

Podłoże biologiczne- mieszanina odpowiednio dobranych **składników** odżywczych, **dostarczających** hodowanemu na nich organizmowi **niezbędnych pierwiastków chemicznych**(C,H,N,P,S) oraz **źródła energii**. Każde podłoże musi mieć odpowiednią dla danego gatunku **wartość odżywczą, pH, potencjał oksydoredukcyjny (rH) oraz wartość osmotyczną, dostępność tlenu**. Ważne jest również określenie **do jakiego celu ma służyć dane podłoże**, czy chodzi nam tylko o **namnożenie** komórek, czy o **wyselekcjonowanie** jakiegoś konkretnego gatunku drobnoustroju, czy też o **zróźnicowanie** gatunków występujących w mieszaninie. Jednym z koniecznych warunków, jaki muszą spełniać wszystkie podłoża jest ich **sterylność**, co oznacza, że muszą być pozbawione wszelkich organizmów – **zarówno ich form wegetatywnych jak i przetrwalnych** oraz **przejrzystość**.

Podziały podłoża biologicznego:

- **zapotrzebowanie pokarmowe:**
 - ✓ minimalne- minimum pokarmowe, niekorzystne energetycznie, np. Davisa, Fiedorowa(bezazotowe)
 - ✓ pełne- wszystkiego w bród, np. Bulion odżywczy
 - ✓ wzbogacone- dla organizmów o specyficznych upodobaniach(np. witaminy)
- **skład chemiczny:**
 - ✓ naturalne-nieznany skład, np. Mleko
 - ✓ półsyntetyczne- skład znany w połowie(podłoże minimalne+dodatki,których składu nie znamy np. kazeina)
 - ✓ syntetyczne- skład znany, podłoże minimalne+określone ilości określonych substancji
- **konsystencja:**
 - ✓ płynne- brak czynników zestalających, np. Bulion odżywczy
 - ✓ półpłynne-agar płynny(0,1-0,7%agaru), bakterie mogą go przerastać, do namnażania bakteriofagów
 - ✓ stałe-do wylewania na szalki(1,5-2% agaru)--> agar+bulion odżywczy=agar odżywczy
- **zastosowanie**
 - ✓ namnażające-PŁYNNE, do otrzymywania dużej biomasy
 - ✓ wybiórcze(selekcyjne)-STAŁE lub PŁYNNE, mają lub nie jakąś substancję
 - ✓ namnażająco-wybiórcze-PŁYNNE, do określania dużej biomasy o określonej cesze
 - ✓ różnicujące(elekcyjne)-do hodowania bakterii o wyróżniającej się cesze, STAŁE, np. EMB

Źródła pierwiastków biogennych:

- **N:** NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , aminokwasy, N_2
- **S:** aminokwasy, siarczany
- **C:** cukry, CO_2

POŻYWKI:

- **bulion odżywczy**- do otrzymywania dużej biomasy, bogate, płynne
- **agar**- topnieje w ok.90°C, krzepnie w ok. 40°C, można go wielokrotnie używać, uzyskiwany z krasnorostów, wielocukier wzbogacony MgSO_4 lub CaSO_4 . Nie dla każdej bakterii.
- **Żelatyna**-rozpuszcza się w temperaturze 26-30°C, krzepnie tylko raz, wiele bakterii ma proteazy, które ją upłynniają
- **krzemionka**(żele krzemionkowe)- krzepnie tylko raz, bardzo twarde -->trudno posiać bakterii [podłoże stałe bez substancji organicznych]

SPOSOBY PRZECHOWYWANIA BAKTERII:

- ✓ słupek- podłoże półpłynne
- ✓ szalka- podłoże stałe

WYJAŁAWIANIE:

