

OPĆA MIKROBIOLOGIJA

UVOD

Mikrobiologija se bavi proučavanjem najjednostavnijih i najsitnijih živih bića koja se jednom rječju nazivaju mikroorganizmi ili mikrobi.

VELIČINE NEKIH MIKROORGANIZAMA (eritrocit 7.5 mikrometara):

Bacillus anthracis	5 mikrometara
Mycobacterium tuberculosis	2-4 mikrometra
Salmonella	2 mikrometra
riječije	475 nanometara
herpes-virus	130 nanometara
bakteriofag	65-95 nanometara
virus japanskog encefalitisa	13 nanometara

MIKROSKOPIJA

Moć razlučivanja je udaljenost između dvije točke a da se one vide odvojeno. Ljudsko oko ima moć razlučivanja 0.1 mm.

Vrste mikroskopije:

1. svjetlosni mikroskop ima moć razlučivanja 0.2 mikrometra (ukupno povećanje 900 puta) a više ne može jer ga ograničava valna duljina vidljive svjetlosti.
2. mikroskopiranje u tamnom polju: svjetlosna zraka prolazi kroz naročiti kondenzor (ili obični ispred kojeg se stavi disk neprozirnog papira), pa ne prolazi direktno kroz objektiv, već obasjava predmet sa strane pa će vidno polje biti tamno, a predmet svijetao. Omogućuje promatranje neobojenog preparata.
3. fazkontrastna mikroskopija: svjetlosne zrake na putu kroz neki prozračni predmet (npr. stanicu) zaostaje u fazi što daje dojam prostornosti jer se razlika u fazi vidi kao razlika u jačini obojenja. Jasno se vide strukture u živoj stanici.
4. fluorescentna mikroskopija: mikroorganizmi se oblože fluorescentnim antitijelima (poznata antitijela impregnirana nekim fluorokromom) i obasjaju UV lampom. Vide se kao fluorescentna tijela na tamnoj pozadini
5. elektronski mikroskop: koristi se snopom elektrona umjesto svjetlosnim zrakama i magnetnim poljem umjesto lećama. Moć razlučivanja je 1 nanometar pa se njime mogu promatrati i virusi. Uz kontrastno bojenje i sjenčanje platinom dobijemo 3D sliku. Postoji transmisioni (2D) i scanning (3D).
6. autoradiografija: neki element stanice se markira radioaktivnim izotopom i fotografskim filmom se prati kretanje radioaktivnog elementa.

PODJELA MIKROORGANIZAMA

EUKARIOTI

a) ALGAE = protisti sa klorofilom osim modrozelenih

1. chlorophyta = zelene, phaeophyta = smeđe, rhodophyta = crvene
2. euglenophyta = euglene
3. pyrrhophyta = bičaći ili flagelati
4. chrysophyta = zlatnosmeđe alge i dijatomeje

b) PROTOZOA = praživotinje

1. mastigophora = praživotinje sa bičevima
2. rhizopoda = amebe
3. sporozoa u životnom ciklusu imaju stadij mirovanja (spore) i stadij razmnožavanja.
4. ciliata = trepeljtikaši

c) FUNGI = gljive (hitinski stanični zid)

1. fungi perfecti = savršene ili potpune gljive: phycomycetes, ascomycetes, basidiomycetes
2. deuteromycetes = nesavršene gljive ili dermatofiti: blastomycetes=kvasnici, hyphomycetes=plijesni

d) SLUZAVE PLIJESNI (bez staničnog zida - ameboidne)

1. myxomycetes = plazmodijalne sluzave plijesni
2. acrasiomycetes = celularne sluzave plijesni

PROKARIOTI

1. cyanophyta = modrozeleni alge
2. shizomycetes = bakterije

Bakteriologija se bavi bakterijama, mikologija gljivama i plijesnima, virologija virusima, a parazitologija protozoama, crvima i člankonošcima.

PODJELA MIKROBIOLOGIJE

1. medicinska proučava sve mikroorganizme koji su važne za zdravlje čovjeka ili životinja
2. poljoprivredna isto za biljke
3. tehnološka za mikrobe korisne u prehrani i farmaceutskoj industriji.

Mikroorganizmi mogu biti

1. patogeni jer izazivaju bolesti uništavanjem tkiva ili lučenjem otrova
2. uvjetno patogeni - ako ih ima u većem broju, uslijed narušene ravnoteže u tijelu ili ako se nađu na nepredviđenim mjestima (npr. iz crijeva uslijed ozljede ili upale uđu u krv).
3. korisni sudjeluju u metabolizmu (npr. bakterije u crijevu koje stvaraju vitamin K).
4. indiferetni ili saprofitni (mogu biti uvjetno patogeni).

Razvrstani su u redove, porodice, rodove i vrste po izgledu, strukturi DNA, tinktorijelnim svojstvima (kako se boje mikrobiološkim bojama), metabolizmu.

