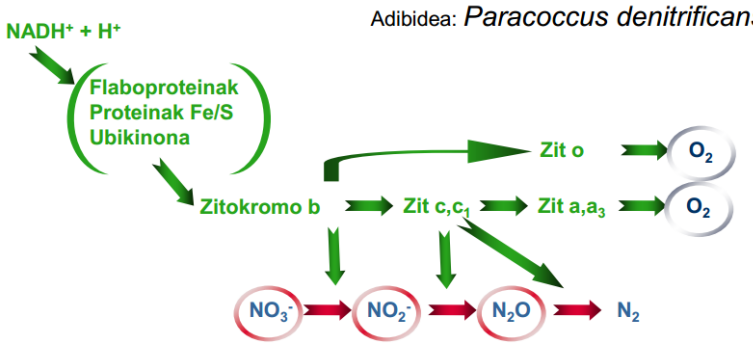
Hartzailea nitratoa denean: ARNASKETA ANEAEROBIOA NITRATOA ERABILIZ



Nitratoaren potentziala baxuagoa da, beraz, bide motzagoa.

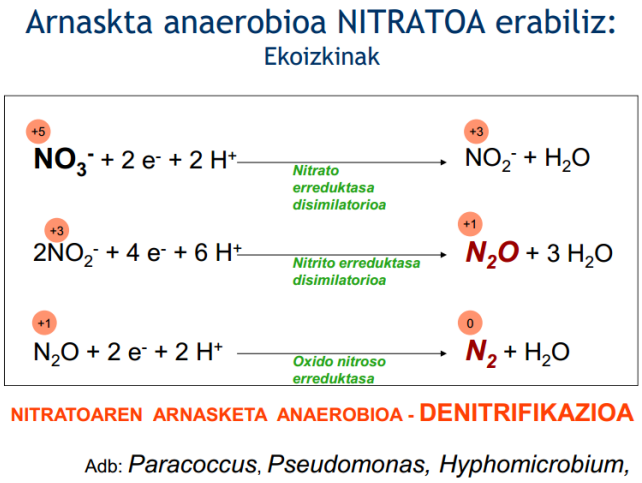
Adib) Oxigenoa dagoenean: NADH+H$^+$ ->flaboproteinak, proteinak Fe/S, ubikinona -> b zitokromoa -> c zitokromoa -> … -> oxigenoa
Oxigenorik ez: NADH+H$^+$ ->flaboproteinak, proteinak Fe/S, ubikinona -> b zitokromoa -> c zitokromoa -> Nitratoa, NO_2^-, N_2O… (motzago)

Adibidea: *Paracoccus denitrificans*



Nitratoa erabiliz:

Beheko lehen kasuan, azken produktua nitritoa da (NO_2^-) eta erreduzituago dago. Gainera, mikroorganismo batzuek nitrito hori are gehiago erreduzitu dezakete, NO_3^- -> N_2O -> N_2



Espezie bakoitza puntu bateraino iristeko gai da. Azken kasuan, nitrogeno gasa kanporatu egiten da, eta prozesu honi denitrifikazioa deitzen zaio.

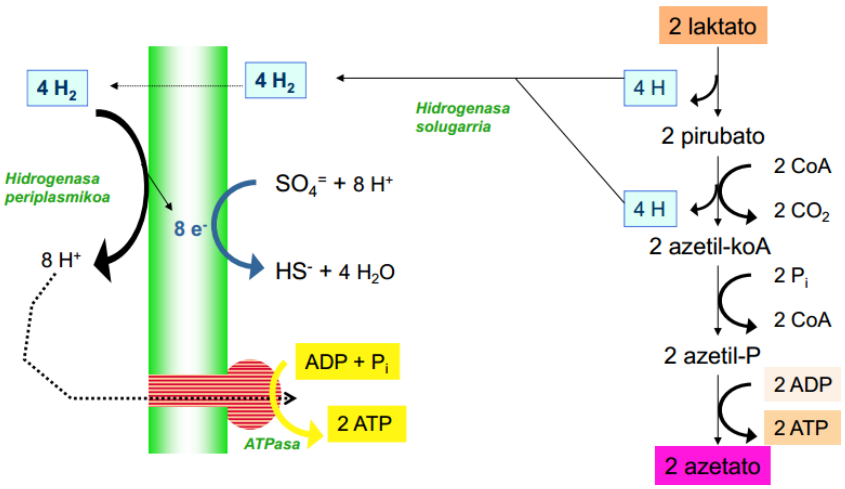
Konposatu sufredunak erabiliz (Sulfatoaren arnasketa aerobioa):

Nahiko prozesu konplexua da.

- Azken elektroi hartzailea:
  - SO4- →Desulfovibrio, Desulfobacter
  - S^0→Desulfuromonas
- Azken produktua (ekoizkina) H_2S da, eta kanporatu egiten da
- Elektroi emaileak anitzak dira: H_2 (kimiolitotrofoak), laktatoa, pirubatoa, azetatoa, malatoa, etanola, gantz azidoak, glukosa
  - Konposatu organikoak azetato edo CO_2arte oxidatzen dira.

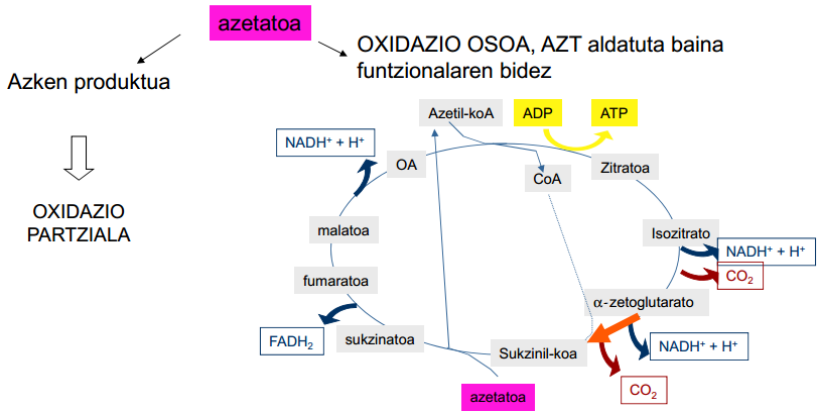
Garrantzitsua: sulfatoaren arnasketa anaerobioa burutzen duten espezieak normalean derrigorrezko anaerobioak dira:

- Ur eta lur anoxikoetan
- Materia organikoa ugari
- Sufre oxidatu asko



Sufrearen zikloa

- Anaerobiosian ematen da
- 2 konposatu sufredunek parte hartzen dute:
    - SO_4^{2-} eta H_2S



Hartzailea CO_2 (CO_3^-) denean:

- Elektroi garraio katean azken hartzailea CO_2 da eta CH_4ra erreduzitzen da: **metanogenesia**. Ekoizkina metanoa da.
    - Elektroi emaileak:
        - Formikoa (kimioorganotrofoak)
        - H_2, CO (kimiolitotrofoak)
- Arnasketa hau egiten duten mikroorganismoak:
    - Garrantzitsuenak kimiolitotrofoak dira: substratua H_2-a.
    - Batzuk kimioorganotrofoak: substratua hartzidura ekoizkina
    - Derrigorrezko anaerobioak guztiak
    - Garrantzitsuenak *Archaea*metanogenikoak: *Methanococcus, Methanobacterium, …*
- Energia: metanogenikoek elektroi garraio kate berezia dute. Ohiko garraiatzaileen ordez (kinona, zitokromo, …) garraiatzaile espezifikoak dituzte (metanofuranoa, metanopterina, F_{420}koentzima, F_{430}koentzima, M koentzima, B koentzima, … ez ikasi)
- Aitzindariak sortzeko autotrofoak direnak CO_2-a erabiltzen dute:
    - Ez dute Calvin ziklorik.
    - Honen ordez "**Azetil-CoA bidea**" egiten dute.
        - $2CO_2$→ … →Azetil-CoA→…Metabolismonagusia…→Aitzindariak
- CO2aren erredukzioa:
    - CO_2 (Karbonoa 4+) + $4H_2$→ CH_4 (2-) + $2H_2O$

Metanoaren oxidazioa (metanotrofoak aurrerago azalduta ere badaude C1 konposatuetan, hemen ezpotulerketan ez larrittu):

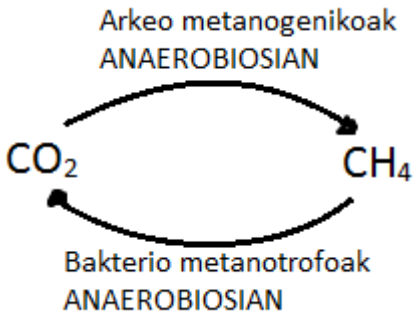
2 motatako metanotrofoak daude: Metanotrofo (I) eta metanotrofo (II). Hauek, antzeko barne egiturak dituzte, mintzaren egitura bereziekin metanoaren metabolismorako. Metabolito aitzindariak: erribulosamonofosfatoen zikloa eta serinaren zikloa.

Metanotrofoek CH_4 dute elektroi eta karbono iturri.

Metanoaren oxidazioa:

1. Metanoaren oxigenazioa (-4) metanola arte (-2)
    a. Metano monooxigenasa
    b. Aerobioa
    c. Ez da energia lortzen
    d. $CH_4 + O_2 \rightarrow H_2O + CH_3OH$
2. Metanola oxidatzen da (-2) CO_2 arte (+4)
    a. Ahalmen erreduzitzailea sortzen da. Energia lortzen da.
    b. Formaldehidoa sortzen da metabolito aitzindariak sintetizatzeko.
    c. $CH_4 + O_2 \rightarrow H_2O + \underline{CH_3OH \rightarrow CH_2O \rightarrow HCOO^-}$

Ondorioa: CO_2aren zikloa



4. Hartzidura

Hartzidura konposatu organikoen degradazioa da, kanpo elektroi hartzailerik gabe.

- Konposatu organikoak elektroi emaile eta hartzaileak izango dira: lehenengo elektroi emailea eta azken elektroi hartzailea ere, substratu hartzigarri bakarretik etortzen dira. Kanpoko elektroi hartzailerik gabe eta elektroi garraio katerik gabe.
- Hartzitzen diren substratuak karbohidratoak, aminoazidoak, purinak…
- Substratuak degradatzeko erabiltzen den bidea (metabolito zentrala eta bide zehatzak) eta sortutako ekoizkinak hartzidura bakoitzean espezifikoak dira.
- Konposatu organikoak oxidatu eta ondoren erreduzitu egiten dira.
    - Piridin nukleotidoen kasuan, justu kontrakoa gertatzen da: hasieran erreduzitu eta gero birroxidatzen dira (elektroi garraio kate gabe)
- Substratuaren karbonoen erredox maila eta ekoiztutako karbonoarena berdinak dira.

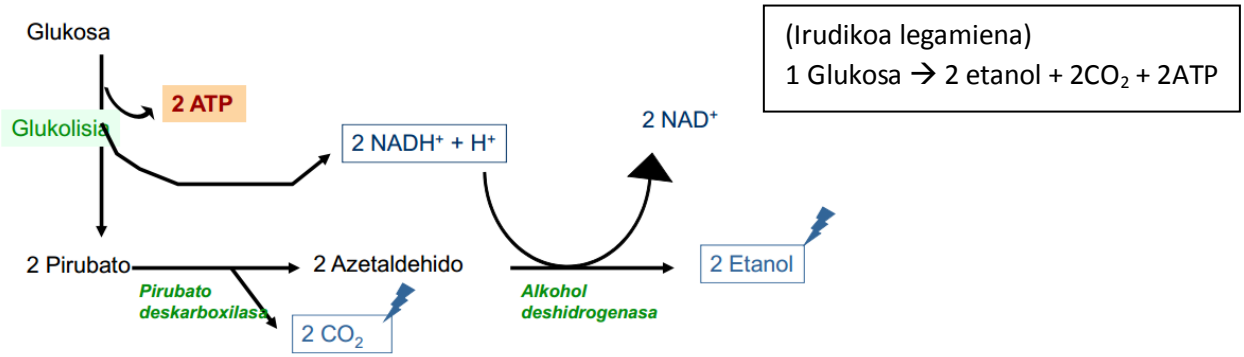
Motak:

<u>Hartzidura alkoholikoa:</u>

$(C^0)_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ (C^{+4})O_2 + 2\ (C^{-4})_2H_5OH$

Substratuaren C-ren erredox maila = 0.
Ekoiztutako C-ren erredoxk maila = 2·(+4) + 2·(-4) = 0

- Legami batzuek anaerobiosian burutzen dute: *Saccharomycescerevisiae*
- Azken produktuak: etanola eta CO_2 dira.
- Industrian erabilerak ditu: edari alkoholdunak, ogia…

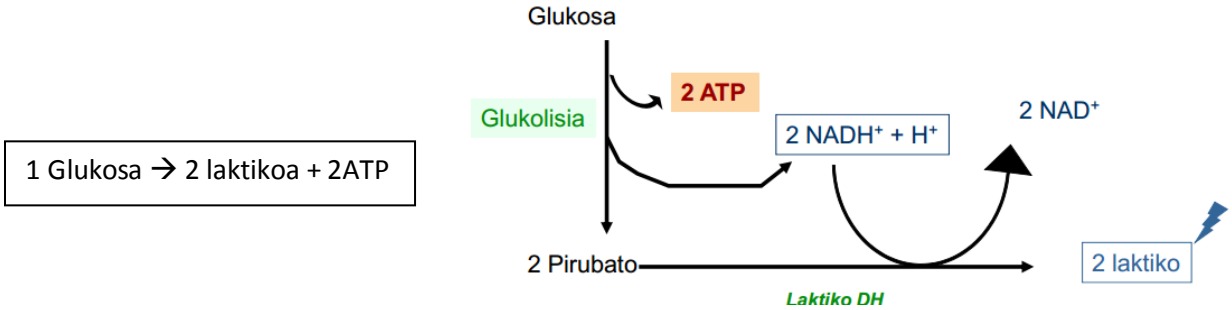


<u>Hartzidura laktikoa:</u>

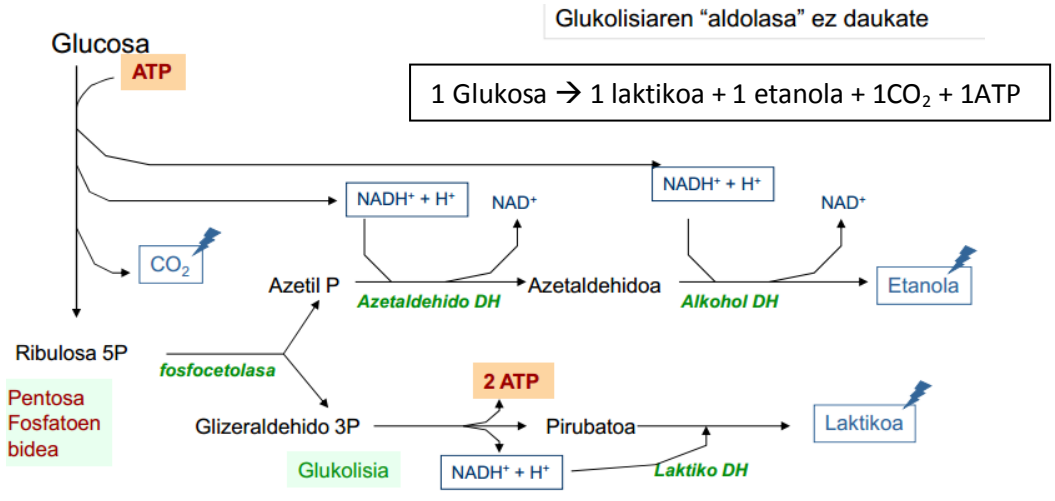
$(C^0)_6H_{12}O_6 \rightarrow (C^{+4})O_2 + (C^{+4})_2H_5OH + (C^0)_3H_6O_3$

Substratuaren C-ren erredox maila = 0.
Ekoiztutako C-ren erredoxk maila = (+4) + (-4) + 0 = 0

- Azido laktiko taldeko bakterioek burutzen dute. Aerotoleranteak dira (aerobiosian eta anaerobiosian burutzen dute).
- Industrian oso erabiliak esnekiak egiteko.
- Bi hartzidura desberdintzen dira:
  - **Hartzidura homolaktikoa**: azido laktikoa da ekoizkin bakarra.
    - Adibidez: *Lactococcus, Lactobacillus, Pedicoccus…*



  - **Hartzidura heterolaktikoa**: azido laktikoaz gain, etanola eta CO_2-a sortzen da.
    - Adibidez:*Leukonostoc, Lactobacillus*batzuk…



Beste hartzidura mota batzuk:

Hartzidura	Substratua	Azken produtuak	Mikroorganismoak
Azido-mixtoa	Hexosa	Etanola + 2,3butanodiola + sukzinikoa + laktikoa + azetikoa + formikoa	Bakterio enterikoak *Escherichia* *Salmonella* *Shigella* *Klebsiella* *Enterobacter*
butirikoa	Hexosa	butirikoa + azetikoa + H_2 + CO_2	*Clostridium butyricum*
butanolarena	Hexosa	Butanoal + azetikoa + azetona + etanola + H_2 + CO_2	*Clostridium acetobutylicum*
Propionikoa	laktatoa	propionikoa + azetikoa + CO_2	*Lactobacillus* batzuk *Propionibacterium* *Clostridium propionicum*
kaproikoa	azetikoa + etanola + CO_2	kaproatoa + butirikoa+ H_2	*Clostridium kluyveri*

Hartziduraren ezaugarri orokorrak:

- Energia:
  - ATPa metabolismo zentralean sortu (sustratu mailako fosforilazioa)
  - Prozesu honetan ez da elektroi garraio katerik erabiltzen.
- Ahalmen erreduzitzailea:
  - Biosintesirako beharrezkoa den ahalmen erreduzitzailea metabolismo nagusian sortuko da (pentosa fosfatoen bidean)
- Metabolito aitzindariak
  - Metabolismo zentralean
  - Krebs-en zikloan (zatituta egiten dute)
- O_2-aren beharra:
  - Hartzidura gertatzeko oxigenoa ez da beharrezkoa, hartziduran aerobiosian ere eman daitezke ordea.
  - Mikroorganismo hartzitzaileak:
    - Derrigorrezko anaerobioak
    - Aukerazko anaerobio arruntak (aerobiosian arnasketa burutzen dute eta anaerobiosian arnasketa anaerobioa)
    - Aukerazko anaerobio aerotoleranteak
      - Azido laktikoko hartziduragileak
- Mikroorganismo batzuk soilik hartziduraren bidez bizitzeko gai dira.

Hartziduraren bidez arnasketan baino energia gutxiago lortzen da:

Substratuaren oxidazioa ez da osoa izaten eta ekoizkinek energia gordetzen dute.

5. Azukreak ez diren konposatuen erabilera

POLISAKARIDOEN ERABILERA

Polisakaridoak: zelulosa, almdoia, glukogenoa, agarra… Hauek ezagunak dira mikroorganismo ugaritan aurkitzen direlako.

Entzima extrazelularrak eta ektozelularrak sintetizatzen dituzte mikroorganismoek jariatu eta polisakarido hauek degradatzeko monomerotara. Monomero hauek mintz plasmatikoa sintetizatuko dute eta metabolismo nagusiaren bide biokimikoen bidez degradatuak izango dira, normalean pirubatorarte eta hortik bide ezberdinak hartuz.

PROTEINEN ERABILERA

Polisakaridoen antzekoa da, entzima extrazelular eta ektoentzimen bidez aminoazidotan deskonposatzen dira, hauek mintz plasmatikoa zeharkatuko dute eta zitoplasmaren barnean degradatuak izango dira. Degradazio hau egiteko, desaminazioak eta transaminazioak gertatuko dira, azido organikoak lortuz.

LIPIDOEN ERABILERA

Lipidoak lipasa baten bidez (extrazelularrak) degradatuko dira glizerol eta gantz azidoetan. Bi molekula hauek zeluletara sartu eta jadanik prest daude erabiltzeko edo degradatzeko. Degradatzean:

- Gliol→ gliol3P →glukolisia
- Gantz azidoak → (b.ox) Azetil-CoA→ azido trikarboxilikoen zikloa

KONPOSATU C1-EN ERABILERA

- Karbono atomo bakarra daukate

CH_4	metanoa
CH_3OH	metanola
HCHO	formaldehidoa
HCOOH	formikoa

- Karbono atomo bat baino gehiago, baina ez dago lotura C-C zuzenik

CH_3-O-CH_3	dimetil eterra
CH_3-O-COO-CH_3	dimetil karbonatoa
CH_3NH_2	metilamina
$(CH_3)_2$NH2	dimetilamina
$(CH_3)_3$NH2	trimetilamina

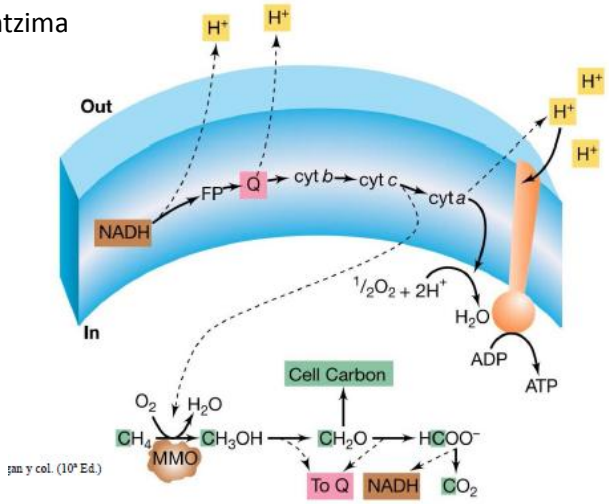
Kimioorganotrofo guztiek ezin dituzte molekula hauek erabili.

Metilotrofoak: C_1 erabiltzeko gai diren kimioorganotrofoak.

- Derrigorrezko metilotrofoak: bakarrik molekula hauek erabiltzen dutenak.
- Aukerazko metilotrofoak: beste molekula batzuk badaude ere erabil ditzakete.

Metanotrofoak:metilotrofo mota bat dira, metanoa erabiltzeko gai direnak. Hauek metanoa erabiltzen dute energia, karbono zelularra eta ahalmen erreduzitzailea lortzeko. Prozesu honek fase ezberdinak ditu:

1. Metanoaren oxigenazioa (-4) metanola arte (-2)
    a. Metano monooxigenasa entzima
    b. Oxigenoa beharrezkoa da
    c. Ez da energia sortzen

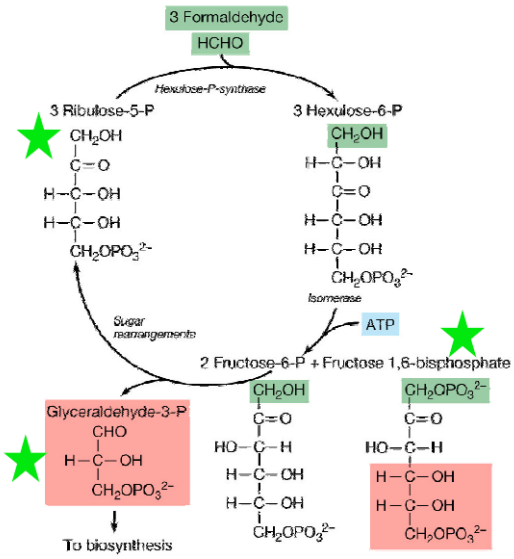


2. Metanola oxidatzen da (-2) CO2 (+4) arte
    a. Ahalmen erreduzitzailea sortzen da. Hau energia lortzeko erabil daiteke.
    b. Formaldehidoa sortzen da, erabilgarria metabolito aitzindariak sintzetizatzeko.