- **Autoklaw**- hermetycznie zamknięty kocioł z podwójnym dnem, wrzącą parą wodną i nadciśnieniem 1 atmosfery. Temperatura wzrasta do 121°C na 15-30 minut. [agar, bulion odżywczy, sól fizjologiczna, bufony, woda destylowana, narzędzia chirurgiczne, opatrunki]
- **tyndalizacja**- trzykrotne ogrzewanie jałowionego podłoża w temperaturze 100°C przez 30 minut co 24 godziny. W czasie pierwszego ogrzewania zabite zostają formy wegetatywne, a przetrwalniki zostają zaktywowane do kiełkowania, w wyniku działania wysokiej temperatury i obecności pewnych związków orhanicznych. Proces ten jest możliwy dzięki pozostawieniu jałowionego materiału w temperaturze pokojowej przez ok. 24 godziny. Następne ogrzewanie zabija kiełkujące przetrwalniki(które utraciły ciepłooporność). Trzecie ogrzewanie zabija ewentualne formy wegetatywne pozostałe po opóźnionym kiełkowaniu. {stężone roztwory cukrów, witamin, aminokwasów itp]
- **filtracja**- jałowienie płynów, które ulegają rozkładowi pod wpływem ciepła(np. Roztwór mocznika, surowica). Polega ona na przepuszczaniu jałowionego płynu przez filtr o określonej wielkości porów zrobionego np. z octanu lub azotanu celulozy przy zastosowaniu nad- lub podciśnienia. Filtr zatrzymuje bakterie na zasadzie mechanicznej i/lub fizyko-chemicznej. Filtry i oprawki do filtrów należy przed użyciem wyjałowić(na ogół w autoklawie); sterylne musi być także naczynie, do którego filtrujemy jałowy płyn.UWAGA: podczas filtracji pozbywamy się bakterii ale nie WIRUSÓW!![bufory i inne roztwory, których chcemy użyć natychmiast.]
- **Promieniowanie**: UV, γ , X[pomieszczenia, fartuch]
- **Suszenie**- jałowienie w wysokiej temperaturze bez udziału wody(pary wodnej).[szkło-160-180 stopni C przez 1-1,5h]
- **Środki chemiczne**[blaty, pomieszczenia]- np. tlenek etylenu- zabija formy wegetatywne i przetrwalnikowe(działa w min 5-15% obecności wody)
 - x stężonych kwasów, zasad i soli nie trzeba jałowić- tam i tak nic nie wyrośnie.

Cechy umożliwiające bakteriom szerokie rozprzestrzenienie:

- 1) małe rozmiary
- 2) krótki czas generacji
- 3) różnorodność metaboliczna (zdolność do wykorzystania wielu źródeł węgla, azotu, energii, różnych ostatecznych akceptorów elektronów)
- 4) zdolność adaptacji do zmieniających się warunków środowiska
- 5) zdolność do życia w warunkach ekstremalnych (dotyczy to temperatury, pH, potencjału oksydo-redukcyjnego, ciśnienia osmotycznego, ciśnienia hydrostatycznego i bardzo niskich stężeń substancji pokarmowych)
- 6) wytwarzanie form przetrwalnych

Środowiska życia bakterii:

➔ POWIETRZE:

- x mało substancji odżywczych
- x duża amplituda temperatur
- x brak podłoża do przyczepu
- x niewielka ilość dostępnej wody
- x zanieczyszczenia
- x promieniowanie UV- mutagen(obecność barwników karotenoidowych)
 - ✓ duża dostępność tlenu
 - po samym kolrze nie da się oznaczyć rodzaju bakterii

➔ GLEBA:

- x dostępność tlenu zaledwie 30 cm wgłąb
- ✓ duża dostępność pokarmu

- ✓ dość dobra dostępność wody
 - 2 typy flory:
 - mikroflora autochtoniczna- bakterie zawsze są w niej obecne
 - mikroflora zymogenna- bakterie pojawiają się okresowo
 - zwykle brak barwników

→ **WODA:**

- x dostępność tlenu tylko przy powierzchni
- x powierzchniowe warstwy narażone na działanie promieniowania UV
 - ✓ duża dostępność wody
 - ✓ duża dostępność pokarmu
 - ✓ łatwe poruszanie

→ **ORGANIZMY ŻYWE- WARUNKI BARDZO RÓŻNE**

Hodowla- podłoże z namnożonymi mikroorganizmami. Hodowle można prowadzić na podłożu płynnym bądź stałym. Hodowle mogą być jednorodne (gdy na podłożu rośnie jeden gatunek bakterii) lub mieszane (gdy rosną w nich przynajmniej dwa gatunki).