Formaldehidoa:

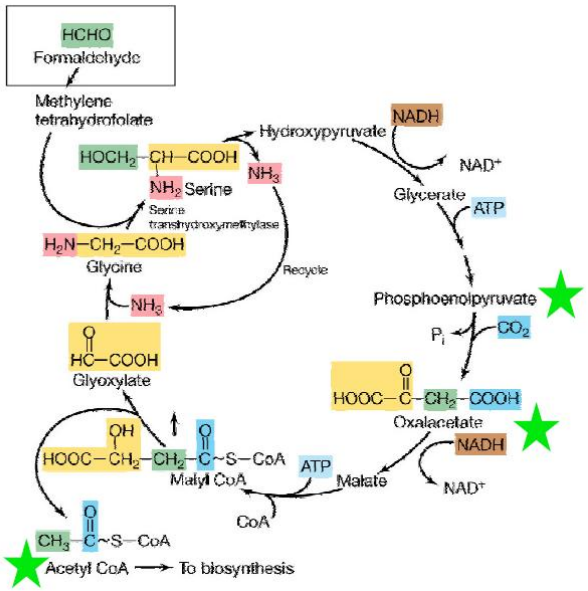
2 metanotrofo mota daude, eta mota bakoitzak sistema bat edukiko du formaldehidoa metabolizatzeko.

Metanotrofo mota I:Erribulosamonofosfatoaren zikloa. Mikroorganismo hauek formaldehidoa erabiliz glizeraldehido3P lortzeko gai dira. Prozesuak ATParen gastua eskatzen du:
3Formaldehido + ATP → Glizeraldehido3P + ADP+Pi



Metanotrofo mota II:Serinaren zikloa.

Prozesu honetan formmaldehidoa, CO_2, CoA, 2NADH+H^+ eta 2ATP behar dira. Lortzen duguna Azetil-CoA, 2NAD^+, … lortzen dira.



*Adi! Ziklo hauek ez ikasi!!

Ahalmen erreduzitzailea:

[…]

Orain begiratu irudia eta dena bateratu.

Bakarlana: Arnasketa aerobioa: balantzeak

1.ARIKETA Glukosa baten arnasketa aerobioa CO2 arte: glukolisia→azetil-CoA→ A.T.Z.

- Zenbat ATP lortzen substratu mailako fosforilazioarenbidez?

- Zenbat ATP lortzen dira sortutako NADH+H^+guztia oxidatzen denean?

- Zenbat ATP lortzen dira sortutako FADH2 guztia oxidatzen denean?

- Beraz, Zenbat ATP lortzen dira oxidazio-fosforilazioan?

2.ARIKETA Glukosaren arnasketa aerobioa

Zenbat glukosa molekulabeharko du zelula batek metabolito aitzindari guztiak lortzeko?

3. ARIKETA Bakterio bat kultibatzen ari gara. Kultibo medioan karbono eta energia iturri bakarra malatoa da.

- Nola lortuko ditu metabolito aitzindariak?

- Nola lortuko du ahalmen erreduzitzailea?

- Nola lortuko du energia?

6.KIMIOLITOTROFOAK ETA FOTOTROFOAK

1. Kimiolitotrofoen ezaugarri orokorrak
2. Kimiolitotrofo motak
3. Fototrofia eta fotosintesia
4. Bakterioen fotosintesia: ezaugarriak eta motak
5. Sistema fotosintetizatzaileen osagaiak
6. Fotosintesi oxigenikoa eta anoxigenikoa

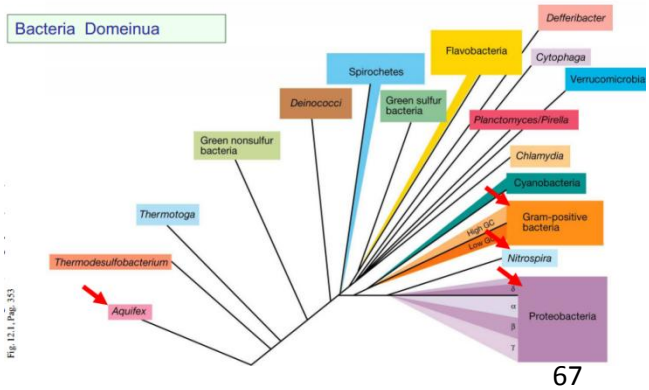
Kimiolitotrofia: konposatu kimiko bat erabiliko dute eta molekula hauek izango dira energia iturria eta elektroi emailea. Bizimodu hau bakarrik prokariotoen artean ematen da.

1. Kimiolitotrofoen ezaugarri orokorrak:

- Fisiologikoki anitzak
  - Energia iturria = elektroi emailea, oso espezifikoa.
  - Adib) Nitrogenoaren kimiolotitotrofoak, sufrearen kimiolitotrofoak… talde desberdinak sustantziaren arabera. Bakterio nitrifikatzaileek bakarrik amonioa edo bakarrik nitritoa.

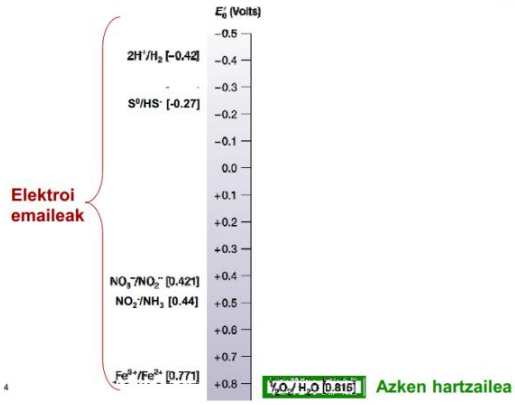
Mota	Energia iturria / / e^- emailea	e^- hartzailea	Ekoizkina
Hidrogenoaren bakterioak	H_2	O_2 (NO_3^-, $SO_4^=$, CO_2)	H_2O
Karboxidobakterioak	CO	O_2	CO_2
Bakterio nitrifikatzaileak	NH_4^+	O_2	NO_2^-
Bakterio nitrifikatzaileak	NO_2^-	O_2	NO_3^-
Sufrearen bakterioak	$S^=$, S^0, $S_2O_3^=$	O_2 (NO_3^-)	$SO_4^=$
Burdinaren bakterioak	Fe^{2+}	O_2	Fe^{3+}

- Filogenetikoki anitzak:
  - Bacteria: hauen artean ere oso talde ezberdinak dira kimiolitotrofoak.
    - (Irudia adibidea da)
  - Archaea



- Oxigenoarekiko erlazioa:
    - Gehienak aerobioak
    - Batzuk aukerazko anaerobioak (sufrearen bakterio batzuk eta hidrogenoaren bakterio batzuk)
    - Gutxi derrigorrezko anaerobioak: hauek lehengo taulan elektroi hartzailea oxigenoa ez dutenak dira (hidrogenoaren eta sufrearen bakterio batzuk)
- Karbono iturria:
    - Gehienak autotrofoak
    - Batzuk aukerazko heterotrofoak

NOLA LORTZEN DUTE ENERGIA?



Azken hartzailea normalean oxigenoa izango da, beraz, aerobioak direla ulertuko dugu.

Energia oxidazio-fosforilazioaren bidez lortuko dute (arnasketa gertatuko da), ondorioz:

- Elektroi garraio kateak dauzkate, baina
- Erredox potentzialaren aldaketa emailetik hartzailea arte askotan ez da handia.
- Protoi gradientea sortzen da, baina askotan gradientea ez da oso altua
- ATP gutxi sortzen da.

NOLA LORTZEN DUTE AHALMEN ERREDUZITZAILEA?

Ahalmen erreduzitzaileaerredox potentzialaren zutabean -0,32an dago, NAD^+/NADHren potentziala horixe litzateke hain zuzen ere. Nola gertatzen da?

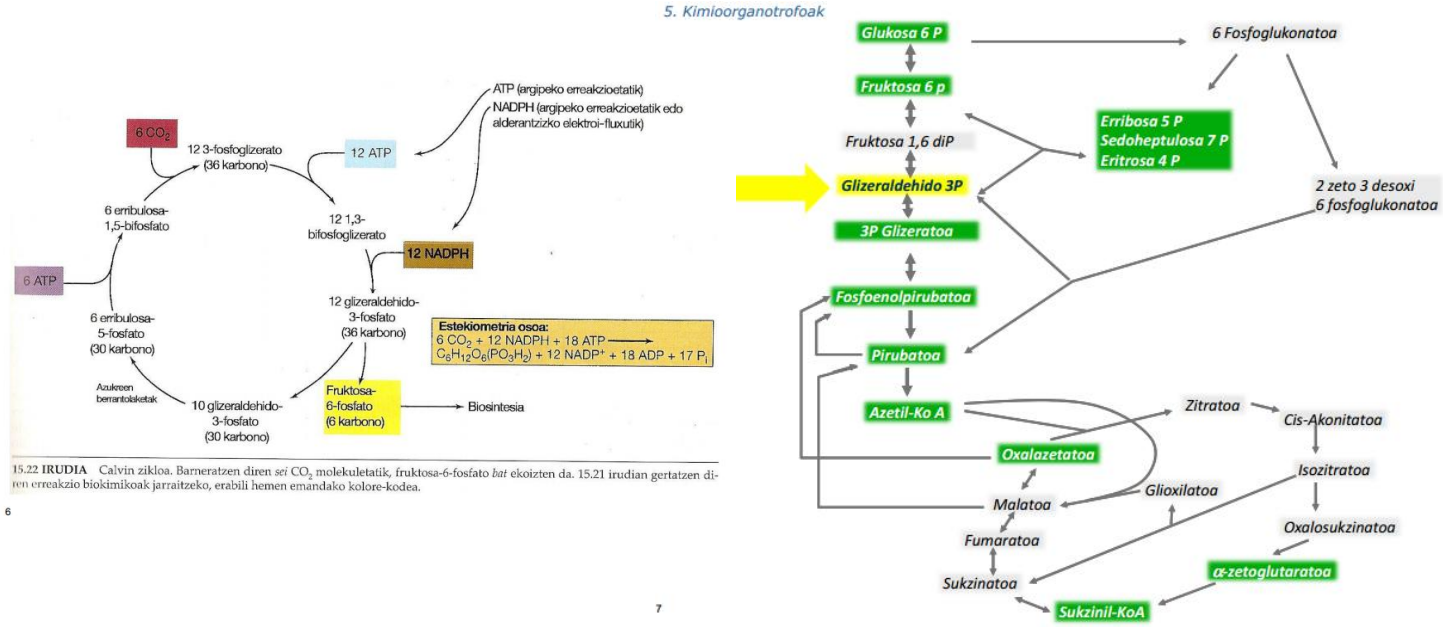
- Emaileak elektroiak NAD^+-ari ematen dizkio
    - Emailearen erredox potentziala NAD^+-arena baino negatiboagoa denean.
- Baina, burdina, nitrito eta beste kasuetan potentzialak oso positiboak dira, eta balio negatiboetarantz egiteko energiaren beharra dago. Kasu hauetan: <u>Alderantzizko elektroi garraio katearen bidez:</u>
    - Emailearen erredox potentziala NAD^+-arena baino positiboagoa denean.
    - Energia erabiliz, elektroiak emailetik NAD^+ arte mugiarazten dira. Energia zelularentzat beharrezkoa da eta prozesu honetan xahutu egiten da. Beraz, hau soilik guztiz beharrezkoa denean gertatuko da.

NOLA LORTZEN DUTE METABOLITO AITZINDARIAK?

- Organismo hauek autotrofoak dira, beraz, sistema bereziak erabiliko dituzte airean eta uretan disolbatuta dagoen CO_2a finkatzeko.
- Calvin zikloan glizeraldehido 3P lortu dezakete. Honetatik gainontzekoak

1. *Honekin lotutako galderak:*
    - *Zer dira karboxisomak?*
    - *Nolako egitura daukate?*
    - *Zertarako balio dute?*
    - *Zein mikroorganismo motatan daude?*

- Metabolito aitzindarien ekoizpena 2 etapatan gertatzen da:
    1. CO2-aren finkapena *Calvin zikloaren bidez:* (honela lortzen dute molekula organiko bat sortzea)
        - CO2 finkatzen da (erribulosadiPkarboxilasa edo RubisCo)
            - Erribulosa 1,5diP + CO_2 + H_2O → 2,3-fosfoglizerato
        - Finkatutako CO2-aren erredukzioa
            - 2,3-fosfoglizerato +2ATP + 2NADH+H^+→<u>2 glizeraldehido 3P</u> + 2NAD^+
        - CO2-aren hartzailearen errekuperazioa (fosforibulokinasa)
            - 5 glizeraldehido 3P + 3ATP → 3 erribulosa 1,5diP + 2ADP



CO2a molekula organiko bezala finkatzen da eta ondoren hortik erraza da ateratzea beste molekulak.

2. Kimiolitotrofo motak

NITROGENOAREN KIMIOLITOTROFOAK: NITRIFIKAZIOA

<u>Nitrifikazioa</u>: Mikroorganismoek eragindako amoniakoaren oxidazioa egiten dute nitrato arte.

Talde honetan dauden bakterioen izen orokorra *bakterio nitrifikatzaileak* izango dira:

- Derrigorrezko aerobioak: guztiak
- Derrigorrezko eta aukerazko kimiolitotrofoak (gehienak derrigorrezkoak)
- Derrigorrezko eta aukerazko autotrofoak (gehienak derrigorrezkoak)

Bi bakterio nitrifikatzaile mota dago:

- Bakterio nitritanteak (talde nitrosoa): amoniakoa → nitritoa
- Bakterio nitratanteak (talde nitroa): nitritoa → nitrato

**Ez nahastu aurreko izenak honekin:

Kimioorganotrofoak: batzuek oxigenoa ez dagoenean nitratoa erabil dezakete azken elektroi hartzaile gisa. Hau gertatzen denean arnasketa anaerobioa dutela esango dugu. Hauek prozesu hau nitratotik nitritora edo nitrogenorarte (N2) jarrai dezakete, hemen bi talde bereiztuko liratekeelarik. Bakterio hauei *desnitrifikatzaileak* ere deitzen zaie.

Kimiolitotrofoak: Mikroorganismo hauek arnasketa aerobioa burutuko dute, oxigenoan amaitua. Gainera, amonioa edo nitritoa elektroi emaile gisa erabiliko dute, energia iturri. Azken produktua kasu honetan, amoniotik nitritoa eta nitritotik nitratoa izango dira. Bakteroi hauek organismo *nitrifikatzaileak* izango dira.

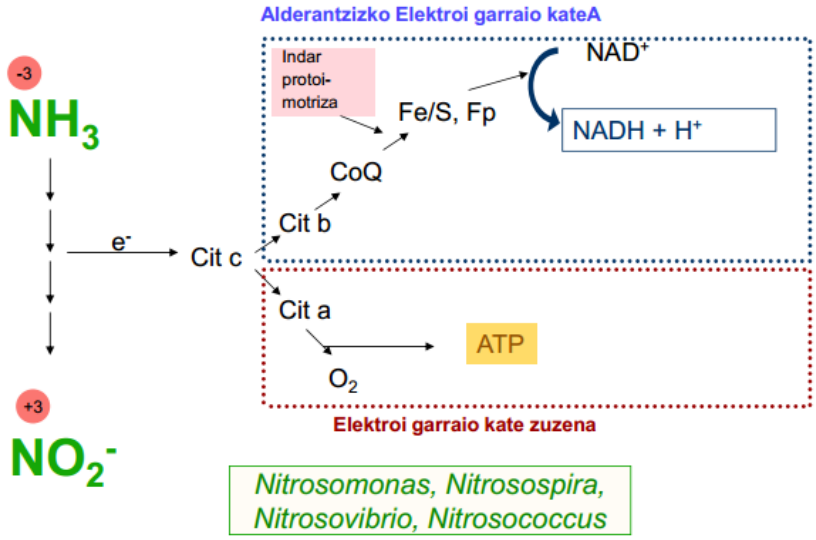
Talde nitrosoaren nitrifikatzaileak:

Amonioa erabiliko dute elektroi emaile gisa. Amonioaren potentziala nahiko txikia da, oxigenoa gertu dago (enaizenterau) energiaren aldetik ez dute inongo arazorik. Ahalmen erreduzitzailea sortzeko ordea alderantzizko elektroi garraio kate baten beharra dago, eta honek energiaren gastua suposatuko du.

Prozesu orokorra: Nitrosomonas, nitrosospira, nitrosovibrio, nitrosococcus… daude talde honetan.

Amonioa edo amoniakoa da elektroi emailea eta nitritoa azken produktua. Prozesu honetan elektroiak askatzen dira: elektroi garraio katean sartu eta azken elektroi hartzailea oxigenoa delarik. Garraio honetan (nahiko laburra) protoiak eratuko dira eta horiekin ATPa lor daiteke (betikoa).

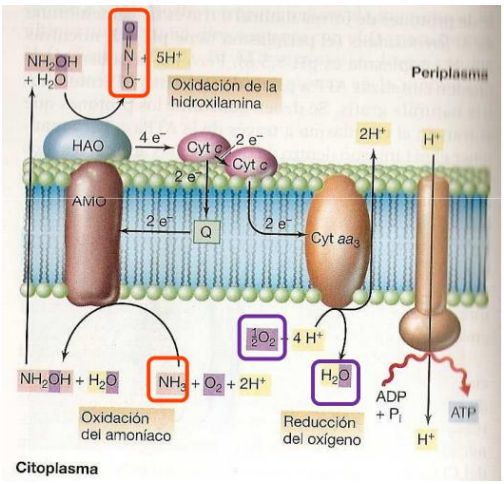
Baina, ahalmen erreduzitzailea lortzeko alderantzizko elektroi garraio katearen beharra dago.



Nola dago kokatuta elektroi garraio katea mintzean?

AMO: amoniakoaren lehenengo oxidazioa burutuko du. Lehenengo oxidazio honetan oxigenoa ere inplikatuta dago, monooxigenasak beti behar baitute.

HAO: hidroxilaminaren oxidazioa nitritorarte. Bigarren oxigenazio honetan elektroiak askatzen dira, batzuk elektroi garraio kate normal bat betetzeko eta beste batzuk lehenengo etapan dagoen amoniakoarekin dagoen oxigenoa erreduzitzeko.



AMO → amoniako-monooxigenasa

HAO → hidroxilamina-oxidoerreduktasa

Q → kinonak

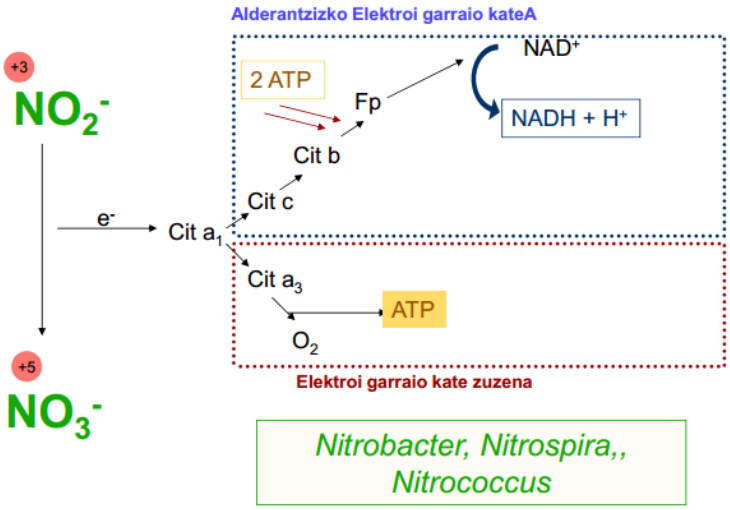
Cyt c, periplasmikoa

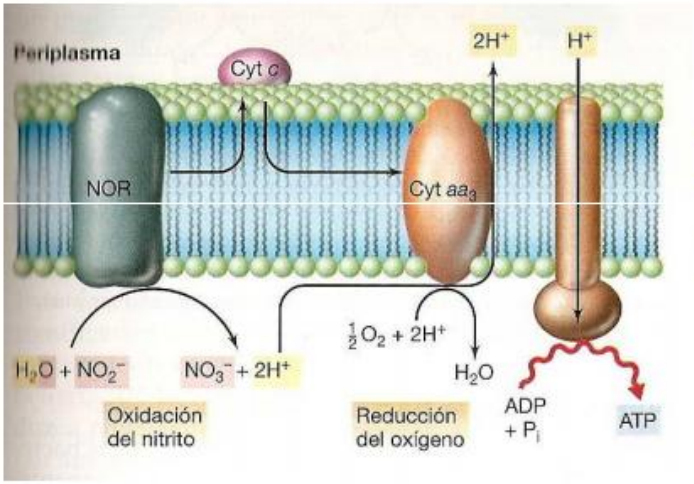
Cyt c, mintzakoa

Cyt aa3

Talde nitroaren nitrifikatzaileak:

Kasu honetan prozesua oso antzekoa da.





NOR → nitrito-oxidoerreduktasa

Cyt c, periplasmikoa

Cyt aa3

Nitrifikatzaileak orokorrean (ondorioa):

- Oso energia gutxi lortzen da
- Hazkuntza netoa: gr zelula / gr substratu → oso baxua
    - Hau ondo dago guretzat, substratu asko beharrezkoak direlako:
        - Amoniakoa eta aminak
        - Toxikoak dira eta kalteak eragin ditzakete
    - Hondakin asko sortzen dira
        - Nitrito
        - Nitrato

SUFREAREN KIMIOLITOTROFOAK:

Energia eta elektroi emailea beti da sufrearen konposatuak. Normalean aerobioak dira baina batzuek nitratoaren arnasketa anaerobioa ere burutuko dute. Sortzen den produktua sulfatoa izango da.

<u>Ezaugarriak:</u>

- Gehienak aerobioak
    - Batzuek nitratoaren arnasketa anaerobioa burutzen dute
- Gehienak derrigorrezko kimiolitotrofoak
    - Batzuk aukerazkoak
- Gehienak autotrofoak
    - Batzuk heterotrofoak

Sufrearen kimiolitotrofia:

- Sufrezko tarteketak daukate askotan
- Bacteria domeinuan:*Thiobacillus,Beggiatoa…*
- Arkeoak: *Sulfolobus*

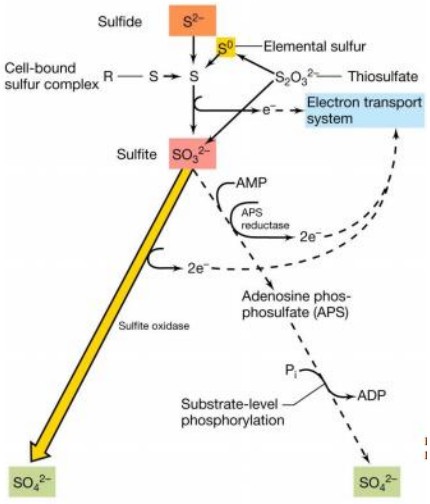
<u>Nola lortzen dute ahalmen erreduzitzailea?</u>

Elektroi emailea (Sº/HS-) = -0,27Voltatan dago.