Kolonia- widoczne gołym okiem skupisko drobnoustrojów na podłożu stałym. Na ogół kolonia powstaje w wyniku podziałów pojedynczej komórki

Czysta kultura- hodowla, w której bakterie stanowią potomstwo jednej, pierwotnie wyosobnionej komórki bakteryjnej

Klon -czysta kultura i pochodzące od niej populacje bakteryjne.

Szczepy- różne klony należące do tego samego gatunku, a wyprowadzone z poszczególnych czystych kultur, izolowanych niezależnie od siebie. W obrębie gatunku mogą więc występować szczepy różniące się pewnymi cechami.

METODY OTRZYMYWANIA CZYSTYCH KULTUR:

- bezpośrednia- z wykorzystaniem mikromanipulatora
- seryjnych rozcieńczeń Listera
- posiew redukcyjny
- rozcieńczeń (0,1 ml, głaszczka- płytka mazana)
- płytki lane (gdy spodziewamy się niewielkiej ilości bakterii)
- replik(płytek odciskowych)

Liczba drobnoustrojów:

- ✓ **w powietrzu**

$$X = \frac{a \times 100}{b \times c}$$

gdzie:

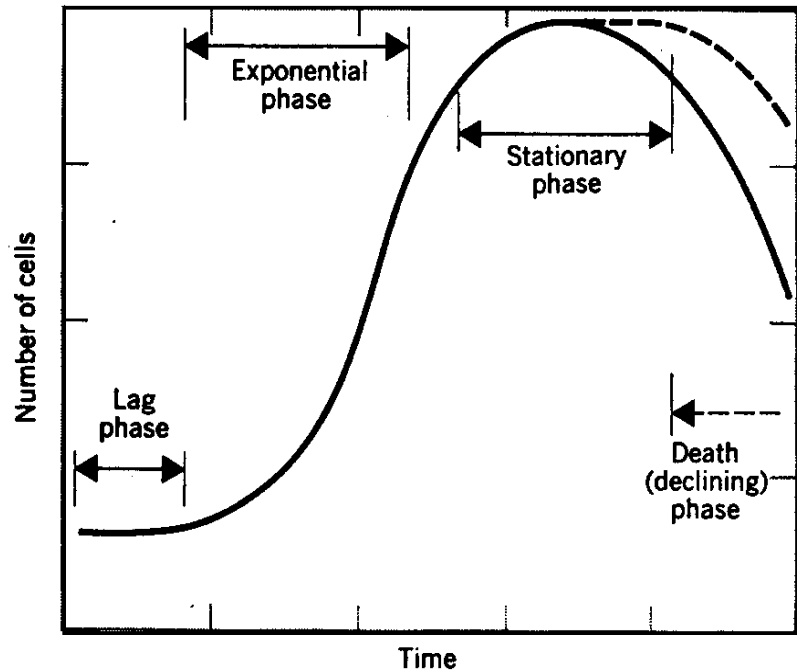
- a - uśredniona liczba kolonii na płytce,
- b - powierzchnia płytki w cm²;
- c - współczynnik czasu (dla 5 minut wynosi 1, dla 10 - 2, dla 15 - 3 itd.)
- 100 - przeliczenie powierzchni płytki na 100 cm²

- ✓ **w wodzie**

$X = a \times b \times 10$ gdzie a - średnia liczba bakterii na płytkach;
 b - odwrotność wysianego rozcieńczenia;
 10 - przeliczenie na 1 ml (wysiewamy 0,1 ml).

HODOWLE:

OKRESOWA- po wsianiu bakterii na odpowiednie podłoże płynne i inkubowaniu ich w optymalnych dla danego gatunku warunkach następuje, po okresie adaptacji, intensywny przyrost liczby bakterii w hodowli. Jednakże skład podłoża takiej hodowli podlega stopniowym i ciągłym zmianom; ubożeje ono w składniki pokarmowe, natomiast nagromadzają się w nim metabolity, wykazujące często działanie toksyczne. Bakterie po okresie intensywnego wzrostu, w którym liczba komórek rośnie w postępie geometrycznym, zaczynają się dzielić coraz rzadziej, w wyniku czego hodowla wchodzi w fazę równowagi a następnie w fazę zamierania, w której podziały prawie zupełnie ustają, a liczba żywych komórek maleje.



CIĄGŁA- utrzymywanie hodowli w fazie intensywnego wzrostu przez dłuższy czas, ciągle uzupełniając zużywane z podłoża składniki pokarmowe oraz odprowadzając z hodowli nagromadzające się metabolity i nadmiar komórek.

SYNCHRONICZNA- kiedy stworzymy warunki do równoczesnego podziału wszystkich bakterii w hodowli- odzwierciedla zachowanie się pojedynczej komórki i przez to może być przydatna w wielu badaniach dotyczących fizjologii i genetyki bakterii.

TYPY WZROSTU:

- w hodowlach płynnych:
 - dyfuzyjny (zmętnienie)
 - w postaci kożuszka/ błonki
 - w postaci osadu
- w hodowlach na pożywkach stałych(kolonie):
 - wgłębne
 - powierzchniowe
 - gładkie
 - szorstki
 - śluzowe
 - ruchliwe

PARAMETRY HODOWLI:

- ✓ **STAŁA SZYBKOŚĆ PODZIAŁU**- liczba podziałów na godzinę
- ✓ **CZAS GENERACJI**- czas od podziału do podziału(zależy od warunków)
- ✓ **SWOISTA SZYBKOŚĆ WZROSTU**- częstość podziału na jednostkę czasu($\mu=1/g$)
- ✓ **CAŁKOWITY PRZYROST DROBNOUSTROJÓW**- całkowity przyrost- stosunek ilości komórek wprowadzonych do największej ilości.

LICZENIE BAKTERII:

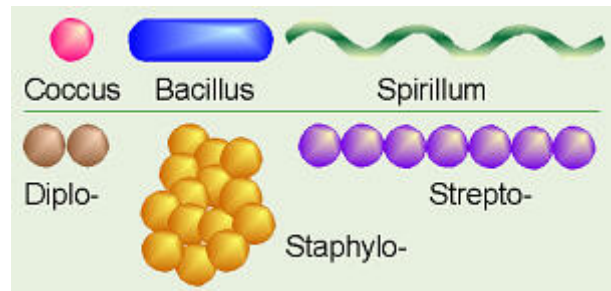
- komora Thoma- liczba bakterii min 10^6
- filtry membranowe- mniejsza niż wyżej ilość bakterii

- metoda rozcieńczeń
- nefelometryczna- fotokomórka odczytująca ilość kolonii
- absorbancja(zmętnienie w czasie)
- licznik Coultera- określenie całkowitej liczby komórek-wykorzystuje przewodnictwo elektrolitu

KSZTAŁTY BAKTERII:

ZIARNIAKI (COCCUS):

- dwójki (diplo)
- pakiety
 - czworaki
 - sześciiany np *Micrococcus luteus*
- łańcuszki (strepto) *Streptococcus* sp.
- gronkowce(staphylo) *Staphylococcus* sp.
 - podziały: prostopadłe, równoległe, oba