Emaileen elektropotentziala hartzaileena baino askoz elektronegatiboagoa da. Baina ahalmen erreduzitzailea lortzeko (-0,32V) beharrezkoa da berriro ere **alderantzizko elektroi garraio katea**, baina ez da oso luzea izango.

<u>Nola oxidatzen da elektroi emailea?</u>

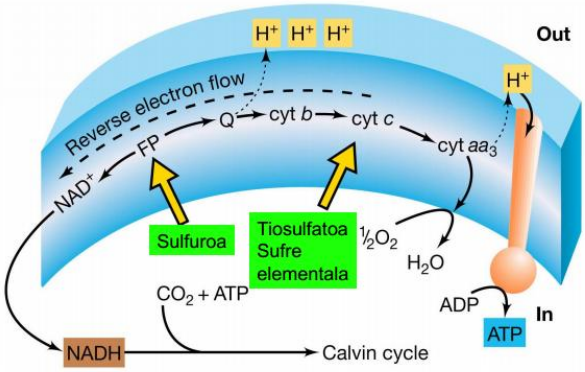
Sufre erreduzitoasulfitorarte oxidatzen da eta prozesu honetan elektroiak askatuko dira oxidazio bat delako. Elektroi horiek elektroi garraio kate batean sartuko dira eta baldintza aerobioetan oxigenorarte eta anaerobioetan nitratorarte (usteot) mugituko dira.



Bigarren etapan, oxidazio zuzena burutu daiteke edo bide konplikatuago bat. Bietan elektroiak askatzen dira eta elektroi horiek elektroi garraio kate batean sartuko dira.

Eskema hau sufre mota batekikoa da, beste bakterio batzuek zuzenki sulfuroa (goiko naranja) erabiliko dute sulfatora oxidatzeko, bitartekorik gabe.

Orokorrean prozesu honetan elektroiak ateratzen direla eta elektroi hauek elektroi garraio kate batean sartzen direla da garrantzitsua. Adibide bat:



*Sufre iturria tiosulfatoa edo sufre elementala denean, elektroi gutxiago askatzen dira eta ondorioz, protoi gutxiago lortzen dira (energia emaile txarragoak dira).

Ahalmen erreduzitzailea sortzeko aipatu bezala alderantzizko elektroi garraio katea gertatuko zen, eta goikoa jarraiki, energia beharrezkoa izango litzateke autotrofo hauetan CO_2 finkatzeko.

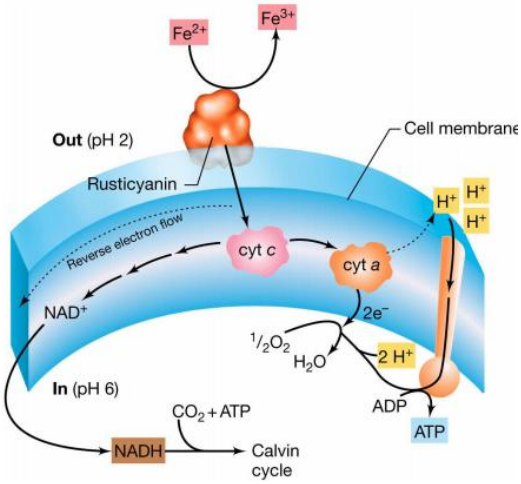
BURDINAREN KIMIOLITOTROFOAK:

Fe^{2+} da elektroi emailea eta produktua Fe^{3+}. Burdinaren kimiolitotrofo guztiak derrigorrezko aerobioak izango dira.

Thiobacillusferroxidans:

- Ioi burdina (II) oxidatzen dute burdina (III) lortu arte, aerobiosian
- Ingurune azidoetan (pH=2 gutxi gorabehera) bizi dira, burdina Fe^{2+} gisa mantentzen den guneetan
  - Baldintza azido hauen pean ioi burdina (II) egonkorra da
  - Derrigorrezko azidofiloa da, hala ere, beraien barnean pH-a nahiko normal mantentzen da, 6,5ean gutxi gorabehera. Protoi kontzentrazio ezberdintasun honek arazoak sor ditzake barne gune eta kanpo guneen artean, izan ere, zaila izango da kanpoko protoiak barnera sartzea ekiditea eta barneko pHa neutroa mantentzea. Prozesu honetan burdina oso garrantzitsua da, bera oxidatzean elektroiak askatzen badira eta hauek oso garrantzitsuak baitira sartzen diren protoiak neutralizatzeko.
  - Protoi gradientea berez sortzen da ingurunean
    - H^+ gehiegi sartzen dira zelulara
    - Oxigenoaren arnasketaren helburua:
      - Energia lortzea
      - H^+ zitoplasmatik desagertaraztea

Prozedura:



Prozesu honen bidez arnasketa aerobioa gertatzen da. Protoiak ere kanporatu egiten dira eta burdina oxidatzen da.

Mikroorganismo hauek ahalmen erreduzitzailea eta metabolito aitzindariak ere lortu behar dituzte. Elektroi emailearen elektropotentziala oso altua denez, beharrezkoa da alderantzizko elektroi garraio katea.

Autotrofoak izango dira beraz, CO_2 Calvin zikloaren bidez finkatuko dute.

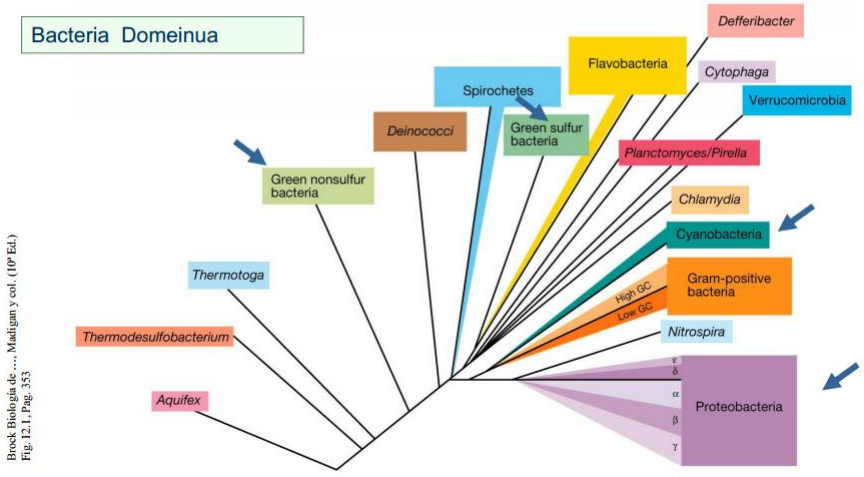
3. Fototrofia eta fotosintesia:

- Fototrofoa
  - Energia iturritzat argia erabiltzen duen organismoa
  - Fotosintesia burutzen duen organismoa
- Fotosintesia
  - Argi-energia energia kimiko bihurtzen duen prozesua

Fotosintesia prokariotengan:

- **Bacteria domeinuan:**zianobakterioak, protoklorofitoak, bakterio gorriak, b. berdeak, heliobakterioak
- **Archaea domeinuan:** badaude fototrofo batzuk argiaren energia erabiltzeko gai direnak, baina ez fotosintesiaren bidez.
  - Bakteriorodopsinaren (proteina) bidez posible egiten dute protoien gradientea eratzea eta energia zelularra eratzea (hau sin+ jakin daigun)

Adb: Bakterio fototrofoen aniztasuna



4. Bakterioen fotosintesia: ezaugarriak eta motak:

Ezaugarri orokorrak

- Fase argitsua
  - Argiko energia energia kimiko bihurtzen da.
  - Ahalmen erreduzitzailea sortzen da
- Fase iluna: fase hau gertatzeko argia zuzenki ez da beharrezkoa
  - CO_2 erreduzitzen da konposatu organikoak sortuz
  - Fase argitsuan sortutako energia eta ahalmen erreduzitzailea beharrezkoak dira CO_2aren finkapena eman dadin.

Nola lortzen dute energia?

- Fotofosforilazioaren bidez
  - Argiak bultzatutako elektroi garraioa sortzen da (argiaren energiak molekulak aktibatzen baititu)
  - Elektroien transferentziak protoi gradientea sortzen du garraio katearen etapa batzuetan
  - Energia mota hau erabilgarria da ATPa sortzeko (ATPasa)
- Ez dago substratu-mailako fosforilaziorik

Nola lortzen dute ahalmen erreduzitzailea?

- $NADP^+$aren FOTOERREDUKZIOari esker
- Erredukzio hori emateko elektroi emaileak beharrezkoak dira:
  - Ez-organikoak: H_2O –> Oxidatzean O_2 (fotosintesi oxigenikoa)
  - Ez-organikoak: H_2, H_2S, Sº, $S_2O_3^{2-}$ } anoxigenikoa
  - Konposatu organikoak } anoxigenikoa

Nola lortzen dituzte metabolito aitzindariak?

- Gehienak autotrofoak
- CO_2 finkatzen dute
  - Calvin zikloaren bidez (gehienek)
  - ATZ erreduktiboaren bidez, hau da, Krebs alderantziz eginez (bakterio berdeak, hauek fotosintesi anoxigenikoa burutzen dute)
- Aitzindari guztiak sortzeko metabolismo nagusia erabiltzen dute

FOTOSINTESI MOTAK (laburbilduz):

ENERGIA ITURRIA	ELEKTROI EMAILEA	ELIKA MAILA	FOTOSINTESI MOTA
Argia	H_2O	Fotolitotrofoa	OXIGENIKOA
Argia	SH_2, S^0, $S_2O_3^=$, H_2	Fotolitotrofoa	ANOXIGENIKOA
Argia	Konposatu organikoak	Fotoorganotrofoa	ANOXIGENIKOA

5. Sistema fotosintetizatzaileen osagaiak

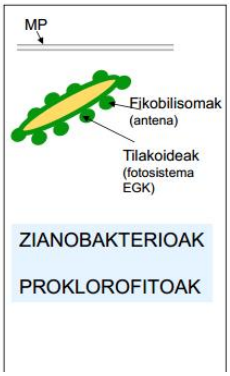
Aparatu fotosintetizatzailearen osagaiak:

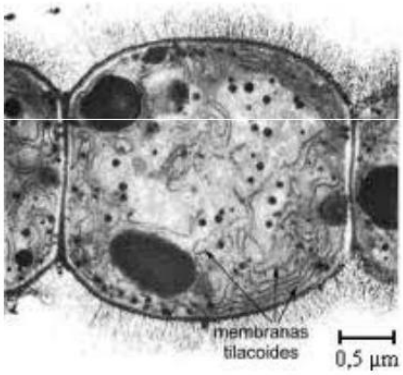
1. Antena sistemako pigmentuak
    a. Argi energia xurgatzea (fotosentikorrak dira)
    b. Energia erreakzio-tokira bidaltzea
        i. Adib. klorofila, bakterioklofofilak, karotenoideak, fikobiliproteinak…
2. Erreakzio-tokia edo fotosistema: antena pigmentuetatik datorren energia jasotzen da
    a. Bertan dagoen pigmentua fotoaktibatzen da eta elektroiak molekula garraiatzaile bati (kinonak…) pasatzen dizkio, elektroi garraio katea aktibatuz
        i. Pigmentu berak: klorofila eta bakterioklorofilak. Egoera berezian daude (proteinei lotuta) errazago kitzikatzeko. Gainera, elektroi garraio katean kokapen ona dute.
3. Elektroi garraio katea
    a. Fotosistematik elektroiak hartzen ditu
    b. Elektroiak garraiatzea protoi gradientea sortuz
        i. Garraiatzaileak: Fe eta S dituzten proteinak, kinonak, zitokromoak…

Aparatu fotosintetikoen kokapena:

Zianobakterioak eta proklorofitoak:

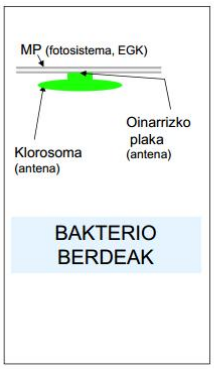
Barne mintzetan, tilakoideetan hain zuzen ere, daude kokatuta. Tilakoide edo mintz honen azaleraren partean fikobilisoma izeneko egiturak daude kokatuta.

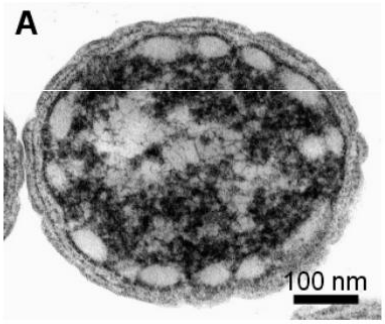




Fikobilisoma hauek antena gisa jokatzen dute, aparatu fotosinteitizatzailearen jarduerari hasiera emanez.

Bakterio berdearen kasua:

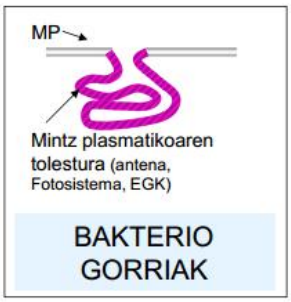


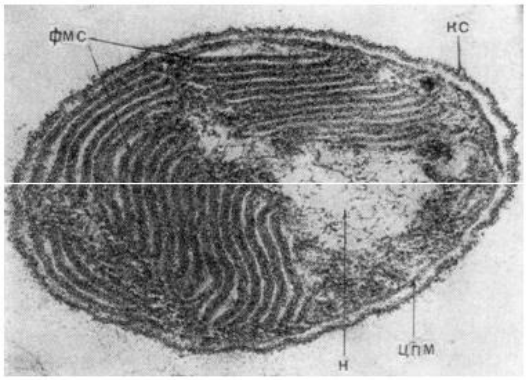


Kasu honetan fotosistema eta elektroi garraio katea mintz plasmatikoan daude.

Bakterio gorrien kasua:

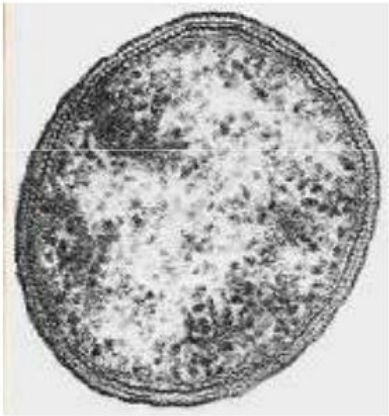
Hauen argazki elektronikoan zitoplasman mintzen inbajinazio asko ikusten dira. Honela azalera fotosintetikoak handitzen dituzte, mikroorganismo mota honetan antena pigmentua, fotosistema eta elektroi garraio katea mintz plasmatikoan kokatuta daudelako.





Heliobakterioen kasua:

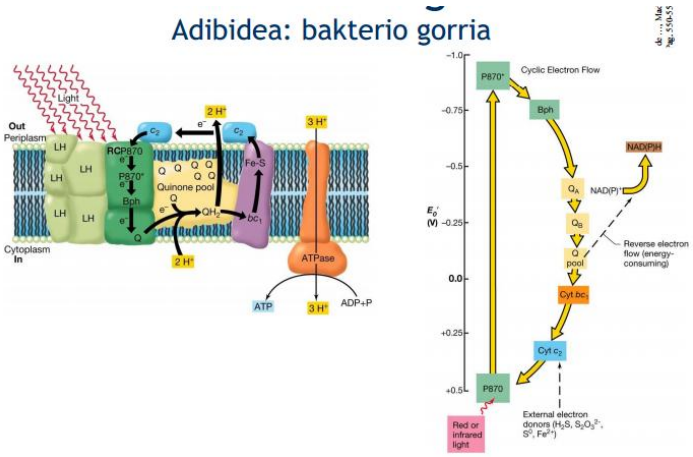
Argazki honetan ezin da ikusi ezer berezirik. Hala ere, dena mintz plasmatikoan gertatuko da.



6. Fotosintesi anoxigenikoa eta oxigenikoa(garrantzitsuena)

FOTOSINTESI ANOXIGENIKOA: adib. bakterio gorria:

Mikroskopioan tindatu gabe kolore gorriz agertzen direlako dira bakterio gorriak, pigmentu gorriak dituzte. Sufre metaketak ageri dituzte.

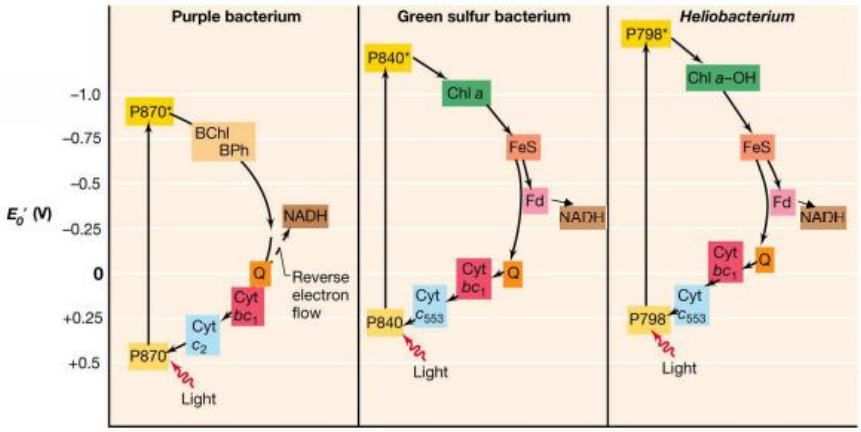


Ezkerreko irudia: Sistemaren hasiera argi gorriarekin hasten da. Argi gorria hartzeak pixka bat toki sakonetan egotea ahalbidetzen die, gune horietan eskuratzeko ez delako zaila. LH-ak argiaren energia harrapatu eta ondoko fotosistemara igaroko dute. Momentu horretan aktibatu egingo da, elektroiak emateko joera handia izanez. Ingurunean elektroi garraiatzaileak badaude, fotosistematik garraiatzaile ezberdinetara igaroko doa, elektroi garraio sistemari hasiera emanez. Aldi berean, fotosistemainaktibatu eta hasierako egoerara iritsiko da. Protoi gradientearen energia ATPasa baten bidez ATP bihur daiteke.

Eskuineko irudia: fotosistemak normalean izaten duen erredox potentziala erakusten du (behe behekoa). Hortik zuzenean gorantz joanda, fotosistema aktibatuaren energia maila erakusten du, eta eskuineko itzulerak elektroi garraio katea. Bph: bakterio pheofitina. Ondoria: fotosistemak elektroia ematen duenean berriro ere desaktibatua izango da, hasierako energia maila hartuz. Fotosistema aktibatzeko energia iturria dagoen bitartean, prozesu ziklikoa dela esan daiteke.

Gainera, elektroiak ez dira galtzen garraio prozesua ziklikoa delako, beraz, *energia* lortzeko elektroi emailea ez da beharrezkoa.

Ahalmen erreduzitzailea ordea, elektroi garraio katetik ateratzen da. Elektroi emailea (externalelectrondonors: H_2S, $S_2O_3^{2-}$, Sº, Fe^{2+}) eta energia (reverseelectronflow, energyconsuming) beharrezkoak dira.



Sistema gorriena (purple):

- Ez da oso negatiboa
- $NAD(P)^+$ erreduzitzeko ($NADPH^+$ sortzeko) alderantzizko garraioa beharrezkoa da
    - Energia erabili
- ATPa sortzeko: fotofosforilazio ziklikoa: bakterioklorofila (Bkl) elektroi emailea eta hartzailea da. Fotosistema bakarra dute.

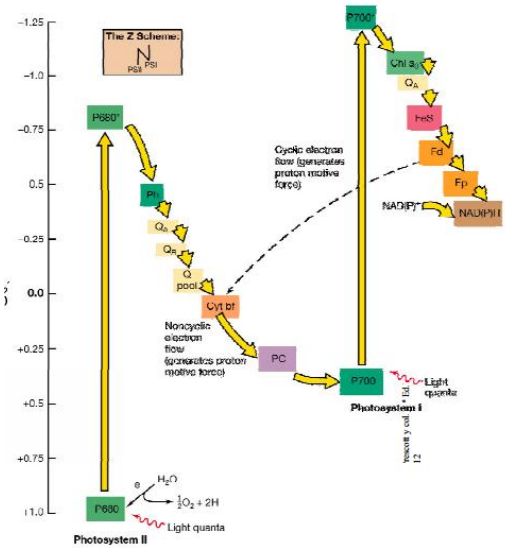
Sistema berdea eta heliobakterioena:

- Oso potentzial erredox negatiboak lortzen dute aktibatzean
- Ferredoxina erreduzitua $NAD(P)^+$ erreduzitzeko gai da

FOTOSINTESI OXIGENIKOA:

Feoftina (Pheo), plastozianina (PQ),plastokinonak (PQ), klorofila A (A), ferredoxina (Fd), flaboproteina (Fp)

2 fotosistema, bat aktibatu eta elektroi garraioa eman ostean, 2. fotosistema ere aktibatu beharra dago. Prozesu hau gertatzen bada, prozesu honen azken elektroi hartzailea NAD(P)$^+$ da, beraz, ahalmen erreduzitzailea inongo arazorik gabe lortzen da.



Baina <u>ez da prozesu ziklikoa</u>, elektroiak galdu egiten dira, beraz, beti beharko da elektroi emailea, hau da, O_2.

Honekin batera badago <u>fotosintesi ziklikoa</u> burutzeko posibilitate bat ere (mara zatitxoak). Prozesu honetan elektroiak ez dira galtzen, baina ahalmen erreduzitzailea ere ez da sortzen. Prozesu zikliko honen bidez bakarrik energia lortuko du zelulak, eta egoerei hobeto egokitzen zaien prozesua erabiliko da.

- ATP sortzeko fotofosforilazioaziklikoa eta batzuetan ziklikoa.
- NAD(P)H sortzeko elektroi garraio kate zuzena (ferredoxina bertan dago)

	Kimioorganotrofoak	Kimiolitotrofoak	Fotolitotrofoak
C iturria	Konposatu organikoa	CO_2	CO_2
E iturria	Konposatu organikoa	$NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$ NO2- → NO3- SH_2, Sº, $S_2O_3 \rightarrow SO_4^{2-}$ $H_2 \rightarrow H_2O$ $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ (hau enausegurokuadrohontandan)	Argia
Elektroi emailea	Konposatu organikoa		$H_2O \rightarrow O_2$ $H_2 \rightarrow H_2O$ SH_2, → SO_4^{2-} Konporg (ko) →ko
Elektroi hartzailea (kanpokoa)	$O_2 \rightarrow H_2O$ $NO_3 \rightarrow NO_2^-$ edo N_2 $SO_4^{2-} \rightarrow SH_2$ $CO_2 \rightarrow CH_4$	$O_2 \rightarrow H_2O$ $NO_3 \rightarrow NO_2^-$ edo N_2 $SO_4^{2-} \rightarrow SH_2$	

Prozesu honen helburuak:

<u>Energia</u>:

- ATP
- H+ gradientea

<u>Ahalmen erreduzitzailea</u>:

- NAD(P)H + H+
- FADH2
- Fd erreduzitua

Metabolito aitzindariak: 13 dira. Hauekin zelulek biosintesiaren bidez zelularen molekula sor ditzakete.