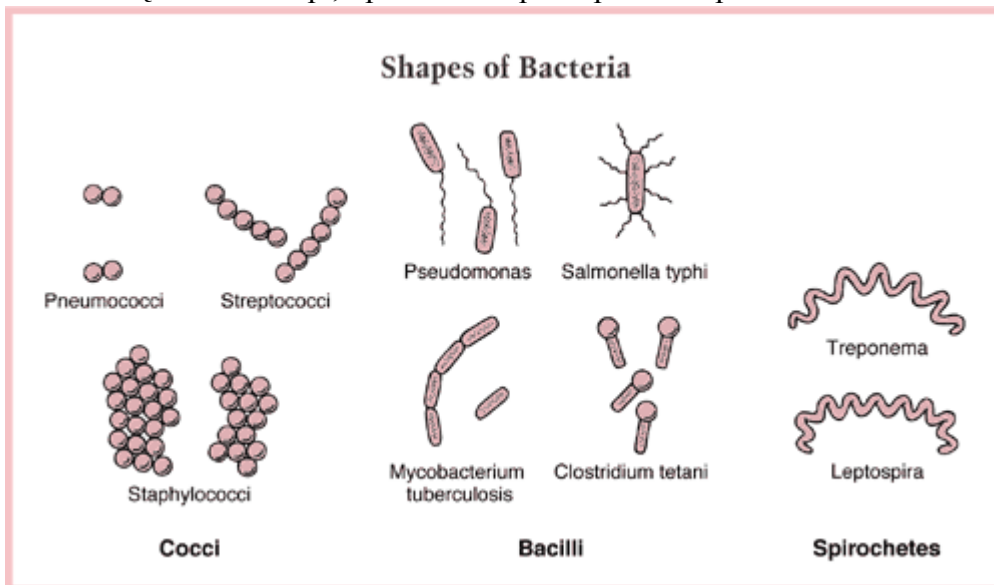


CYLINDRY:

- pałeczki *Escherichia coli*
- laseczki
 - tlenowe *Bacillus* sp.
 - Beztlenowe *Clostridium* sp.

SKRĘCONY CYLINDER:

- przecinkowce *Vibrio*, *Enterobacteriaceae*, *Selenomonas sputigena*- w jamie ustnej
- śrubowce *Spirillum* sp., *Aquaspirillum* sp.
- Krętki *Borrelia* sp., *Spirochaeta* sp. *Treponema* sp.



SPOSOBY NA ZOBACZENIE BAKTERII POD MIKROSKOPEM:

- fluorescencja
- kontrast fazowy
- ciemne pole
- SEM

METODY BARWIENIA:

- pozytywne- bakterie kolorowe, reszta nie
- negatywne- reszta kolorowa, bakterie nie(np. Uwidacznianie otoczek)
- mieszane- wszystko kolorowe

Zwykle stosuje się barwniki zasadowe(błękit metylowy, fuksyna zasadowa, fiolet krystaliczny,

safranina, zieleń malachitowa) gdyż bakterie zawierają wiele kwasów nukleinowych i struktur powierzchniowo bogatych w grupy kwasowe, które nie barwią się barwnikami kwaśnymi (barwienie kwaśnymi tylko na gorąco!)

BARWIENIE:

- proste
- złożone

BEJCE- zaprawy wchodzące do komórki i wiążące się z barwnikiem wzmacniając jego działanie (wyjątek RZĘSKA- bejca opłaszczca rzęskę i dopiero do niej przyłącza się barwnik). Np. Płyn Lugola, tanina.

ODBARWIACZE: alkohol etylowy, aceton, stężony HCL, H₂SO₄

Sposób barwienia bakterii metodą Grama (Christian Gram, 1884) wynika z budowy ściany komórkowej. Jedne bakterie wybarwiają się na kolor fioletowy (zwane są gramdodatnimi), natomiast zaś inne na różowo (gramujemne). W czasie barwienia we wnętrzu komórki tworzone są nierozpuszczalne kompleksy fioletu krystalicznego z KJ. Kompleksy te można łatwo wyekstrahować etanolem z wnętrza bakterii gramujemnych, gdyż mają one cienką warstwę mureiny, a etanol niszczy ich błonę zewnętrzną. Komórki odbarwiają się (a następnie zostają dobarwione safraniną na różowo). Gruba warstwa mureiny bakterii gramdodatnich, nie pozwala na wypłukanie tych kompleksów. Nie budowa chemiczna ściany jest odpowiedzialna za sposób barwienia metodą Grama, lecz jej fizyczna struktura. Komórki drożdży (ściany zbudowane są z grubej warstwy chityny) barwią się gramdodatnio

ETAPY BARWIENIA METODĄ GRAMMA:

Etap	Barwnik	GRAM +	GRAM-	UWAGI
1	fiolet	fiolet	fiolet	
2	Płyn Lugola	fiolet	fiolet	J/KJ- jod wchodzi w miejsce chloru z fioletu->tworzą się duże fioletowe kompleksy
3	etanol	fiolet	bezbarwny	1 warstwa mureiny i błona komórkowa zostają zniszczone
4	safranina	fiolet	różowy	

Test α -Alapeptydazowy- bakterie gram – mają enzym rozkładający go (po tym można poznać grubość i warstwy mureiny).