Zelularen molekulak sintetizatzeko beharrezkoak diren karbonoak metabolito aitzindarietatik hartzeaz gain, N, S, P… ere beharrezkoak dira. 7. Ikasgaian ikusiko dugu nondik lortzen dituzten hauek.

- Nitrogenoa lortzeko adibidez: gehienek amonioa (NH_4^+) eta NO_3, eta batzuek N_2
- Sufrea lortzeko: H_2S, SO_4^{2-}
- Fosforoa lortzeko: PO_4^{2-}

*Adi! Ez nahastu prozesu hauek, hau da, konposatu zelularrak sintetizatzekoak aurretik taulan aipaturikoekin. Konposatu zelularrak sintetizatzeko prozesuak asimilatorioak dira.

7. NITROGENO, SUFRE ETA FOSFOROAREN ASIMILAZIOA

1. Sarrera: erredukzio asimilatorioa eta disimilatorioa
2. Nitrogenoaren asimilazioa
3. Sufrearen asimilazioa
4. Fosforoaren asimilazioa

1. Sarrera: erredukzio asimilatoroa eta disimilatorioa:

Nitrogenoa eta sufrea oso oxidatuak hartzen dira, eta hauen asimilazio zuzena ezinezkoa da. Asimilatu baino lehen, konposatu ez organiko hauek erreduzitu egin behar dira, eta honetarako daude erredukzio asimilatorioa eta disimilatorioa.

Erredukzio asimilatorioa (helburu anabolikoa)

- Biosintesirako beharrezkoa den kantitatea erreduzitzen da. (oso garestiak zelularentzat)
- Ekoizkinak zelulan geratzen dira makoromolekulen barruan
- Prokarioto guztiek egin dezakete (eta onddo, alga eta landare askok)
- Ematen diren erreakzioak eta jokatzen duten entzimak zehatzak dira (*erreduktasa asimilatorioak*)

Erredukzio disimilatorioa (helburu katabolikoa)

- Kantitate handiagoa erreduzitzen da (ahal den guztia)
- Ekoizkinak kanporatu egiten dira
- Prokarioto gutxik egiten dute metabolismo disimilatorioa
- Ematen diren erreakzioak eta jokatzen duten entzimak zehatzak dira (*erreduktasa disimilatorioak*)

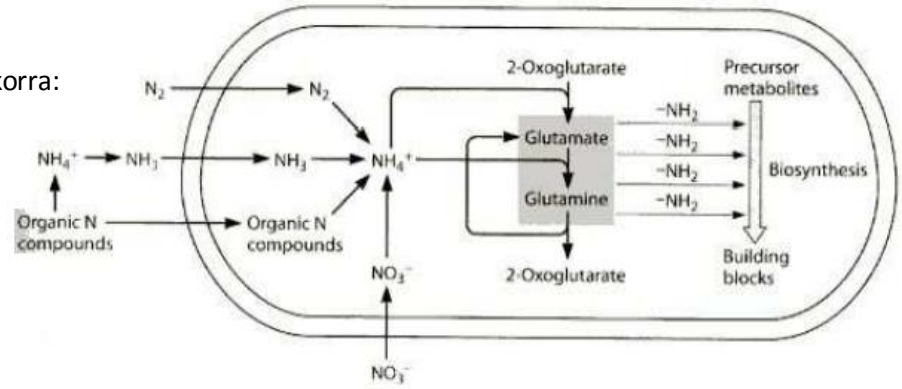
Kontzeptuak:

- Nitrogeno zelularra: amino taldea (-NH2)
- Sufre zelularra: sulfhidrilo taldea (-SH)

2. Nitrogenoaren asimilazioa:

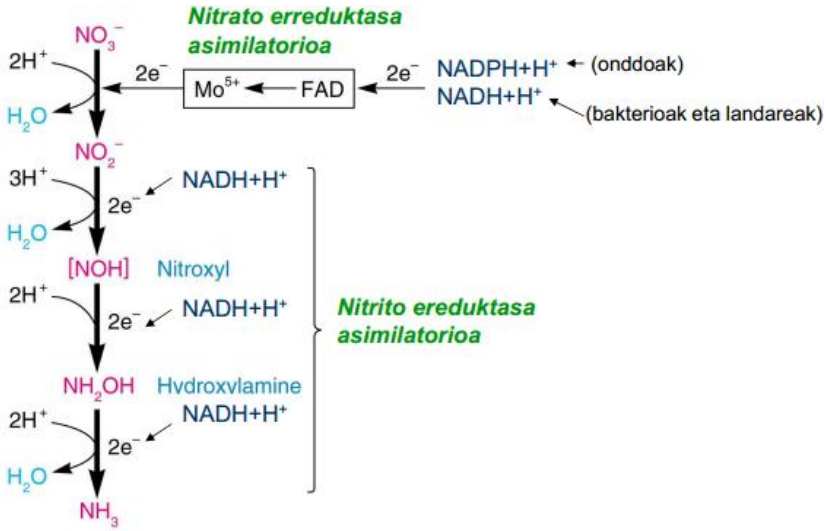
- Konposatu organikoetatik: aminoazidoak, purinak, pirimidinak
- Konposatu ez-organikoetatik: amoniakoa (NH3), hidroxilamina (NH2OH), nitratoa (NO3-), nitritoa (NO2-), nitrogenoa (N2), zianuroa (…), zianatoa, tiozianatoa, zianamida

Eskema orokorra:



Molekula organiko nitrogenodunak sintetizatzeko zelulak **ioi amonioa** behar du, beraz, hau lortzea izango da helburua. **Ioi amonioa** edo amoniakoa dagoenean, erabilera zuzena da (iturri zuzena).

Hala ere, batzuetan amonioaren kontzentrazioak ez dira oso altuak izango. Beraz, **nitratoa** (2. iturria) edo **nitrogeno molekularra** (N_2) dagoenean, zelulak erreduzitu egin behar du **amonioa** arte.

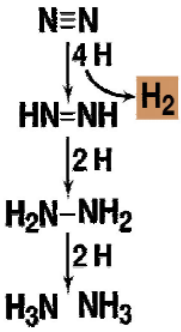


Nitratoaren erredukzio asimilatorioa

Ahalmen erreduzitzailea guztiz beharrezkoa da. Beraz, nitratoaren erabilera garestia da zelularentzat. Horrez gain, erredukzioa denez, erredukzio asimilatorioan beharrezkoak diren entzima erreduktasak inplikatuta daude. Prozesua oso antzekoa da, nitratoaren erredukzioa kasu honetan amoniakorarte.

Erregulazioa: amoniakoak entzimen sintesia inhibitzen du:

- **Nitrato erreduktasak**: nitratoa nitritora erreduzitzen du.
  - $NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$
- **Nitrito erreduktasak** nitritoa amoniora erreduzitzen du
  - $NO_2^- + 8H^+ + 6e^- \rightarrow NH_4^+ + H_2O$



Overall reaction

$8\,H^+ + 8\,e^- + N_2 \longrightarrow 2\,NH_3 + H_2$

$16\text{–}24\ ATP \longrightarrow 16\text{–}24\ ADP + 16\text{–}24\ P_i$

NITROGENASA
konplexua

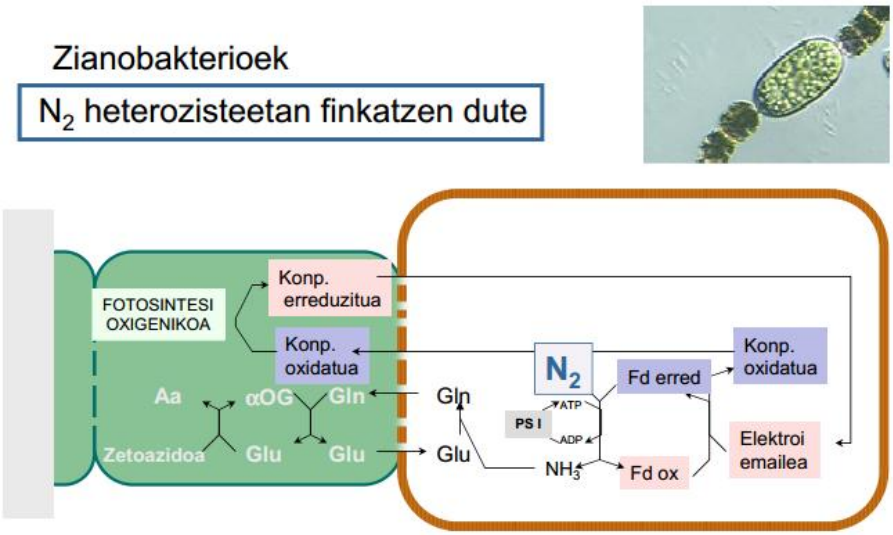
Nitrogeno molekularraren finkapena:

- Bakarrik prokariotoek burutzen dute
  - *Archaea* eta *Bacteria* batzuek

Energia gastu handia du, oso prozesu garestia irteten da zelularentzat. Prozesu honetan nitrogenasa entzima konplexua dago inplikatuta, eta nitrogenasaren ezaugarriak nahiko bereziak dira.

- Nitrogenasa oxigenoarekiko oso sentikorra da. Nitrogenoaren finkapena bakarrik baldintza anaerobioetan gertatzen da, oxigenoa badago, nitrogenasa inaktibatu egiten baita.
- Nola babesten da nitrogenasa?
  - N_2 finkatzaile batzuk derrigorrezko anaerobioak dira.
  - Aukerazko anaerobioek bakarrik anaerobiosian finkatzen dute N_2
  - Anaerobioak/oxigenikoak direnak:
    - Arnasketa azkar-azkar burutzen du zelulak: organismo hauek oxigenoa zelulara sartu ahala berehala erabiliko dute, zelularen barneko oxigeno kontzentrazioa ia-ia zeroan mantenduz.

- Proteina babesgarriekin lotzen da nitrogenasa: honela, nitrogenasak mikroingurune anaerobikoa pairatuko du, zonalde honetan nitrogenasa aktiboa egonez.
- Nitrogenasa toki berezian dute → heterozistea: hau zianobakterio batzuetan ikusi da. Oxigenoa kanpoan uzten dute eta ingurune anaebikoa lortzen dute.



Heterozisteak: normalean nahiko zelula bereziak dira. Nitratoa edo amonioa agortzen denean agertzen dira kasu batzuetan. Ezaugarriak:

- Ikuspuntu morfologikoa: zelula begetatiboekin alderatuta (ingurukoak) askoz handiagoak dira.
- Horma sendoak oxigenoaren sarrera ekiditeko.
- (Fotosintesi oxigenikoa)??? egin arren, ez dute osagai guztiak, soilik lehen fotosistemaren osagaiak aurkituko ditugu. (II fotosisteman oxigenoa sortzen da, eta hau ez dute).
- Nahiz eta horma lodia egon, oxigeno pixka bat sartzen da, baina sartzen den hori berehala arnasketa aerobioaren bidez erabiliko dute.
- Ondoko zelulekin lotuta daude, goiko irudian ikus dezakegun bezala kanaltxoekin. Horietatik molekulak mugitzen dira.

Zelula begetatiboetan fotosintesi oxigenikoa burutuko da, eta CO2 ere finkatuko da Calvin Zikloaren bidez. Energia, ahalmen erreduzitzailea eta metabolito aitzindariak sortuko dira.

Nitrogenoa finkatzeko prozesua:

Zelula begetatiboen konposatu erreduzituak heterozisteetan ferredoxina erreduzitzeko erabiltzen dira. Heterozisteetan ferredoxina erreduzitua nitrogeno molekularra finkatzeko beharrezkoa den ahalmen erreduzitzailea izango da. Behin ferredoxina erreduzitua dugularik, nitrogenoa erreduzitzen da amoniakora, lehen fotosistematik lorturiko ATPari esker. Jarraian, amonio hori molekula organikoetan sartzen da, nitrogenodun molekulak emateko.

Amonioaren finkapena (soilik finkapena, ez du erredukziorik behar):

Molekula organikoetan finkapena:

- 3 entzimako sistema: Glutamina sintetasa, glutamato sintetasa, transaminasak: bakterio batzuetan gertatzen da, amonio kontzentrazioak baxuak direnean.
    - 1. Etapa: Glutamina sintetasa: NH3a ATP baten bidez glutamato bati atxikitzen zaio, glutamina eratuz
    - 2. Etapa: Glutamato sintetasa: alfa-KG-a glutamatora transformatzen da glutaminaren amino taldea hartuz
    - 3. Etapa: transaminasa:
- Bakterio asko eta onddoek: glutamanto deshidrogenasa eta transaminasen bdiez:
    - Sustratoa: alfa-KG, talde amino bat finkatzen zaio glutamato DHasaren bidez, glutamatoa eratuz.
    - Glutamatoa transaminasen bidez alfa-KGra bihurtzen da eta aminoazidoak eratzen dira.

3. Sufrearen asimilazioa

Prozedurak kasu honetan oso antzekoak izango dira.

Zelulek: L-zisteina sintetizatu behar dute, sulfhidrikoa erabiliz. Sufrearen iturriak:

1. H_2S: sulfhidrikoa edo hidrogeno sulfuroa. Molekula hau metabolismoan agertzen da, beraz organismo asko molekula hau erabili eta sintetizatzeko gai izango dira. Baldintza anerobioetan gainera molekula hau oso egonkorra da: arazorik gabe molekula barrura sartuko da eta erabilera zuzena emango zaio.
2. Baldintza aerobioetan ordea aurreko molekula ez denez egokia, beste iturriak erabiliko dituzte:
    a. Sulfatoa SO_4^{2-}: Zelulara sartu eta erredukzio asimilatoria gertatzen da S_2- arte. Sulfatoaren erredukzioa gertatzeko sulfatoa lehenengo aktibatu egin behar da, eta honetarako ATP (energia) beharrezkoa da. Horrez gain, prozesu honetan ahalmen erreduzitzailea ere beharrezkoa da.
    b. Konposatu organiko sufredunak, zelulara sartu eta sulfatoa emango dute.

4. Fosforoaren asimilazioa

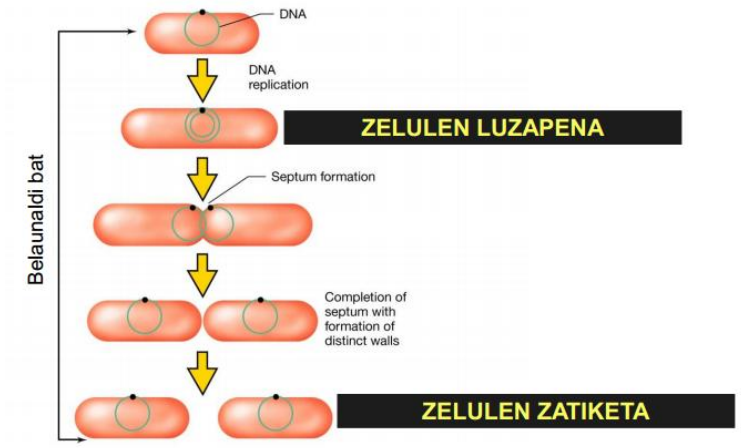
Hau errazena da, fosforo iturri bakarra fosfatoa delako. Fosfatoa aske egon daiteke edo fosfato organiko gisa.

- Fosfatoa soilik: zuzenean zelulara. Fosfato organikoa sartzen da zitoplasmara. Han ATPa sintetizatzeko erabiltzen da. Ondoren ATPtik:
    - Azido nukleikoak, proteinak, fosfolipidoak, NADPH…
- Fosfatoa organikoa→ fosfatoa askatu behar da fosfatasa (extrazelular) baten bidez.

8. MIKROORGANISMOEN HAZKUNTZA KONTROPEKO BALDINTZETAN

1. Sarrera: banako hazkuntza eta populazioen hazkuntza
2. Populazioen hazkuntzaren neurketa
   - Zelulen kopurua
   - Biomasa
3. Populazio baten hazkuntza lerroa
   - Hazkuntzaren faseak eta parametroak
4. Kultibo jarraikia

1. Sarrera: banakako hazkuntza eta populazioen hazkuntza



Honela biomasa haztea lortzen da. Prozesu honetan bi hazkuntza mota gertatzen dira:

- Banako hazkuntza: Biomasarena, zelula baten tamainua handitzen da. **Sintesiaren** bidez. (irudia)
- Populazioarena: zelula kopurua handitzen da. Zelulen **zatiketaren** bidez.

Ikasgai honetan populazioaren hazkuntzaz hitz egingo dugu.

Mikroorganismoen hazkuntza ezagutzeko jakin beharrekoa:

- Baldintza kimikoak: Elikagaiak, pHa, O_2 bai edo ez, gazitasun maila (kostaldean garrantzitsua), urik bai edo ez eta kantitatea…
- Baldintza fisikoak: erradiaziorik bai edo ez, tenperatura…
- Baldintza biologikoak: lehiaketa, harraparitza (ea beste organismoren bat honetaz elikatzen den)…

Baldintza hauek ingurune natural batean etengabe aldatzen ari dira. Ondorioz, hazkuntza abiadura ere aldakorra izango da. Baldintzen eragina jakiteko, beste baldintza guztiak konstante mantenduz egin behar dira esperimentuak, eta guk nahi dugunarekin jolastuz.

Nolako eragina dute inguruneko baldintzek mikroorganismoen hazkuntzan? Laborategian:

- Mikroorganismo mota → kultibo purua
- Inguruneko baldintzak → konstanteak eta optimoak

Ikerketa mota hauen helburua:

- Mikroorganismoen hazkuntzarako estrategiak ezagutzeko
- Ikerketan: zelula asko lortzeko
- Mikrobiologia aplikatuan:
    - Mirkoorganismoen hazkuntza bultzatzeko
    - Mikroorganismoen hazkuntza ekiditeko.

2. Populazioen hazkuntzaren neurketa

Kultibo medio batean elikagai asko eta mikroorganismo gutxi ezartzen ditugu. Kultibo medioaren osaera ezaguna izango da, eta elikagaiak oso ongi kontrolatuak izango ditugu. Materiala inkubatu eta ordu/egun batzuk pasa ondoren zelulen dentsitate handia lortuko dugu, hau da, mikroorganismo asko. Gainera, elikagaien kopurua neurtuz gero, normalean nahiko baxua izango da. Horrez gain, mikroorganismo motaren arabera (adib. antibiotiko ekoizlea…)metabolito batzuk ere agertuko dira.

Hazkuntza abiadura determinatzerakoan, garrantzitsua da jakitea ea lehen egoeratik (kultiboa jarri berri izatetik) bigarren egoerara (elikagai kantitate txikiagoa izatera) zenbat denbora iragan den.

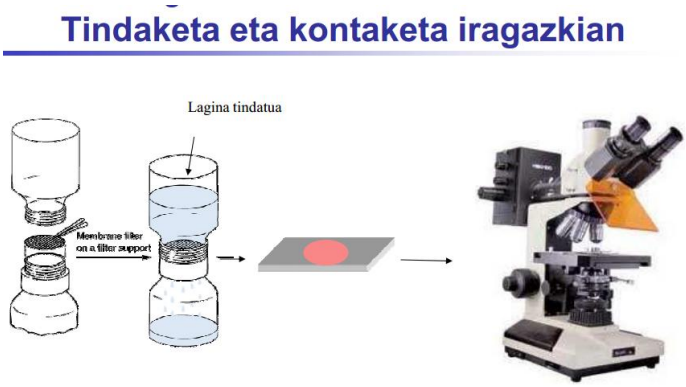
Tenperatura bat eta oxigeno kontzentrazio bat determinatuta, bi egoeren artean zenbat tardatzen den begiratuko dugu. Honetarako, denbora tarte jakinetan azpilaginak hartuko ditugu. Honela, gainera, kultiboaren eboluzioa jakingo dugu azpilaginak aztertuz.

- NOLA NEUR DEZAKEGU HAZKUNTZA?
    - **Zelulen kopuruaren handipena**
        - Nola neurtzen dugu mikroorganismoen kopurua?
            - **Zelula guztien kontaketa**
            - **Zelula kultibagarrien kontaketa**
            - **Turbidometria**
    - **Biomasaren handipena**
        - Nola neurtzen dugu mikroorganismoen biomasa?
            - **Pisu lehorra**

Guk soilik bi parametro hauek ikusiko ditugu gehien erabiltzen direlako, baina horrez gain, beste batzuk ere badaude (5):

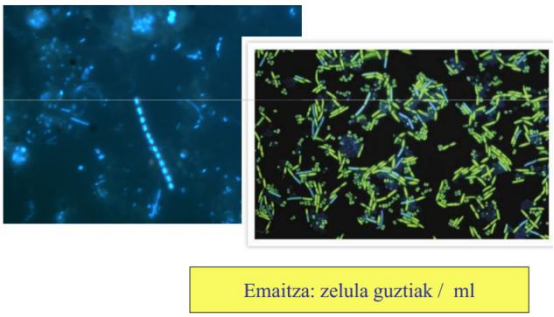
1.Zelulen kopuruaren handipena:

ZELULA GUZTIEN KONTAKETA: metodo honen bidez bizirik eta hilda dauden zelulak, fisiologikoki ongi eta gaizki daudenak, DENAK zenbatzen dira.Fixapenarekin zelulak hil egingo zaizkigu.



Prozedura:

1. Lagina tindatu: tindatzaile fluorokromoa. Bakarrik zelulak tindatuko dira, denak, hilda eta ondo daudenak berdin.
2. Iragazi: iragazkian tindatuta dauden zelula guztiak jasoko ditugu.
3. Iragazkia atera eta beirazko porta baten gainean jarri.
4. Epifluoreszentzia mikroskopio bidez behaketa. Hauek material fluoreszentea hobeto ikusteko erabiltzen dira.



*Argi!! Emaitza guztiak zelula/mL eman behar dira, jakiteko zein teknika erabili den, eta beraz, zein zelula zenbatu diren.

Lagina:
- Likidoa
- Partikularik gabea
- Fixatua

Tindatzailea:
- Pigmentu naturalak/fluorokromoak
- Orokorrak/zehatzak

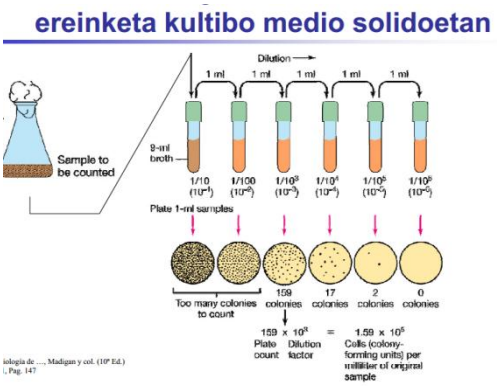
Mikroskopioa:
- Epifluoreszentzia-Mikroskopioa
- Bihurketa faktorea (xxeremu/iragazki)

Zer da bihurketa faktorea? Zenbat eremu dauden iragazki osoan. Guk eremu bat kalkulatuko dugu, eta mikroskopio bakoitzak hainbat eremu izango ditu. Beraz, bihurketa faktorea, zenbat eremu dituen iragazki batean izango da. Biderkatuz zelula kopuru totala kalkulatzeko balio du, eta hauen dentsitatea mL-ko.

ZELULA KULTIBAGARRIEN KONTAKETA: kultibo medio solido batean hazteko gai diren zelulak zenbatuko ditugu.

Teknikaren oinarria:

1. Laginaren bolumen txiki bat hartu eta kultibo medio solidoa daukan petri kutxa batean utzi inkubatzen: mikroorganismoak baldintzak egokiak badira, hazi egingo dira.
2. Hurrengo egunean, koloniak zenbatu



Kolonien kopurua kontaezina izatea gerta liteke: irudiko eskuinekoa. Beraz, berriro egin beharko dugu kontaketa egin ahal izateko. Honengatik, normalean, lagina petri kutxa batean egiteaz gain, diluzioa egingo dugu (goiko adibidean, hamartarra).

Diluzioak egiteko:

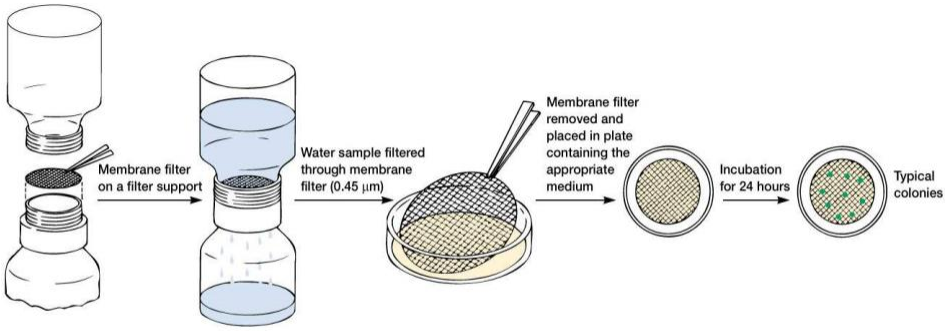
- Likido esterila erabili
- Proportzioak ezagunak izan behar dira, bolumen bera erabiliz eta normalean erreplika bat baino gehiago eginez ondoren denen bataz bestekoa erabiltzeko.

Ondoren, kolonien zenbaketa:
Kolonien zenbaketaren unitatea KUS izango da, Kolonia Unitate Sortzailea

- Diluzio adierazgarriena: Kontuan hartzeko, 30-300 kolonia/petri kutxa izan behar da, estatistikoki egokiena kantitate hau da.
- Bataz-bestekoa: xxkolonia/Petri kutxa
- Ereindako bolumena: yykolonia/mL, laginean
- Unitateak: KUS/mL

Teknikaren arazoak:
Lagineko mikroorganismoen unitateak oso baxuak direnean sortzen dira. Adib. erateko uretan oso mikroorganismo gutxi daude, beraz, diluzioen teknikak ez du balio. Konponbidea:

Iragazketa teknika



Microbiología, Prescott y col. (5ª Ed.)
Fig. 6.6, Pag. 125

Emaitza: zelula kultibagarriak / ml

Bolumen jakin bat (aurreko teknikan baino handiagoa) iragazki batetik igaroarazten da. Bertan dauden mikroorganismoak filtroan geldituko dira. Ondoren filtro hori inkubatzen jartzen da eta bertan ikus daiteke zenbat kolonia garatzen diren. Kolonia hauen zenbaketatik dentsitatea kalkula daiteke.

Iragazkietako mikroorganismoak eremuka kontatzen dira. Honela datuak emateari, *bihurketa faktore* deitzen zaio. Adib:

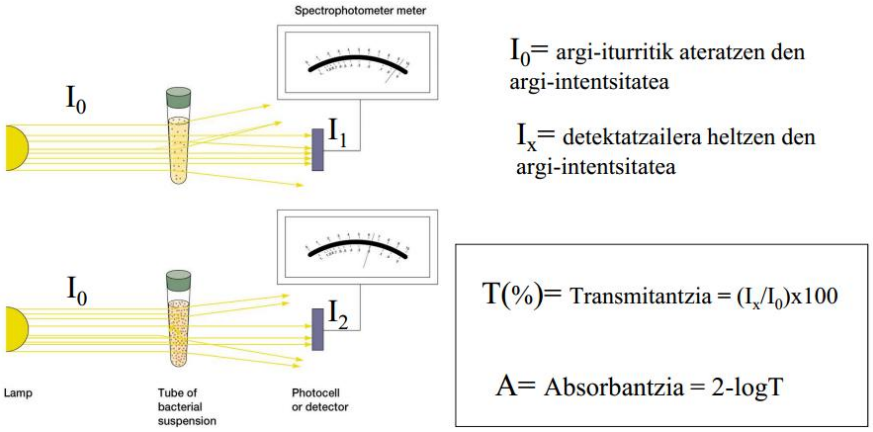
- 1. Eremua: 30 bakt
- 2. Eremua: 25 bakt
- 3. Eremua: 20 bakt
- BF = 20 000 eremu/iragazki

Zelula kultibagarrien kontaketa: ereinketa kultibo medio solidoetan (laburpentxoa):

- Lagina: zelula kultibagarriak detektatu
  - Likidoa/solidoa
  - Partikularik gabekoa
- Kultibo medioa
  - Egokia mikroorganismoen hazkuntzarako
  - Orokorra/hautagarria/bereizgarria
    - Adib. Bakarrik Gram (-)en hazkuntza aztertu nahi badut, hautagarria
- Inkubazio-baldintzak
  - Egokia mikroorganismoen hazkuntzarako
  - Tenperatura, O_2, argia…

*ADI! Laginaren bolumen txikia denean erabili behar da;batazbestekoa, emandako bolumena eta diluzio maila kontuan izaten dituen esperimentua.

UHERTASUNAREN NEURKETA; TURBIDOMETRIA: honi esker, partikulen dentsitatea zein den neurtu dezakegu espektofotometroaren bidez.



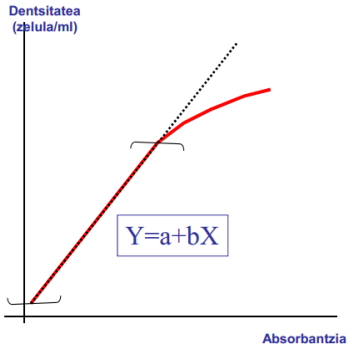
Transmitantzia: gardentasun maila adierazten du. %100 denean lagina guztiz gardena da (dentsitate minimoa, mikroorganismorik ez) eta %0 denean guztiz opakoa (mikroorganismo dentsitate maximoa).

Absorbantzia: xurgapen maila adierazten du. %0 denean, lagina guztiz gardena da eta %100 denean guztiz opakoa. Mikroorganismoak kultiboan baditugu, mikroorganismoen hazkuntzarekin batera, parametro hau denborarekin ere hazten joango da.

Zer nolako dentsitatea dugun jakiteko, ezinbestekoa da kalibratzea. Honi esker, absorbantziaren balioak parametro egokietan ezartzen dira, eta kalibrazioa espezifikoa da lagin bakoitzarekin. Izan ere, kalibrazio lerroa desberdina da mikroorganismo eta kultibo medio mota batetik bestera.

Uhertasunaren neurketa: kalibrazio lerroa

Zelulen esekidurak	Absorbantzia	Zelula/ml
1	0,11	$1x10^6$
2	0,41	$4x10^6$
3	0,72	$7x10^6$
4	1,09	$11x10^6$
5	1,38	$14x10^6$
6	1,57	$17x10^6$
7	1,70	$20x10^6$

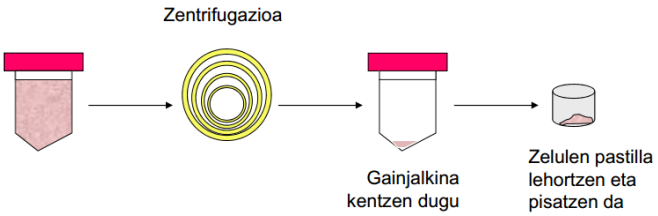


Absorbantziaren eta dentsitatearen arteko erlazio matematikoa lineala da. Hau lortzeko, erregresio lineala erabiltzen da: y = a + bx forma hartuz dentsitate eta absorbantzia baxuko puntuetan.

- y: dentsitatea
- a eta b: erregresio linealaren koefizienteak
- x: absorbantzia

2.Biomasaren handipena:

PISU LEHORRAREN NEURKETA:



Emaitza: gramo zelula / ml

Mikroorganismoaren biomasa handia denean erabiltzen da teknika hau. Zelulak zentrifugazio bidez sedimentatu, gainjalkina kendu eta prezipitaturiko zelulak lehortu ondoren (60ºC) pisatzean datza. Lortuko duguna, zenbat zelula gramo ditugun mililitroko izango da.

(Hazkuntzaren neurketarako beste irizpideak:)

3.Zelulen osagaien handipena

4.Elikagaien desagerpena:

Zenbat glukosa dagoen adibidez. Honela ea zein momentutan agortzen den karbono iturria… jakin dezakegu.

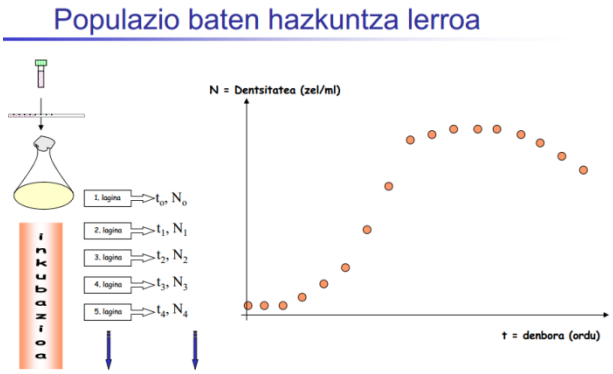
5.Metabolitoen metaketa:

Hau gure mikroorganismoa metabolito baten ekoizlea denean egiten da.

3. Populazio baten hazkuntza lerroa

Laborategian baldintza egokiak eta egoera egonkorra denez, hazkuntza azkarra gertatzen da, eredu zinetikoa jarraituz. Naturan ordea, hazkuntza aldakorra izango genuke eta honek ez luke eredu zinetikorik jarraituko. Baldintzak ez dira egokiak eta egoera aldakorra da (+bizidunak).

1. Lag fasea: inokulatu ondoren hasieran dentsitatea ez da aldatzen.
2. Fase esponentziala: handipen azkarra hasten da, hazkuntza etapa.
3. Fase geldikorra: dentsitate maximoa lortzen da, egonkortuta dago.
4. Heriotza fasea: dentsitatea jaisten hasten da, malda negatiboa.



Nola eraiki:

1. Kultibo medio likidoa prestatu. Hasieran ereinketarako erabiliko den bolumen txikia **inokulua**da.
2. Mikroorganismoa inokulatu
3. Mikroorganismoen dentsitateak neurtu denbora tarte jakinetan. Honetarako azpilaginak hartu. Lehenengoa inokulatu eta berehala hartzen da.

Lag fasea (Latentzi fasea)

- Kultiboa inokulatzen denetik hazkuntza gertatu arteko epea da.
- Epe honetan inokulatutako zelulak baldintza berrietara moldatzen dira.
    - Zelulak "zaharrak" direnean: osagai berriak sintetizatu beharko dute zatitu baino lehen.
    - Zelula "zauritua" dagoenean: errekuperatu behar dira, eta kalteak konpondu
    - Kultibo medioaren elikagaiak "berriak" direnean: zelulek entzima berriak sintetizatu beharko dituzte elikagai horiek erabiltzeko.
- Fase honen iraupena desberdina izan daiteke:
    - Mikroorganismoen egoeraren arabera
    - Inkubaketaren eta kultibo medioaren ezaugarrien arabera
        - Inokuluaren eta matrazearen kultibo medioak oso desberdinak badira, Lag fasea oso luzea izango da.

Inokulatutako zelulak	**Kultibo medioaren konposaketa**	**Lag faseak?**
Hazten ari diren zelulak	Konposaketa berdineko kultibo medioak	Ez, hazkuntza berehala hasiko da.
Hazten ari diren zelulak	Konposaketa desberdineko kultibo medioa	Bai
Fase geldikorreko zelulak	Edozein kultibo medioa	Bai, zelulen egoera fisiologikoagatik.
Oso kultibo medio gozoan hazten ari diren zelulak	Kultibo-medio eskasa	Bai

Hazkuntza fase esponentziala:

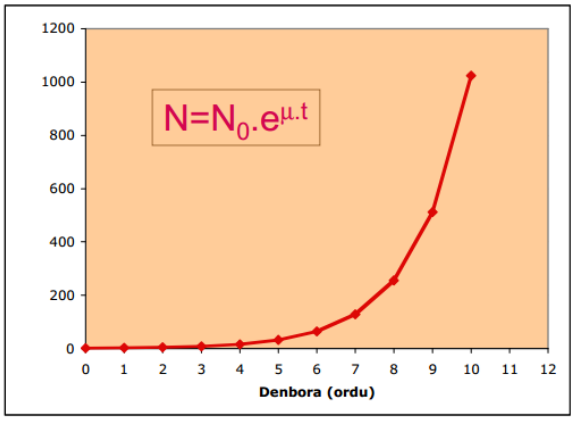
- Epe honetan mikroorganismoak hazten eta zatitzen dira, maila maximo batera heldu arte:
    - Beraien potentzial genetikoaren arabera
    - Kultibo-medioaren motaren arabera
    - Inkubazioaren arabera
- Fase honetan **populazioa oso homogeneoa** da.
- Baldintza konstanteak mantentzekotan, **hazkuntza orekatua** gertatzen da (zelula guztiak antzekoak direlako):
    - Zelulen konposaketa kimikoa konstantea da
    - Biomasaren bikoizketa zelularen osagai guztietan bikoizketarekin batera gertatzen da

Hazkuntza esponentzialaren parametroak:

- Hazkuntza abiadura (v)
- Hazkuntza abiaduraren konstante espezifikoa (μ): hau da hiruretatik garrantzitsuena
- Bikoizten denbora (g)

Nola kalkulatu hazkuntza abiadura (esperimentua):

Denbora (orduak)	N (zelula / ml)
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024



Hazkuntza abiadura (v): sisteman agertutako zelula berrien kopurua denbora unitatean (adib. zelula/ml·ordu)

- 0-2h tartea hartuz gero: v = [(4-1)/(2-0)] zel/ml = 1,5 zel/ml·h
- 4-7h tartea hartuz gero: v = [(128-16)/(7-4)] zel/ml = 37,3 zel/ml·h
- 9-10h tartea hartuz gero: v = [(1024-512)/(10-9)] zel/ml = 512 zel/ml·h

Ondorioa: hazkuntza abiadura eta dentsitatea proportzionalak dira. Gainera, denboran aurrera joan ahala, v igo egiten da.

Hazkuntza abiaduraren konstante espezifikoa (μ): Unitatea min^{-1} da. Parametro honek abiadura eta dentsitatearen arteko erlazioa egitea ahalbidetzen du ondoko formularen bidez:

$$v = \mu \cdot N$$

- μ txikia bada: malda ez da oso azkar handitzen
- μ handia bada: malda oso azkar hazten da, oso gorakorra

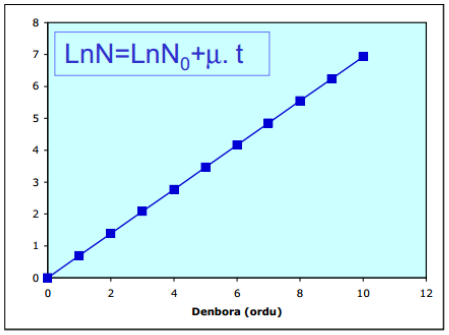
**Goiko grafikoan:

- N = kultiboaren dentsitatea momentu batean
- N_0 = kultiboaren dentsitatea hasieran
- $e^{\mu t}$ = μ konstante espezifikoa da eta t denbora

Aldaketa matematikoa: Matematikoki nahiko zaila da lerro esponentzial batetik informazioa ateratzea, beraz, logaritmo nepertarrekin arituko gara.

- Nola kalkula daiteke **hazkuntza abiaduraren konstante espezifikoaren** balioa?

Denbora (orduak)	N (zelula / ml)	Ln N
0	1	0
1	2	0,69
2	4	1,38
3	8	2,07
4	16	2,77
5	32	3,46
6	64	4,15
7	128	4,85
8	256	5,54
9	512	6,23
10	1024	6,93



Datuek orain lerro zuzena eratzen dute. Matematikoki, lerro hau erabil daiteke populazioaren hazkuntzaren parametroak ateratzeko.

Erregresio linealaren bidez atera daiteke hemendik informazioa.

- Y = LnN
- a = LnN0
- b = μ
- X = t

$$Y = a + bX$$

Noiz erabili lineala eta noiz esponentziala?

μ kalkulatzeko → lineala.

Esponentziala: N eskatzen digutenean.

Adib) E. coliμ = 0,2h^{-1} ; t = 7h ; N0 = 3·10^3 zel/ml

Nola determinatu lag fasearen eta fase esponentzialaren muga?

Logaritmo nepertarra egitean, argi ikusiko da nola gune baten kte egongo den eta puntu batetik aurrera gure puntutxoak lerro lineal batean sartzen diren. Hor dago muga.

Bikoizten denbora (g): zelula batetik bi zelula sortzeko beharrezko denbora. Unitatea = denbora (minutu, ordu...)

- Linealean: t = g izango da, N = $2N_0$ denean.
- Esponentzialean: $g = \frac{\ln 2}{\mu}$ [frogapena egin]

Emaitzen interpretazioa:

Espeziea	Inkubaketaren baldintzak	Elikagaiak	μ
Escherichia coli	30ºC	Salda elikagarria	0,35 h^{-1}
Bacillus subtilis	30ºC	Salda elikagarria	0,25 h^{-1}
Pseudomonas aeruginosa	30ºC	Salda elikagarria	0,15 h^{-1}

Ondorioa: Espezieak da soilik aldatzen dena, inguruneko baldintzak eta elikagaiak berdinak dira. Beraz, μ desberdina da mikroorganismo bakoitzarentzat, espezien arabera, bakoitzaren ezaugarria da.

Espeziea	Inkubaketaren baldintzak	Elikagaiak	μ
Escherichia coli	30ºC	Salda elikagarria	0,35 h^{-1}
Escherichia coli	25ºC	Salda elikagarria	0,25 h^{-1}
Escherichia coli	20ºC	Salda elikagarria	0,15 h^{-1}

Ondorioa: Kasu honetan kultibo medioa eta espeziea berdinak dira, baina tenperatura aldatzen da. Beraz, tenperaturak μ-rengan eragina du. Altuekin hazkuntza azkarragoa da eta baxuekin motelagoa.

Espeziea	Inkubaketaren baldintzak	Elikagaiak	μ
Escherichia coli	30ºC	Salda elikagarria+ glukosa %1	0,40 h^{-1}
Escherichia coli	30ºC	Salda elikagarria	0,35 h^{-1}

Ondorioa: kasu honetan elikagaiak aldatuko ditugu. Elikagai hauen kalitate eta kantitatearen arabera, emaitzak ezberdinak izan daitezke. Elikagaietan aberatsagoa bada, hazkuntza azkarragoa du.

Fase geldikorra:

- Epe honetan zelulen kopurua konstantea mantentzen da
  - Zelula batzuk oraindik zatitzen dira, baina beste batzuk hiltzen dira
  - Emaitza: kontaketak konstanteak dira
- Zergatik gertatzen da fase geldikorra?
  - Beharrezkoa den elikagai baten bat agortu delako
  - Metabolito toxikoak agertu eta metatu direlako.
    - Metabolito toxiko hauek mikroorganismoak berak ekoiztutakoak dira, eta ekoiztu ahala kanporatuak. Dentsitatea oso handia denean, metabolito horiek medioan metatuko dira, baina gehiegi egongo dira.
    - Adib. edari alkoholikoak: alkohola nahikoa metatutakoan, bere kontzentrazioa toxiko bihurtzen da mikroorganismoentzat eta horiek hiltzen hasten dira.
- Fase geldikorreko zelulak eta fase esponentzialeko zelulak desberdinak dira (morfologia, konposizioa, metabolismoa)
  - Zelulen hazkuntza ez da orekatua
  - Metabolito "sekundarioak" sintetizatzen dira (antibiotikoak, hauen sintesia soilik fase geldikorrean gertatzen delarik; …)
  - Bakterio esporadunengan fase honetan esporulazioa gertatzen da
    - Aldaketa morfologiko garrantzitsuak ikusten dira, ile gehiago, txikiagoak… Espezie batzuetan esporulazioa, edo esporak ekoiztea.
    - Esporak: baldintza desegokiak direnean zelulen barruan sortzen diren egitura bereziak, oso oso erresistenteak. Zelula berri gisa joka dezakete.
  - Orokorrean, zelulak baldintza fisiologiko gogorrekiko erresistenteagoak dira

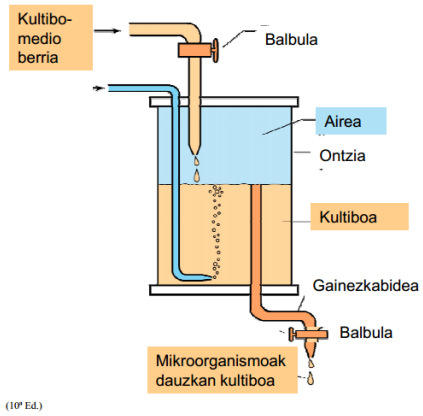
- Fase honetan bi parametro kalkulatzen dira:
    - **Uzta maximoa (M)**: zelula kopuruaren handipen maximoa adierazten du
        - $M = M_t - M_0$
        - M_t: fase geldikorraren hasierako (?) zelulen kopurua, dentsitate max
        - M_0: kultiboan inokulatutako zelulen kopurua, exponentzialaren hasiera
    - **Etekina (Y)**: uzta maximoa eta erabilitako substratuaren arteko erlazioa. Unit: zelula / mg glukosa (adib) (%-tan adierazita)
        - $Y = \frac{M}{(S_0 - S_t)} \, x \, 100$
        - S_0: kultibo medio berriaren substratuaren kontzentrazioa
        - S_t: fase geldikorreko substratuaren kontzentrazioa

[Hemen ariketa 1 indau]

Heriotza fasea:

- Epe honetan, hiltzen diren zelulen kopurua hazten diren kopurua baino altuagoa da.
- Oso erraz detektatzen da hilda dauden zelulak lisatzen direnean. Bestela ez.
- Heriotza abiadura hazkuntza abiadura baino motelagoa izaten da.
- Grafikoki esponentziala da. Hazkuntzako fase esponentzialarekin konparatuta:
    - Malda negatiboa du.
    - Malda txikiagoa du: heriotza abiadura hazkuntza abiadura baino motelagoa izaten da.

4. Kultibo jarraikia:



Kultibo hauen ezaugarri garrantzitsuenak ikusiko ditugu. Ontzian gure kultibo medioa jarriko dugu, normalean kimiostato hauek nahiko handiak direnez, oxigenoaren [ ] egokiak mantentzeko, aire hodia jarriko diogu. Beheko balbulak likidoen transferentzia kontrolatuko du, sistematik kultibo medioa ateratzeko. Goikotik aldiz, erabili gabeko kultibo medioa sartuko da.