BAKTERIE:

- ✓ *Escherichia coli*- Pałeczka gramujemna należąca do rodziny *Enterobacteriaceae* (pałeczki jelitowe). Względny beztlenowiec. Chemoorganotrof, prototrof. Temp. optymalna 37°C. Występuje w jelicie grubym człowieka i licznych zwierząt Szeroko rozpowszechniona w środowisku życia człowieka. Jest to bakteria najlepiej poznana pod względem fizjologicznym i genetycznym.
- ✓ *Proteus vulgaris*-[-]-laseczka
- ✓ *Pseudomonas fluorescens*- Zaliczają się do niej biegunowo orzęsione, Gram-ujemne pałeczki należące często do skrajnie różniących się pod względem fizjologicznym rodzajów. Wytwarzają fluoresceinę powodującą, świecenie w promieniach UV.
- ✓ *Bacillus subtilis*-[+]- (jak niżej)
- ✓ *Bacillus megaterium*- Tworzy łańcuszki. Endospory są położone centralnie i nie powodują rozděcia komórki macierzystej. Temp. optymalna 30°C. Tlenowce lub względne tlenowce.
- ✓ *Micrococcus luteus*[+], sferyczny obligatoryjny tlenowiec
- ✓ *Staphylococcus epidermitis*[+]

- ✓ *Enterococcus faecalis*[+]
- ✓ *Listeria* sp, *Lactobacillus* sp.- gram+, tlenowiec, nie tworzy endospor
- ✓ Pałeczki i ziarniaki gram+ tworzące endospory
 - tlenowe- *Bacillus*, *Sporolactobacillus*
 - beztlenowe- *Clostridium*
- ✓ Gram- pałeczki i ziarniaki tlenowe: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*
- ✓ Gram- tlenowy chemolitotrof- *Thiobacillus*
- ✓ gram – pałeczki względnie beztlenowe- *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Salmonella*

BUDOWA KOMÓRKI BAKTERYJNEJ:

- Komórki bakteryjne są zwykle bardzo małe i charakteryzują się małą gęstością - słabo załamują i pochłaniają światło, dlatego też trudno jest odróżnić je od podłoża. Przed oglądaniem w mikroskopie, najczęściej więc wybarwia się je stosując różne metody w zależności od rodzaju bakterii oraz celu, jaki chcemy osiągnąć. W **barwieniu prostym** stosujemy tylko jeden barwnik, natomiast w **złożonym** co najmniej dwa barwniki, a często również różne zaprawy (bejce) i **odbarwiacze**. Przykładem barwienia złożonego jest **metoda Grama**, która jest bardzo ważna w klasyfikacji i identyfikacji bakterii. Gdy bakterie wybarwia się pewnymi barwnikami zasadowymi (np. fioletem goryczkowym), a następnie potraktuje kolejno płynem Lugola i etanolem, to komórki niektórych gatunków zatrzymują barwnik (bakterie gramdodatnie) innych zaś ulegają odbarwieniu (bakterie gramujemne). Jeśli preparat dobarwi się następnie barwnikiem kontrastowym (np. safraniną) to bakterie gramujemne będą różowe, natomiast gramdodatnie pozostaną fioletowe. W metodzie Grama sposób wybarwienia komórek bakteryjnych zależy od budowy ściany komórkowej.
- Oprócz **barwienia pozytywnego**, w którym oglądamy w/wybarwione bakterie na bezbarwnym tle, istnieje też **barwienie negatywne**, w którym wybarwia się tło (czyli szkiełko podstawowe) np., za pomocą tuszu bądź nigrozyny. W *ten* sposób uwidacznia się otoczki bakteryjne, które trudno się barwią.
- Podstawowe kształty bakterii to kula (**ziarniaki**), cylinder (**pałeczki** i **laseczki**) i skręcony cylinder (**przecinkowce**, **kretki** i **śrubowce**) Istnieją też bakterie o kształtach nieregularnych, a w latach osiemdziesiątych odkryto bakterie „kwadratowe" i „trójkątne"
- Bakterie mogą tworzyć charakterystyczne układy komórek, a więc **dwoinki**, **pakiety**, **grona** (takie układy tworzą ziarniaki) a także **łańcuszki** (ziarniaki i laseczki).