Sistema hau prestatzen denean, ontzia prestatuko dugu eta kultibo medio nahikoa txertatuko dugu. Hasieran bi balbulak itxita egongo dira. Mikroorganismoak inokulatu eta beraien hazkuntza hasiko da, hasieran lag fasetik igaroz. Fase esponentzialean daudenean, elikagai berriak sartuko dizkiegu (ez agortzeko aurrekoak). Gainera, bolumena kte mantentzeko, beheko balbula ere ireki egin beharko dugu, aurrekoa bezala.

Honela, etengabe mikroorganismoak fase esponentzialean mantenduko dira, kultibo jarraikiak izena hartuz.

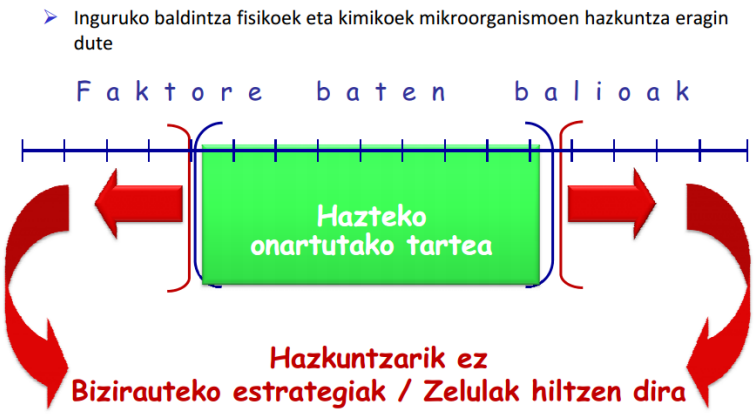
PowerPointean dagoena kultibo medio jarraikiei buruz:

- Sistema honen bidez hazkuntza exponentziala etengabe mantentzen da
- Fluxu abiadura eta kultibo medio berriaren konposizioa kontrolatuz, ikertzaileak kontrolatzen du
    - Mikroorganismoen hazkuntza abiadura
    - Mikroorganismoen dentsitatea
- Erabilerak
    - Ikerketa fisiologikoak
    - Mikroorganismoen ekologia ikertzeko
    - Mikroorganismoak isolatzeko

9.MIKROORGANISMOEN HAZKUNTZA INGURUNE NATURALETAN

1. Sarrera
2. Inguruneko baldintzen eragina
   - Tenperatura
   - pH-a
   - Presio osmotikoa
   - Presio hidrostatikoa
3. Mikroorganismoen biziraupena
4. Zelula jarkikorrak: bakterioen endospora

1. Sarrera



Normalean mikroorganismo baten hazkuntza tarte baten barruan gertatzen da, parametro baten arabera (adib. tenperatura).

Tarte honetatik kanpora, ez da hazkuntzarik gertatuko. Hala ere, batzuetan bizirik manten daiteke, eta besteetan hil egingo da. Bizirauteko aldaketa inportanteak gertatuko dira, eta honek, bizirauteko estrategiak dituztela esan nahi du (adib. esporak).

- Eragin hau desberdina da mikroorganismo motaren arabera
  - Espezie batzuentzat onuragarria dena beste batzuentzat kaltegarria izan daiteke.
- Eragin hauek ezagutuz,
  - Mikroorganismoen hedapena naturan ulertuko dugu.
  - Mikroorganismoen jarduerak kontrolatuko ditugu.
  - Mikroorganismo kaltegarriak suntsituko ditugu.

2. Inguruneko baldintzen eragina

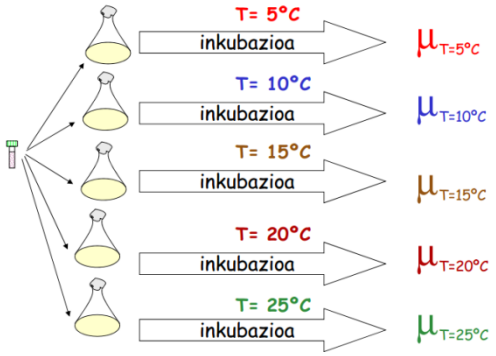
Tenperatura:

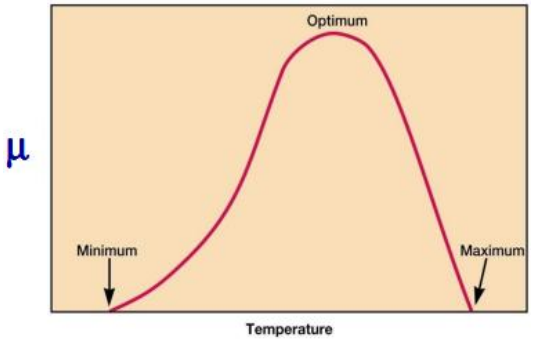
Hau agian faktore garrantzitsuena da. Orokorrean, tenperatura txikiek mikroorganismoen hazkuntza galarazten du. Beste alde batetik, tenperatura handiek mikroorganismoen osagai zelular batzuetan itzulezinezko kalteak eragin ditzakete.

Ondorioak:

- *Hotza*, mikroorganismoak kontrolpean izateko metodo ona da. Hala ere, mikroorganismoak hiltzeko ez da oso eraginkorra.
- *Beroa*, mikroorganismoak hiltzeko metodo ona da.

Tenperaturaren eragina hazkuntzan:





Aurreko datuak grafikoan jarrita, honelako itxura duen zerbait irteten zaigu, batzuetan handiagoa eta besteetan txikiagoa. Grafikoan ikusi beharrekoa:

- 1.tartea: hazkuntzarik ez, $\mu = 0$
    - Mintzaren gelifikazioa tenperatura baxuegiegatik
    - Elikagaien garraio motelegia
    - Hazkuntzarik ez
- 2.tartea: tenperatura minimoa mikroorganismoa hazteko. Hemendik aurrera hazkuntza positiboa izango da. Tarte honetan tenperatura igo ahala, hazkuntza abiadura ere igo egingo da. Honela gertatuko da maila maximora heldu arte.
- 3.puntua: tenperatura hobezina. Tenperatura egokiena da mikroorganismo honen hazkuntzarako. Hazkuntza abiadura maximoa da.
- 4.tartea: tenperaturak handitzen baditugu, dagoeneko hazkuntza abiadura geroz eta baxuagoa izango da, izan ere, puntu honetan dagoeneko molekula batzuk kaltetzen ari dira, eta hori dela eta ematen da malda negatibo hau.
- 5.puntua: tenperatura maximoa. Hau baino tenperatura handiagoetan mikroorganismoa ez da haziko, zelula desagertu egiten da, desegin, tenperaturaren eraginetan.
    - Proteinen desnaturalizazioa
    - Mintza kaltetu
    - Zelula lisatu

Tª kardinalak:
- Minimoa
- Maximoa
- Optimoa (hobezina)

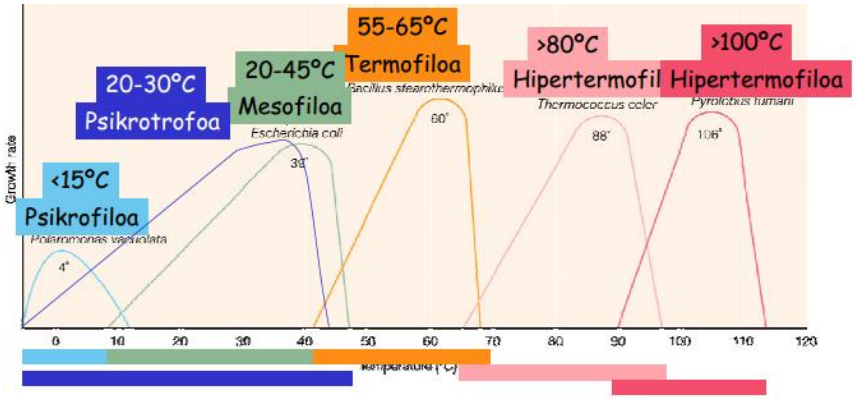
Ondorioa: tenperatura minimotik maximora, zelula bizi daiteke.

Tenperatura tarteari dagokionez mikroorganismo motak:

- **Euritermalak**: tenperatura tarte zabaletan bizi daitezke (tenperatura aldakorreko tokietan)
- **Estenotermalak**: tolerantzia tarte estua daukate (T kte-ko inguruneetan bizi dira)

Tenperatura hobezinaren arabera (3 mikroorganismo mota):

- **Psikrofiloak**: tenperatura hotzak nahiago dute ($T_{hobezina}$< 15ºC)
- **Mesofiloa**: tenperatura nahiko normalak ($T_{hobezina}$ 20-45ºC) Adb. *E. coli*
    - ***Psikotrofoak**: mesofiloak diren mikroorganismoak baina tenperatura baxuetan ere hazteko gai. Hobeto epeletan. 10-30ºC
- **Termofiloa**: tenperatura altuak nahi izaten ditzute. ($T_{hobezina}$ 55-65ºC)
    - **Hipertermofiloa**: tenperatura oso altuak ($T_{hobezina}$> 100ºC). Hauek normalean geisserretan aurkitzen ditugu



Mikroorganismoen moldaketak muturreko tenperaturen aurrean:

Psikrofiloak

- Tenperatura txikietan ongi lan egiten duten entzimak
    - Proteinen tolesdura berezia
    - Proteina termosentikorrak (>30ºC inaktibatu)
- Mintz plasmatikoaren jariakortasun handia
    - GA asegabe asko →Solidifikazioa zaila eta elikagaien garraioa mantendu

Termofiloak

- Entzima termoegonkorrak
    - Proteinen konposaketa berezia
    - Proteinen tolestura berezia
- Oso mintz plasmatiko egonkorra
    - Gantz-azido ase pila bat
    - Arkeoak: eter loturak eta batzuek egitura berezia (monogeruza)
        - *Bakterioek ester loturak dute
- DNA termoegonkorra
    - Proteina egonkortzaileei lotuta
    - Kiribilkapen berezia

pH-a

Protoi dentsitatearen logaritmo negatiboa da.

$$pH = -\log_{10} [H^+]$$

$pH = 0 \Leftrightarrow [H^+]=1M$ $\qquad$ $pH = 14 \Leftrightarrow [H^+]=10^{-14}M$

- Mikroorganismoen zitoplasma neutroa da.
- Onartzen duten inguruko pHaren arabera:
  - Azidofiloak: 5,5erarteko pHtan hobeto hazten dira.
    - Onddoak aukerazko azidofiloak dira. pH = 5ean hazteko gai dira. Hala ere, baldintza neutroetan nahiko ondo hazten dira.
    - Alga, bakterio batzuk derrigorrezko azidofiloak dira (pH = 2). Hauek derrigorrez pH azidoetan bizi dira, ingurune neutroetan jarriz gero mintz plasmatikoa apurtu egiten zaie.
  - Neutrofiloak: 5,5-8ko pHtan hobeto hazten dira.
  - Alkalofiloak: ingurune basiokak nahiago.
    - Bacillussp. Alkalofiloak (pH = 10-12)

Ur aktibitatea (a_w) eta osmosia:

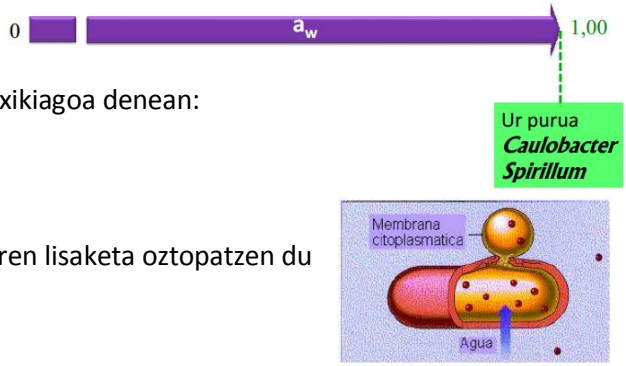
Ur aktibitatea (a_w): uren erabilgarritasuna da.

$$a_w) = \frac{\text{P material batean}}{\text{P ur puruan}} \qquad P = \text{lurrun-oresioa}$$

Ur aktibitate txikia → Mikroorganismoek lan gehiago burutu behar dute ura hartzeko.

Ingurune bat hipotonikoa, isotonikoa edo hipertonikoa izan daiteke mikroorganismoaren barnearekiko.

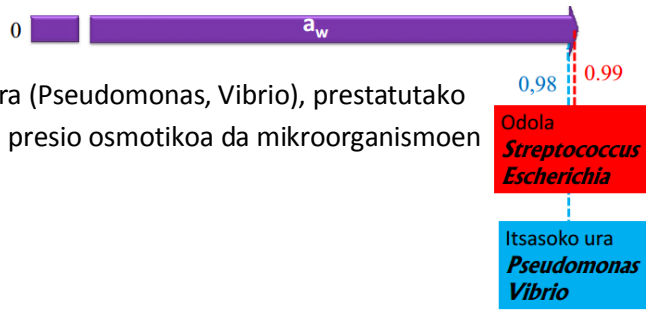
Ingurune HIPOTONIKOAK:



Kanpoko solutuen kontzentrazioa barnekoa baino txikiagoa denean:

- Kanpoko ur aktibitatea altua da
- Urak zelulara sartzeko joera du
- Mikroorganismoen horma zelularrak zelularen lisaketa oztopatzen du

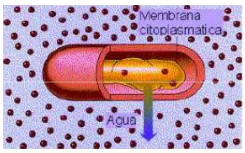
Ingurune ISOTONIKOAK

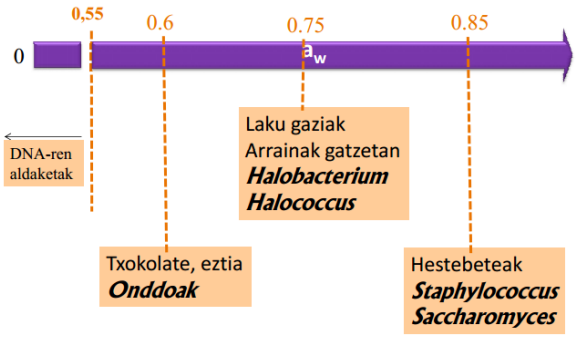


Adib. odola (Steptococcus, Scherichia), itsasoko ura (Pseudomonas, Vibrio), prestatutako kultibo medio gehienak… Kultibo medio gehienen presio osmotikoa da mikroorganismoen hazkuntza optimoa lortzeko.

Hemen hiru adibide besterik ez.

Ingurune HIPERTONIKOAK





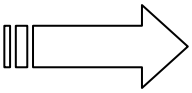
Ingurune **HIPERTONIKOAK**

Kanpoko solutuen kontzentrazioa barnekoa baino altuagoa denean.

- Kanpoko ur aktibitatea baxua da.
- Urak zelulatik ateratzeko joera du.
- Plasmolisia gertatzen da.

Kanpoko ura hartzeko:

- Barneko solutoen kontzentrazioa handitzen dute
  - Prolina, glutamatoa
  - K+
  - Sorbiltola, glizerola



Soluto osmobabesleak

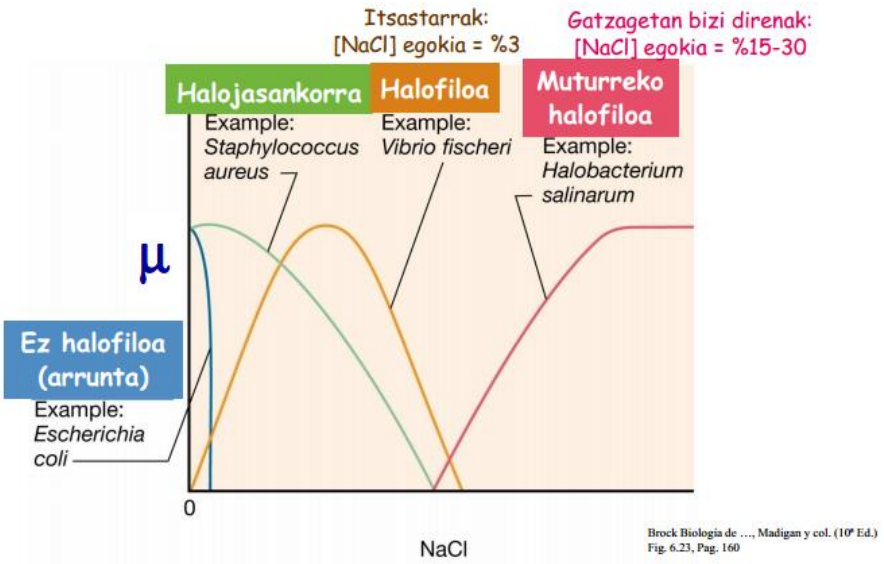
Ur aktibitatearen eta osmosiaren araberako mikroorganismo mota desberdinak:

Osmojasankorrak: kanpoko soluto kontzentrazio altuak jasaten dituzte. Ingurune hipertonikoetan bizi daitezke, isotonikoetan hobeto biziko diren arren.

- Halojasankorrak: Sodio ioi (Na^+) kontzentrazio baxuetan hobeto hazten diren arren, kontzentrazio hauek handitu arren hazteko gai izango dira (ez oso ondo)

Osmofiloak: kanpoko soluto kontzentrazio altuak behar dituzte bizitzeko. Ingurune hipertonikoetan haziko dira, eta kasu batzuetan isotonikoetan hazi daitezkeen arren, oso hazkuntza motela izango dute.

- Halofiloak:Sodio ioi (Na^+) kontzentrazio altuak behar dituzte bizitzeko (itsastarrak).



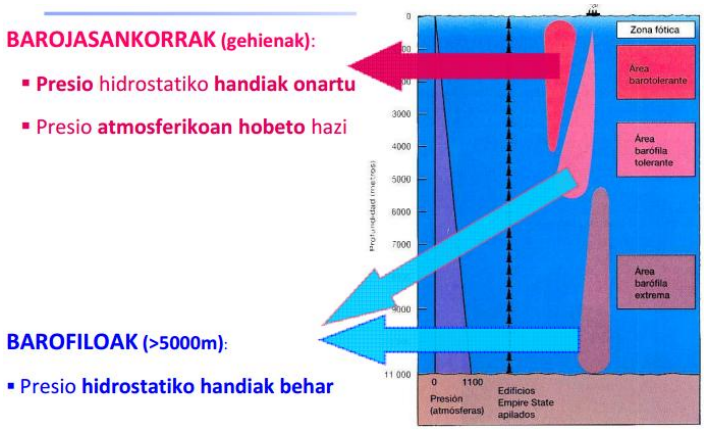
Ez halofiloak: sodiorik ez dagoenean hazten dira, baina, oso sodio kontzentrazio txikiekin dagoeneko ez dira hazten.
Halojasankorra: hazkuntza optimoa sodioaren kontzentrazio baxuetan duen arren, nahiko tarte zabalaren barruan hazkuntza posiblea da.
Halofiloa: sodioaren kontzentrazioak behar dituzte hobeto hazteko, kontzentrazio jakinetan hazkuntza optimoa da.
Muturrekohalofiloa: sodio kontzentrazio minimo bat behar du ongi hazteko.

Laburpentxoa: zer egiten dute ingurune hipertonikoetanplasmolisaketa jasan gabe bizitzeko?
Zelularen barneko solutu kontzentrazioa handitu, kanpora doitzeko:

- Halofilo eta halojasankorrek:
  - Potasio ioia barneratzen dute
- Beste osmojasankor eta osmofiloek:
  - Solutu organikoak sintetizatu eta metatzen dituzte (aminoazidoak, alkoholak…)

Presio hidrostatikoa

- Ur zutabeak egindako presioa
- Naturan presio hidrostatiko handiak ozeanoetako ur sakonetan biereziki:
  - Azaleran: presio hidrostatikoa = presio atmosferikoa (1atm)
  - Sakonera 100m handitzean, presioa x10 handitu
  - Sakonera handiena =(gutxigorab.) 10 500m-koa da (Mariana uharteko fosa). Bertako presioa = 1100atm-koa da.



SAILKAPENA

Barojasankorrak (gehienak):

- 4000-500 metroko sakoneran asko jota. Goi aldean gehiago
- Presio hidrostatiko handiak onartu
- Presio atmosferikoan hobeto hazi

Barofiloak (>5000m):

- Presio hidrostatiko handiak behar
- Oso presio hidrostatiko handiak behar dituzte hazkuntzarako. Oso sakonera handitan badaude, hiperbarofiloak deituak.

**Garrantzitsua: entzimak.*
Zenbat eta presio hidrostatiko handiagoa izan, substratuei lotzeko gaitasuna txikitu egiten da. Garraio abiadura txikitu (bariofiloak astiro hazi, janarien garraioa motela).

Zelularen zatiketa
Zelulak luzatu bai baina tabikerik sortu ez. Sakonera handitan presioaren eraginez firuak agertzen dira.

3. Mikroorganismoen biziraupena:

Inguruneko baldintza fisikoek eta kimikoek mikroorganismo hazkuntzan eragin dute. Hazteko onartutako tartetik kanpora hazkuntzarik ez da gertatzen (estresa). Hala ere, kasu batzuetan bai, bizirauteko estrategiak garatu baitituzte.

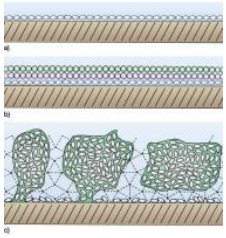
Estres iturriak:

- Eragile fisikoak
  - Tenperatura, presio osmotikoa, erradiazioak, presio hidrostatikoa…
- Eragile kimikoak
  - Antibiotikoak, ioiak, metal astunak, oxigenoa, pHa, elikagaien agorpena…

Normalean baldintza guzti hauek konbinatu egiten dira, eta baldintza batek edo gehiagok eragin dezakete mikroorganismoaren heriotza.

Zer egin estresaren aurrean?

- Fase geldikorrera sartu
  - Fase geldikorreko zelulen ezaugarriak (guztiak ez dira gertatzen aldi berean):
    - Txikiak
    - Apurketa mekaniko erresistenteagoak. Erresistentzia hori horma zelularraren konposizioarekin lotuta dago.
    - Peptidoglikanoarekin lotura gehiago
    - LPS gehiago (lipopolisak)
    - Lipido tanta gehiago mintz plasmatikoan
    - Flagelo eta ile gehiago (flageloen sintesia ihes egiteko interesgarria)
    - Biosintesietarako erreakzio gutxiago (metabolismoaren maila jaitsi)
    - Nukleoidea kondentsatzen da
- Alde egin, mikroorganismo mugikorra baldin bada
  - Flageloak, ileak, gas-besikulak, irristadura… erabiliz.
- Komunitateen eraketa: BIOFILMAK



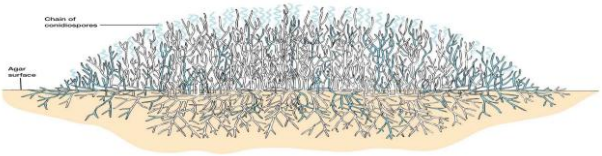
  - Espezie desberdinez osatutako egiturak
  - Toxikoekiko erresistenteagoak
  - Material genetikoa transferitzeko erraztasuna
  - Zelula hauek honelako egiturak eratzen dituztenean, material mukitsu bat sintetizatuko dute (3. Irudia). Honela, zelulak multzoak egiten dituzte eta material honi esker babestuta gelditzen dira. Mikroorganismo ezberdinak agertuko dira honelako biofilmetan taldeka.
- Zelula erresistenteen eraketa
  - Metabolismoaren maila oso baxua (ia ia latentzi egoeran)
  - Zenbait faktorekiko erresistenteak
    - Tenperatura, erradiazioak, lehorketa, oxigenoa, azidoak, alkaliak, toxikoak…
  - Erresistentzi-maila desberdinak

Zelula erresistente motak:

- Exoesporak: aktimonizetoen (bakterioak) artean agertzen dira. Onddoen antzekoak dira.
    - Irudikoa aktinomizeto tipikoa agar elikagarriaren gainean hazitakoa. Firukariak dira eta baldintzak egokiak direnean bai agarrean sartuta eta bai gainean ageri dira.
    - Kultibo medioaren elikagaiak amaitzen direnean konidioak izeneko egiturak eratzen dira: esporaz osatuak. Garrantzitsuak dira esporen koloreak, ezaugarri taxonomikoak adierazten dituztelako.

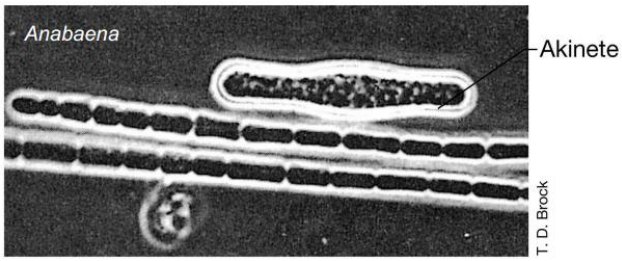
Onddoak, aktinomizetoak: **EXOSPORAK**

Firuen muturretan



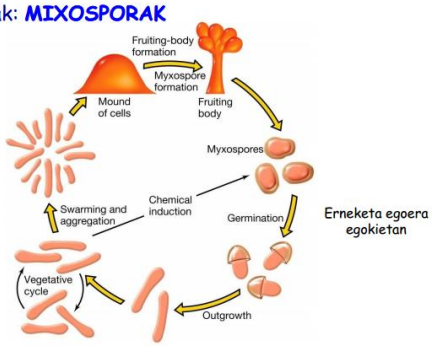
- Akinetoak: zianobakteriofirukarietan ageri dira. Hauek fotosintesi oxigenikoa burutzen dute.
    - Hauetan ere baldintza desegokiak direnean firuak apurtu eta horma zelularra duten egitura handiak eratu (akinetoak). Akinetoei esker baldintza desegokiak hobeto jasango dituzte.

Zianobakterio firukari batzuk: **AKINETOAK**



- Mixobakterioak: organismo hauek nahiko bizi ziklo berezia daukate. Zelula normalak baziloak dira, eta lurrean aurkitzen dira. Elikagaien maila eta inguruneko baldintzak egokiak direnean bazilo itxura horrekin haziko dira. Baina, elikagaiak desagertzen direnean, baziloak elkartu eta makroegitura bat eratzen dute. Makroegitura horretan behean dauden zelulek egitura laua eratuko dute eta goian daudenak eraldatu eta mixoespora izeneko gorputzak eratuko dituzte (fruitu gorputzak).
    - Fruitu gorputzen morfologia etab. ezaugarri taxonomikoak izango dira.

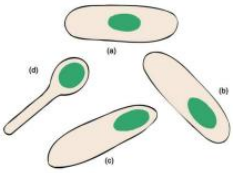
Mixobakterioak: **MIXOSPORAK**

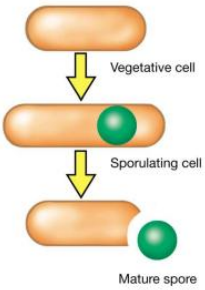


Erresistentzia mekanismo hauek erresistenteak dira baina badituzte beraien mugak. Oso tenperatura altuetan, azido edo alkali muturreko baldintzetan eta elikagai gabekoetan hil egingo dira. Hauek baino zelula erresistenteagoak badaude: endoesporak.

4. Zelula jarkikor motak: bakterioen endospora

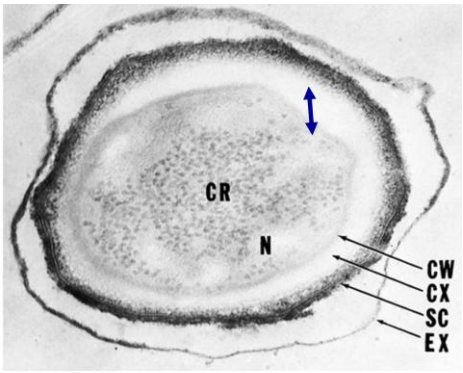
- Bakterio esporodun gehienak bazilo Gram (+)
- Bakterioen barruan eratu (endospora) eta gero kanporatu (espora)
- Zelula begetatibo (arrunta) batek endospora bat sortu (bakoitzak bat). Esporulazioa ez da ugaltzeko modua, bizirautekoa baizik.
  - Morfologia: Borobilak edo oboideak
  - Kokapena: zelularen erdian edo muturrean
  - Batzuetan zelula deformatzen dute.
- Oso biziraupen luzea
- Berriro inguruko egoera egokia denean: erneketa





Beheko irudian duguna endospora baten adibidea da. **Bi parte bereiz daitezke**:

- Protoplastoa (muina): barneko partea da, endosporaren barruan
  - Zitoplasma + nukleoidea mintz plasmatikoaz inguratuta
- Kanpo geruzak: barneko materialarekin konparatuta oso lodiak eta erresistenteak dira. Espeziearen arabera bi edo hiru izan daitezke:
  - EXOSPORIOA (EX): baldin badago, kanpoko geruza
    - Kanpokoena, oso mehea
    - Batzuetan
    - Proteinazkoa
  - ESPORA-ZORROAK (SC): tartekoa izan daiteke, edo kanpokoa
    - Beti agertu
    - Proteinazkoa
  - KORTEXA (CX): barneren dago
    - Beti agertu
    - Peptidoglikanoaren antzekoa



Bacillus anthracis-en endospora (x151000)

Gogoratu! Endosporak inguruko egoerak egokiak ez direnean eta zelula fase geldikorrean dagoenean eratzen dira.

Endosporaren konposaketa kimikoa

Deshidrataturik dago: ura = %10-25

- [Ca^{2+}]altua
- Azidodipikolinatoa (DPA):
    - Zelula begetatiboetan inoiz ez
    - Protoplastoan dago (normalean kaltzioari lotuta: kaltzio dipikolinatoa)
- S.A.S.P. izeneko proteina txikiak ("SmallAcid-SolubleProteins")
    - Zelula begetatiboetan inoiz ez
    - DNAri lotuta

Endosporaren egonkortasuna:

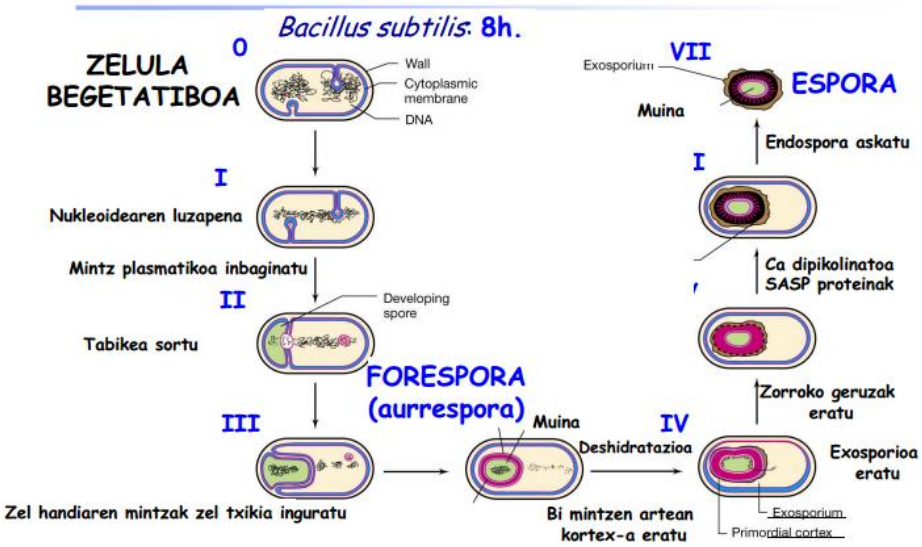
Bere osagaiak ikusita erraz uler daiteke zergatik diren egonkorrak.

- Endosporaren deshidratazioak zelula babesten du beroa eta erradiazioaren aurrean
- Aktibitate metabolikorik ez
- Kanpo geruzek espora babesten dute entzima eta beste konposatu kimikoen aurrean
- Kaltzio dipikolinatoak azido nukleikoa eta proteinak egonkortzen ditu beroa eta konposatu kimikoen aurrean
- Proteina solugarriek (SASP) DNA babestu beroa, erradiazio, lehorketa eta konposatu kimikoen aurrean

Zelula jariakorrak: bakterioen endospora. Zelula hauek nola eratzen diren:

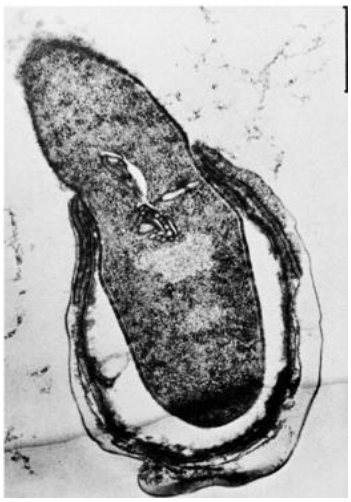
Zelula begetatiboek esporak eratzeko beti fase geldikorrera sartu behar dira. Baldintza desegokietan gertatzen da hau. Morfologiaz oraindik zelula begetatiboak izango dira baina dagoeneko aldaketa batzuk gertatzen dira beraien barnean:

1. Mintzaren inbaginazioak agertu, DNA erreplikatu eta azido nukleoidea luzatu?
2. Inbaginazioak elkartu eta tabikea sortu. Hormaren barruan bi zelula eratzen direla dirudi: bat txikia eta bestea handia. Esporak zelula txikitik eratuko dira.
3. Tabikea sortu ondoren zelula handia inbaginatzen da eta barnera zelula txikia sartuko da. Zelula handiaren mintz plasmatikoak txikia inguratuz (mintz plasmatiko bikoitza agertuko da). Prozesu honetan zelula txikiaren barnean protoplastoa konstante mantentzen da, baina zelula handiarenak (az. Nukleikoak eta abar) pixkanaka degradatzen doaz.
4. Aurrespora eratzen da. Egitura hau zelula handiaren barruan sartuta dago eta dagoeneko endosporaren kanpoko geruzak bereiz daitezke. Etapa honetan deshidratazioa gertatzen da. Orain artekoak aldaketa morfologikoak izan dira gehienbat eta hemendik aurrera aldaketa kimikoak ere gertatzen dira.
    a. Geruzak: exosporioa, kortexa…
5. Molekula berezien sintesia: Ca, dipikolinatoa eta SASP proteinak eratzen hasten dira.
6. Une honetan endospora eratuta dago eta askapena gertatzeko zelula begetatiboa apurtu beharra dago.



Oso zelula erresistenteak dira eta aldaketa gabe zein bideragarri mantenduko dira denbora luzean zehar (urteak izan daitezke).

Ondoren aktibatzeko hainbat aldaketa pairatuko du:Erneketa prozesua



- Aktibapena: kanpo egoera hobetzean
- Ernera: oso arin gertatzen da (minutuak)
    - Kaltzio dipikalinatoa desagertu
    - Kortexa desagertu
    - SASP proteina solugarriak degradatu (Energia eta C iturria)
- Hazkuntza:
    - Ura hartu
    - RNA, DNA eta proteinak sintetizatu
    - Horma sintetizatu, endospora-zorrotik askatu eta bertatik zelula begetatiboa irteten da.
    - Hemen forma tipikoa eratzen da, kasu honetan baziloa.

10 . MIKROORGANISMOEN KULTIBOA ETA KONTROLA

1. Kultibo medioak
   - Osagaiak
   - Motak
2. Inkubazio baldintzak
   - Temperatura
   - Oxigenoa
   - CO_2
   - Argia
3. Mikroorganismoen kontrola
   - Eragile fisikoak
   - Eragile kimikoak
   - Eragile kimioteraupetikoak

1. Kultibo medioak:

- Mikroorganismoen hazkuntzarako edo garraiorako erabiltzen den **elikagaien disoluzioa** da.
- Mikroorganismoak behar dituen elikagai guztiak eduki behar du.
  - Mikroorganismo mota asko dago
  - Mikroorganismoek elikagai-behar desberdinak dauzkate

Ondorioz, kultibo medio mota asko dago.

Kultibo medioaren osagaiak:

- Kantitateari dagokionez…
  - Kontzentrazioak egokiak izan behar dira, ur aktibitatea maila egokian mantentzeko.
- Osagaiei dagokionez, kultibo medio guztietan egon beharrekoak…
  - UR DESTILATUA: disolbatzailea izango da.
  - Oinarri minerala (mikroelikagaiak)
  - Energia iturria (e^- emailea)
  - Karbono iturria
  - Nitrogeno iturria
  - Sufre iturria
  - Beste batzuk…

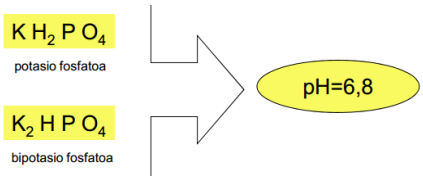
Osagaien azterketa banaka:

- <u>Oinarri minerala:</u>
  - P, K, Mg, Ca, Fe (Si, Na): gatz ez-organiko moduan gehitzen dira.
  - Mn, Co, Cu, Mo, Zn: aurreko gatzen ezpurutasunak dira eta kontzentrazio txikietan agertzen dira. Hauek normalean ez dira gehitu behar, aurrekoak gehitzean gehitzen direlako.
- <u>Energia iturria:</u>
  - Kimiolitotrofoak: molekula ez-organiko erreduzitua. Adibidez amonioa, sulfhidrikoa…
  - Kimioorganotrofoak: molekula organikoa
  - Fototrofoak: Argia. Inkubazioa argitan egin behar da. Ura edo beste konpoatu kimiko bat e^- hartzaile gisa beharrezkoa da.

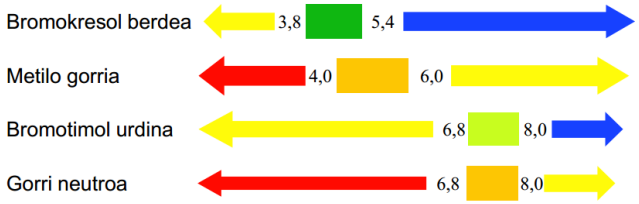
- <u>Karbono iturria:</u>
  - Autotrofoak: CO_2 behar dute derrigorrez.Kultibo medio likidoa denean batzuetan ponpatu egin behar da gasarekin eta solidoa denean normalean aski izaten dute.
  - Heterotrofoak: konposatu organikoa.
  - *Auxotrofoak: hazkuntza faktorea beharrezkoa denean
- <u>Nitrogeno eta sufre iturriak:</u>
  - Elikagai organikoak (askotan)
    - Aminoazidoak eta peptonak. Hau haragi edo legami-aterakinetik.
  - Konposatu ez-organiko oxidatuak (normalean bide hau)
    - NO_3^-, $SO_4^=$
  - Konposatu ez-organiko erreduzituak (gutxitan)
    - Amonioen gatzak, sulfuroak
  - N_2 (nitrogeno finkatzaileak): hauei nitrogenoa gehitzen ez zaienez, airetik hartu behar dute ezinbestean.

Orain artekoak derrigorrezkoak ikusi ditugun arren, **hauek ez dira derrigorrezkoak**:

- <u>Beste osagai batzuk</u>
  - *pH kontrolatzaileak:*
    - **Tanpoiak**. Hauek mikroorganismoaren hazkuntza dela eta pH aldaketak gertatzen direnean jarriko ditugu, aldaketa horiek eragozteko.



    - **pH adierazleak**: normalean gure kultibo medioa neutroa da. Mikroorganismoak erein ondoren kultibo medioaren pHa aldatuz gero kolore aldaketak ikusiko ditugu. (adib. ez jakin)



  - *Hazkuntzaren inhibitzaile hautagarriak*
    - Antibiotikoak
    - Detergenteak: zetrimida: honekin ia mikroorganismo guztiak hiltzen dira. Salbuespena →*Pseudomonasaeruginosa* (+). Hau patogeno bat da eta guztiz erresistentea da. (beste pseudomonas batzuk ere hazten dira baina nahiko eskax)
    - Gatz biliarrak, bioleta kristala: Gram positiboak inhibitzeko

  - *Solidifikatzaileak*
    - Agar-agarra

Irizpideak	Motak	Ezaugarriak
Egoera fisikoa	Likidoak	Osagaiak uretan disolbatuak
	Solidoak	Agente solidifikatzailea: agarra (15g/L) (gelatina,…)
	Erdisolidoak	Agente solidifikatzailea: agarra (7g/L)
Konposaketa kimikoa	Sintetikoak (zehaztuak)	Elikagaien konposaketa kimiko zehatza ezaguna da
	Konplexuak (zehaztugabeak)	Elikagaien konposaketa kimiko zehatza ez-ezaguna (peptonak, aterakinak, …)
	Aberastuak	Elikagai bereziren bat daukaten medio konplexuak (odola, gazura, …)
Funtzioa	Orokorrak	Mikroorganismo gehienen hazkuntzarako
	Bereizgarriak	Mikroorganismoak bereizteko osagaiak dauzkan medioak
	Hautagarriak: *Aberasgarriak (azpitaldea)* *Identifikaziozkoak (azpitaldea)*	Mikroorganismo batzuk bakarrik hazten dira
		Kopuru txikian dauden mikroorganismoen hazkuntza faboratzeko. Hautagarriak dira.
		Mikroorganismoaren ezaugarri bat (fisiologikoa) detektatzeko.

2. Inkubazio baldintzak

Tenperaturaren kontrola:

Hau laborategian ikusi dugu. Tenperatura mantentzen duten labeetan inkubatzen dira.

Oxigenoa:

- Aerobioen kasuan

Kultibo medio solidoetan ez dago inongo arazorik, aireko oxigenoa erraz sartuko baita difusioaren bidez.

Kultibo medio likidoak direnean bolumen oso txikietan, kultibo medioaren bolumena txikia denez, airearen oxigenoa erraz sartuko da ere bai.

Kultibo medio likidoak bolumen handitan: oxigeno gutxi ager daiteke hainbat zonaldetan, eta gainera mikroorganismoek kontsumitzen badute, baldintza anaerobioak sor daitezke.

Inkubagailu irabiodunak: Aerobioen kultiboak irabiatu behar dira oxigenoaren kontzentrazio egokiak lortzeko kultibo medioetan, modu uniforme batean bolumen osoan.

Oxigenazio zuzenak: tutuen bidez oxigenoa ponpatzea zuzenean kultibo mediora.

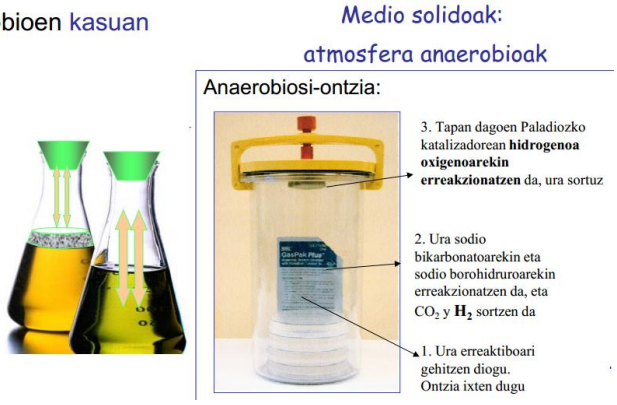
Aerobioen kultiboak irabiatu behar dira

INKUBAGAILU IRABIODUNak

- Anaerobioen kasuan

Anaerobiosi ontzia:

1. Ura erreaktibari gehitzen diogu. Ontzia ixten dugu.
2. Ura sodio bikarbonatoarekin eta sodio borohidruroarekin erreakzionatzen da CO_2 eta H_2 sortzen da.
3. Tapan dagoen Paladiozko katalizadorean hidrogenoa oxigenoarekin erreakzionatzen da, ura sortuz



Anaerobiosi ganbara: huts ponpekin konektatuta oxigenoa kanporatzeko.

Karbono dioxidoa (CO_2):

Kasu batzuetan CO_2 kontzentrazio jakin bat beharrezkoa da.

- Labeko aireko CO_2
- Labeko airea + CO_2 [...]

Argia:

- Argi naturala
  - Ez da jarraikia, kontrol zaila
- Lanpara hotzak
  - Intentsitatea, iraupena (zikloak) eta uhin luzera kontrolatzen ditugu

3. Mikroorganismoen kontrola:

- **Helburuak:**
  - Kontaminazioa galeraztea (laboratorioetan, kirofanoetan)
  - Mikroorganisek sortutako gaixotasunen transmisioa galeraztea
  - Elikagaien eta beste produktu batzuen deskonposaketa galeraztea

- **Nola kontrolatzen ditugu?:**
  - **Mikroorganismoak hilko ditugu**
  - **Mikroorganismoen hazkuntza inhibituko ditugu**

Gaixotasunaren kontrolaren barnean antibiotikoak eta beste sustantzia batzuk daude.

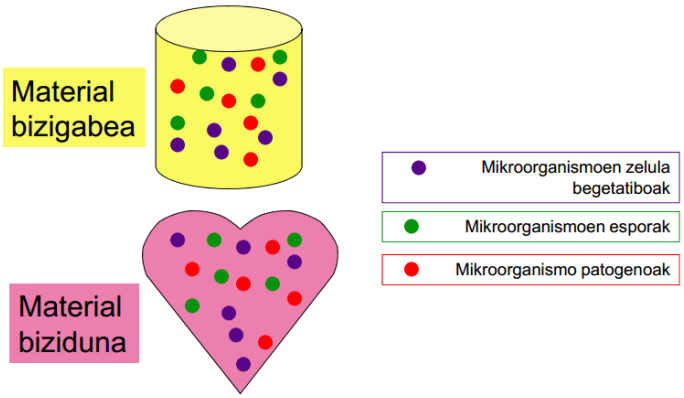
Nola kontrolatu?

1. Ez dira egongo eta listo
2. Beti proportzio berean mantendu behar dira, bideragarri baina ez hazkuntzan.

Definizio batzuk:

Tratamenduak oso desberdinak dira material bizigabe eta bizidunean. Bizigabean askoz erresistenteagoak izango dira materialak.

- Material bizigabea: matrazeak…
- Material biziduna: animaliak…

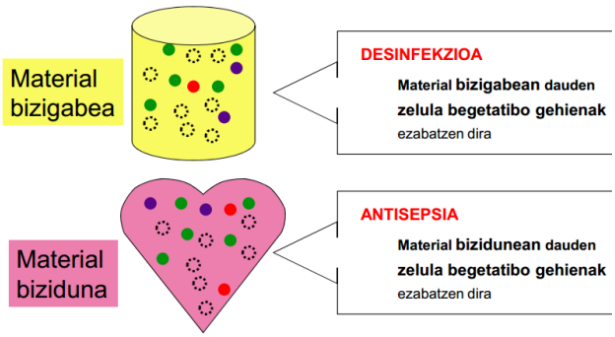


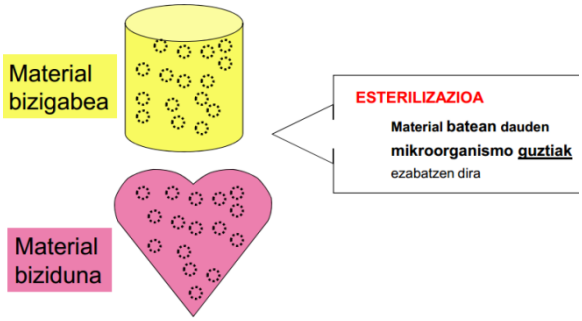
Edozein materialen barnean mikroorganismoen nahasketa aurkituko dugu. Mikroorganismo horiek orokorrean honakoak izango dira:

1. Zelula begetatiboak: nahiko sentikorrak orokorrean. Edozein fasean egon daitezke (hazkuntza, latentzi…).
    a. Patogenoak edo normalak izan daitezke.
2. Gainera mikroorganismo batzuek esporak ekoiztu ditzakete, beraz, material horretan posiblea da esporak egotea (edozein espora mota: endosporak, mixosporak…). Oso erresistenteak dira.
    a. Patogenoak edo normalak izan daitezke.

Gure helburua:
Material honetan dauden mikroorganismoak kontrolatzea. Honetarako:

1. Desinfekzioa: material bizigabean dauden zelula begetatibo gehienak ezabatzen dira. Baina, esporak normalean bideragarri gelditu daitezke eta hainbat zelula eta patogeno batzuk ere bai. Gehienak hiltzen dira baina ez guztiak.
2. Antisepsia: material bizidunean dauden zelula begetatibo gehienak ezabatzen dira. Aurrekoaren prozesu antzekoa da, baina material bizidunengan aplikatzen da.
3. Esterilizazioa: hau kontzeptu orokorra da, material bat esteril edo ez esteril egon daiteke. Gainera, material bizidun zein bizigabean egin daiteke. Kasu honetan, material batean dauden mikroorgansimo**guztiak** ezabatzen dira.





Mikroorganismoak hiltzeko erabiliko dugun material edo eragilea:

- **GERMIZIDA**: mikroorganismoak **hiltzen dituena**
  - Bakterizida
  - Fungizida
  - Algizida
  - Birizida

- **GERMISTATIKOA**: mikroorganismoen **hazkuntza inhibitzen duena**
  - Bakteriostatikoa
  - Fungistatikoa
  - Algistatikoa
  - Birustatikoa

Heriotza tasa: nola kontrolatu

Hainbat esperimenturen bidez heriotza tasa kontrolatu daiteke. Honetarako, lehenengo, erabiliko dugun mikroorganismoaren ezaugarriak erreparatu behar dugu. Adib)

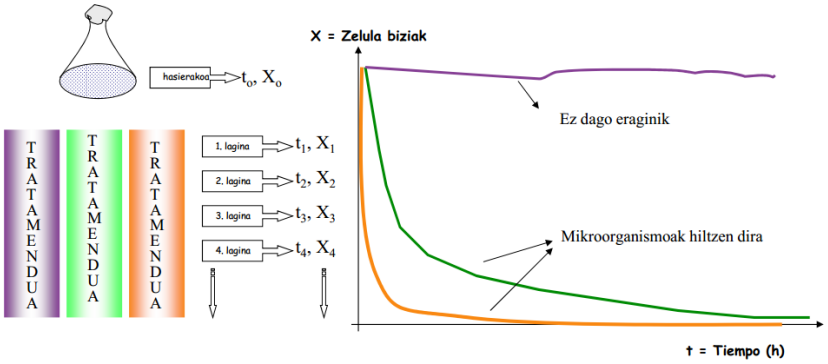
- E. coli, mesofiloa eta ez esporaduna

Ondoren eragile kimiko eta fisikoak determinatu behar ditugu:

- Eragilea: tenperatura
- Eragilearen intentsitatea:
  - 40ºC, 50ºC, 60ºC, 70ºC… Germizida, T altuetan heriotza
  - 10ºC, 0ºC, -10ºC… Germistatikoa, daudenetan mantenduko dira.

Hauek finkatutakoan mikroorganismoaren esekidura prestatuko dugu. Ondoren, esekidura tratamendu batean jarriko dugu, adib) 40ºC-tan. Inkubazioa egin eta denbora tarte baten zehar azpilaginak hartuko ditugu.

Azkenik emaitzak interpretatzeko grafikoa eraiki. X ardatza = denbora; Y ardatza = Zelula bizi kopurua.

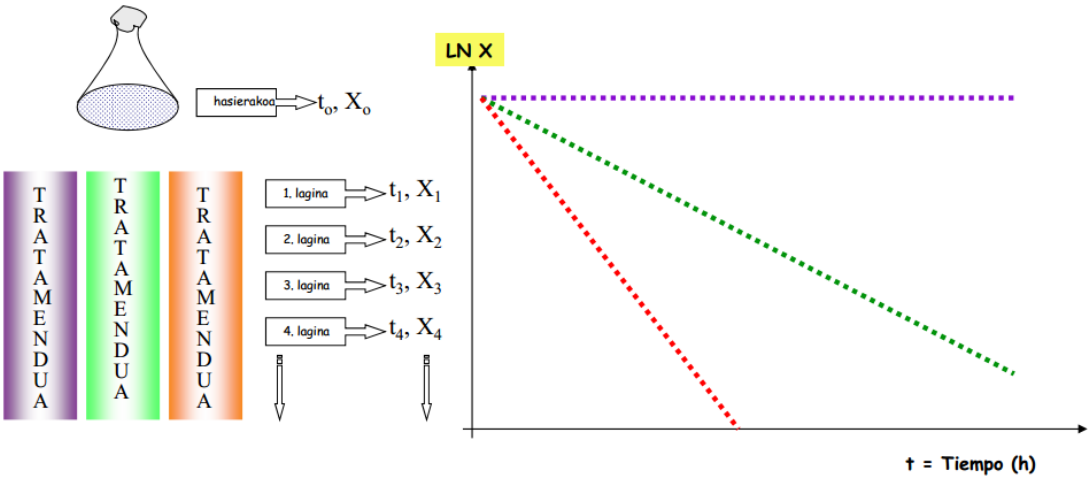


Tratamendu morearekin (40ºC), mikroorganismoen dentsitatea konstante mantentzen dela ikus daiteke, beraz, tratamendu hau ez da ona mikroorganismoak hiltzeko.

Tratamendu berdearekin (60ºC), mikroorganismoak hiltzen doaz, eta tratamenduaren iraupena luzatuz, mikroorganismoen dentsitate oso baxua lor dezakegu.

Azkenik laranjarekin (70ºC), mikroorganismoak berehala hil.

Heriotza tasa: nola kalkulatu?



Hau logaritmo nepertarrera egiten den betiko aldaketa litzateke. Heriotza tasa lerro hauen **malda** izango da.

- 40ºC → Malda = 0
- 60ºC → Malda = $0{,}5h^{-1}$
- 70ºC → Malda = $0{,}7h^{-1}$

Heriotza tasan eragiten duten faktoreak:

- Populazio tamaina: oso kontaminatuta dagoen zerbait esterilizatzeko denbora gehiago behar dugu.
- Populazio mota (zein espezie mota)
- Eragile kimiko mota eta kontzentrazioa
- Eragile fisikoaren mota eta intentsitatea
- Tratamenduaren iraupena
- …

Faktore hauek prozedura estandarrak ezartzeko eta diseinatzeko kontuan hartzen dira.

Mikroorganismoen kontrolean erabiltzen diren eragileak:

Eragile fisikoakvs.

- ✓ Tenperatura
- ✓ Iragazketa
- ✓ Erradiazioak

Eragile kimikoak

- ✓ Desinfektatzailea
- ✓ Antisepsia
- ✓ Eragile kimioterapeutikoak

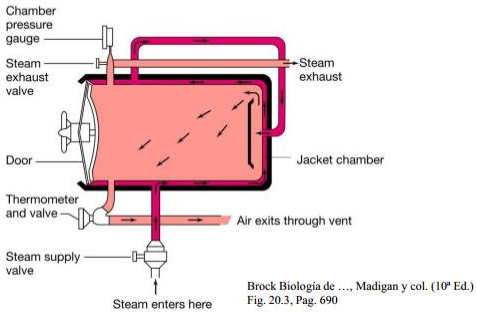
Eragile fisikoak:

- **Tenperatura**:
  - Beroa:
    - Bero hezea (ur lurrina): autoklabea
      - Mota askotako materialak eta bolumen txikiak
      - Baldintzak: 1,1 atm, 121ºC, 20min
    - Bero lehorra: labea
      - Beirazko edo metalezko materialak
      - Baldintzak: 180ºC, 2h
    - Pasteurizazioa: bero-trukagailua
      - Higienizazioa da, ez desinfekzioa. Hemen mikroorganismo ez patogenoak eta esporak bizirik gelditzen dira. Soilik patogenoak hitzen dira.
      - Esnea eta elikagai termosentikorrak
      - HTST (hightemperature-shortterm): 71ºC, 15s → garagardoak tratatzeko.
      - UHT (ultra hightemperature): 140ºC, 3s → esnea tratatzeko, oso tratamendu laburra da.
    - Aldizkako beroa: hau ia ia ez da erabiltzen. Sistema honen helburua mikroorganismoen heriotza lortzea da
      - Honetan datza: berotu, zelulak hil eta esporak utzi. Esporak germinatzen utzi eta ondoren berriro ere bero altuak aplikatu. Ziklo hau behin eta berriz.
  - Hotza
    - Hozketa (0-7ºC) →psikrofiloak baldin badaude, hazten dira.
    - Izozketa (<-20ºC) kasu honetan mikroorganismoak bizirik manteduko dira, baina ez dira proliferatuko.
    - Eragina mota: germistatikoa

Beroa

Bero hezea (ur-lurrina): AUTOKLABEA

- Mota askotako materialak, bolumen txikiak
- Baldintzak: 1,1 atm, 121ºC, 20 min



Brock Biología de …, Madigan y col. (10ª Ed.)
Fig. 20.3, Pag. 690

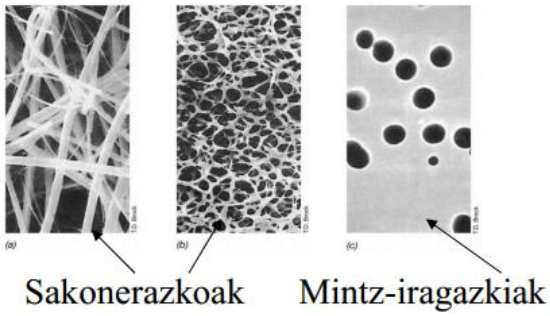
Beroa

- Bero hezea (ur-lurrina): AUTOKLABEA
- Bero lehorra: LABEAK
- Pasteurizazioa: BERO-TRUKAGAILUA
- ALDIZKAKO BEROA

Hotza

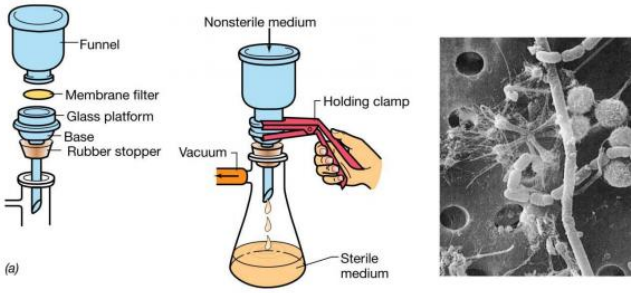
- **HOZKETA** (0-7ºC) --> Psikrofiloak hazten dira
- **IZOZKETA** (< -20ºC)
- Eragina mota: germistatikoa

- **Iragazketa**
    - Ezaugarriak
        - Partikulak fluidotik ateratzen ditugu
        - Birusak kentzeko ez da erabiltzen
        - Likido termolabilak, gasak
        - Iragazki motak: sarkonerazkoak, mintz-iragazkaitzak…



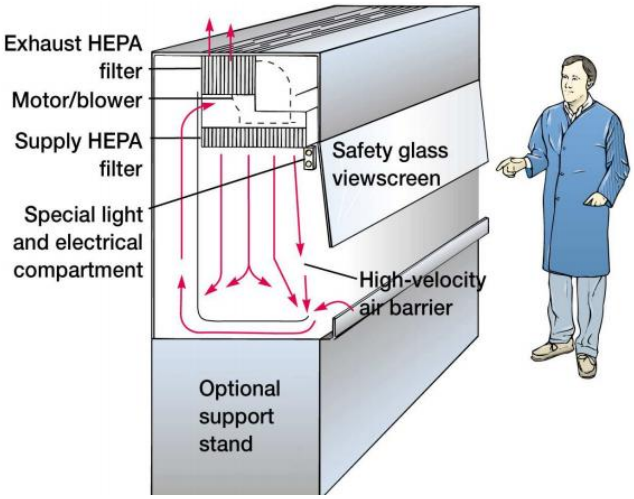
Adibideak: Nola iragazi?

Mekanismoa:

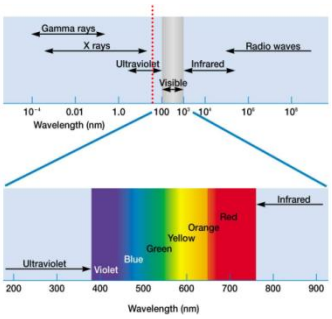


Jasotzen dugun medioa esterila izateko iragazkiaren poroak oso txikiak izan behar dira.

Sistema hauek <u>segurtasun kanpaietan</u> ere erabltzen dira:

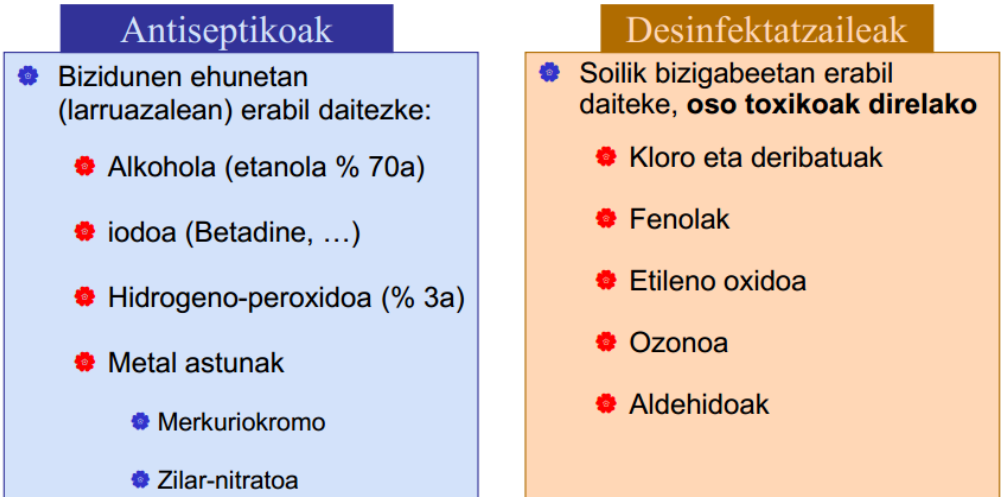


- **Erradiazioak**: batez ere plastikozko materiala esterilizatzen da. Hemen uhinak oso uhin luzera txikia dute eta horiek bakterioekin aurkitzean heriotza eragiten dute.
    - <u>Erradiazio ionizatzaileak</u>
        - DNA eta proteinak degradatzen dituzte erradikal askeen sorrera eraginez.
        - Gehen erabiltzen direnak: gamma izpiak
        - Erabilerak
            - Elikagaien eta farmatziaren industrietan
            - Material medikoa esterilizatzeko



    - <u>Erradiazio ultramorea</u>
        - DNAn timinarendimeroak sortzen ditu
        - Airea eta azalerak esterilizatzeko. Lehenengo gela esterilizatu behar da eta ondoren aire esterilari sarrera eman.

Eragile kimikoen bidezko kontrola:

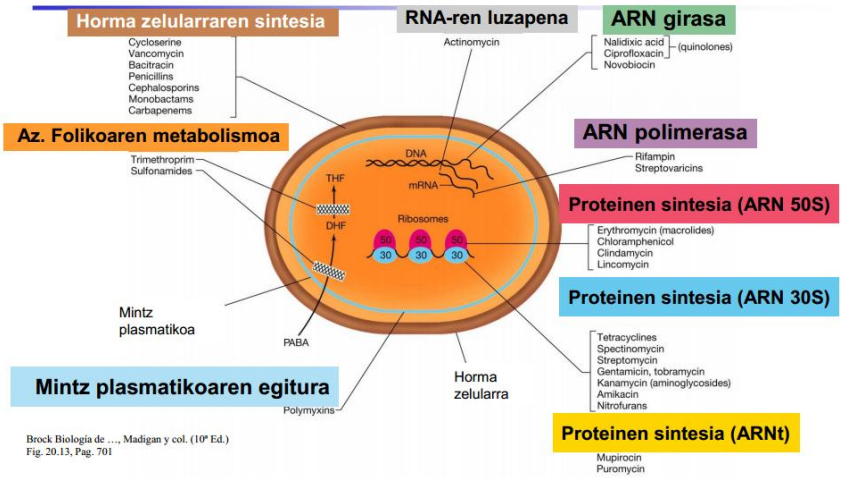


Antiseptikoak kontzentrazio txikietan egoten dira.

Eragile kimioterapeutikoak

Zer dira?

- Mikroorganismoen aurka erabiltzen den konposatu kimikoa. **Barne-tratamenduetan** erabil daitezke, gaixotasun infekziosoak sendatzeko. Batzuk germizidak izan daitezke eta beste batzuk germistatikoak.
- Toxiko hautagarriak dira: patogenoa hil baina ostalaria kaltetu gabe.
- Ezagunenak: antibiotikoak.
- *Batzuetan efektu sekundarioak izan ditzakete.



Antibiotiko polimixinek adibidez mintz plasmatikoa aldatzen dute. Az. Folikoaren metabolismokoek adibidez, azido folikoaren sintesia eragiten dute. Beste batzuek proteinen sintesian eragina… hau guk ikus dezagun da.

Molekula dianak oso desberdinak izan daitezke erabiltzen dugun antibiotikoaren arabera. (ideia honekin geratu)

Eragile kimioterapeutikoak: mikroorganismoen erresistentziak

Eragileak eragindako egitura ez dago gure mikroorganismo horretan. Adib)

- Mikoplasmak hormarik gabekoak dira → penizilinarekiko erresistenteak, honek horma peptidoglikanoarekininterakzionatzen duelako.

Eragilea ezin da sartu. Adib)

- Gram negatibo gehienak penizilinarekiko iragazkaitzak dira.

Nahiz eta eragilea zelulara sartu, mikroorganismoak erraz kanporatzen ditu. Adib)

- *Staphylococcusaureus* patogenoak kloranfenikola kanporatzen du.

Mikroorganismoek eragilea kimikoki aldatzen du. Adib)

- Estafilokokoen laktamasek penizilina hidrolizatzen dute

Mikroorganismoa eragileak eragindako egitura aldatzeko gai da. Adib)

- Enterokokoekpeptidoglikanoaren konposaketa aldatuz bankomizinarekiko erresistentzia lortzen dute.

GEHIGARRIA:

AZTERKETAKO ARIKETA TIPIKOA:

MEDIO 1

K_2HPO_4…….. 1g
$MgSO_4 . 7H_2O$… 0,2g
$FeSO_4 . 7H_2O$… .0,01g
$CaCl_2$……...0,01g
Mn, Mo, Cu,Co,
Zn (bakoitza)…..0,02 mg
Ur dest……1 litro

MEDIO 2:

NH_4Cl……..…1g
Oinarri minerala….. 1 litro

MEDIO 3:

Glukosa……..…5g
NH_4Cl……...1g
Oinarri minerala….. 1 litro

MEDIO 4:

Ziklohexim idа……0,1mg
Glukosa……5g
NH_4Cl……...1g
Oinarri minerala….. 1 litro

MEDIO 5:

Legamia aterakina…5g
Glukosa……5g
NH_4Cl……...1g
Oinarri minerala….. 1 litro

MEDIO 6:

Agar-agarra……15g
Legamia aterakina…5g
Glukosa……5g
NH_4Cl……...1g
Oinarri minerala….. 1 litro

MEDIO 7:

Gorri fenola……0,002 gr
Agar-agarra……15g
Legamia aterakina…5g
Glukosa……5g
NH_4Cl……...1g
Oinarri minerala….. 1 litro

*Oinarri minerala medio1-en gatz gutxi horiek eta ur litro bat izango da. Gainontzeko kultiboetan horiez gain beste sustantzia batzuk daude.

MEDIO 1

- Egitura aldetik likidoa.
- Konposaketa: zehaztua
- Funtzioa: kimioorganotrofoak ez dira haziko ez daudelako material organikorik. Kimiolitotrofoak bai.
- Ez dago nitrogeno iturririk eta ezta ere karbono iturririk. Baina inkubazioa airean egiten bada oxigenoarekin, aireak CO2 eta nitrogeno molekularra dago. Bakterio batzuk nitrogenasa entzimaren bidez aireko nitrogenoa finkatu dezakete, eta erabilera eman.
- Ondorioz: fotosintesi oxigenikoa dutenak, nitrogenasadutenak… haziko dira.

MEDIO 2

- Egitura aldetik likidoa.
- Konposaketa: zehaztua
- Funtzioa: kimiolitotrofoak, eta fotolitotrofoak inkubazioan argia jarriz gero.
- Kasu honetan nitrogeno iturri erreduzitu bat dago, ondorioz, amonio hori nitrogenoaren kimiolitotrofo batentzat izango da energia iturri eta indar erreduzitzaile. Nitrogenoaren kimiolitotrofoak haziko dira, gainera gehienak CO2 finkatzaileak dira, beraz, airearekin inongo arazorik gabe haziko dira.

MEDIO 3

- Kasu honetan glukosa dagoenez, ez dago arazorik karbono iturriarekin.
- Gainera amonioa ere badago, nitrogeno iturria.
- Inkubazio aerobioa burutzen badugu, mikroorganismo aerobioak hazio dira, eta anaerobioarekin berdin.

MEDIO 4

- Egitura aldetik likidoa.
- Konposaketa: zehaztua
- Ziklohexim̄ida = antibiotikoa. Hau inhibitzaile bat da, eta inhibitzaile bat jarri dugunez, kultibo medio hau bereizgarria, orokorra, hautagarria? Zer izango da? Nik uste, hautagarria.

MEDIO 5

- Egitura aldetik likidoa.
- Konposaketa: konplexua. Legami aterakinean denetarik egongo dira, proteinak…

MEDIO 6

- 5.aren berdina da baina egoera fisikoa aldatuta.

MEDIO 7

- Aurrekoa bezalakoa da, baina gorri fenolarekin. Gorri fenola pH adierazle bat da, ondorioz, kultibo medio hau bereizgarria izango da. Kultibo medioaren azidifikazioa edo basifikazioa detektatu ahal izango da.