OBLICI BAKTERIJA

a) KUGLASTE (KOKI) su najčešći

1. mikrokoki su pojedninačne
2. diplokoki u parovima, gonokoki znači da su spljošteni između sebe kao zrno kave
3. streptokoki su poredani u duše ili kraže lance
4. stafilokoki su poput grozdova
5. tetrade su poredani po četvero, sarcina po 8, 16, 32
6. diplostreptokoki: cijeli red se dijeli po dužini, nakon podjele se odvajaju.

b) ŠTAPIĆI (BACILI) - kod njih je važna duljina, širina i oblik rubova (odsječeni, zaobljeni, nitasti)

1. palisade: kad su poredani jedan do drugog
2. oblici slova V X Y
3. diplobacili su spojeni na krajevima po 2
4. streptobacili: kad je više njih poredano u lanac
5. kokobacili su između štapića i koka (elipsa)

c) SPIRALNE

1. spirohete imaju puno spiralnih zavoja
2. spirile imaju obično jedan zavoj, najviše do 4
3. vibrioni izgledaju kao zarez
4. trihobakterije su razvučene spirohete

d) MIKSOBAKTERIJE nemaju definiran oblik (sluzave bakterije - nemaju stanični zid)

Polimorfizam je svojstvo bakterije da može imati različite oblike. Pleomorfizam je svojstvo bakterije da može mijenjati oblik tokom života.

Oblici bakterija se mijenjaju ovisno u uvjetima: višak ili manjak hrane, dezinficijensi ili antibiotici, temperatura. Koki povećavaju promjer i raspadnu se, ili dobiju nepravilan oblik kao gruda. Štapići zadebljaju na krajevima ili se mogu izdužiti kao konac.

Djelovanjem lizozima (enzim u suzama) koji uništi staničnu stijenku ili antibiotika koji sprečavaju njegovu sintezu dobijemo nepravilne oblike: protoplaste i sferoplaste.

Protoplasti nemaju ni traga staničnoj stijenci, nastaju iz Gram + bakterija i ne mogu se dijeliti.

Sferoplasti imaju oslabljeni ostatak stanične stijenke, nastaju iz Gram - bakterija. Mijenjaju oblik ovisno o osmotskom tlaku. Mogu se dijeliti ako nema inhibitora sinteze stanične stijenke i tada se dijele na dvije stanice nepravilnog oblika.

GRAĐA BAKTERIJA

1. KAPSULA I/ILI SLUZAVA OVOJNICA.

Kapsulu imaju uglavnom bacili, neki streptokoki, rod *Klebsiella* i drugi.

Neki je stvaraju uvijek, neki tek kad uđu u organizam zbog zaštite od vanjskih utjecaja i imune obrane. Različite vrste imaju različit sastav kapsule. Većina bakterija je pravi od polisaharida u obliku mreže: celuloza, dekstran+organske kiseline, aminošećeri, monosaharidi. Rod *Bacillus* je pravi od D-glutaminske kiseline koja daje sluzavost.

Kapsula ima svoje antigene (K-antigeni), što omogućuje spajanje sa homolognim antitijelom što izaziva bubrenje kapsule pa ona postane nekoliko puta deblja i može se uočiti pod mikroskopom (tuš preparat, faznokontrastni mikroskop). To se zove mikroprecipitacija ili Neufeldov fenomen i može poslužiti za identifikaciju bakterija.

Sluzava ovojnica ima sličan sastav samo što se lakše topi u vodi. Mogu je imati i bakterije s kapsulom. Uvijek je izvan kapsule.

2. STANIČNA STIJENKA

Bez nje bakterija živi vrlo kratko. Stijenka je tanka, elastična ali i čvrsta. Daje oblik bakteriji, štiti ju od fizičkih oštećenja, osigurava turgor na 5-20 atmosferskih tlakova, može zadržati neke tvari u stanici koje prođu kroz membranu, i važna je za diobu stanice. Stvara i obnavlja kapsulu, ili neke tvari u unutrašnjosti stanice. Sve bakterije imaju peptoglikan zvan murein. Murein je polimer od nerazgranatih lanaca N-acetil-glikoziamina i N-acetil-muraminske kiseline povezanih glikozidnim vezama poredanih naizmjenično. Na svaku molekulu N-acetil-muraminske kiseline vezan je tetrapeptid od L-alanina, D-glutamina, m-diaminopimelinske kiseline i D-lizina ili D-alanina koji je povezan aminskim vezama sa drugim mureinskim lancem. Ta struktura daje čvrstoću i naziva se mureinski sakulus. U njemu su ugrađeni drugi spojevi, karakteristični za pojedinu bakteriju.

Gram + imaju teikočnu kiselinu (lanac ugljikohidrata i aminokiselina varijabilnog sastava) vezanu na murein. Boje se hvataju na tu kiselinu. Ona je ujedno i površinski antigen.

Gram - imaju puno tanju stijenku složenije građe. Sastoji se od dvije membrane: unutarnje i vanjske.

Vanjska membrana sastoji se od gornjeg i donjeg listića:

- a) gornji listić (na površini bakterije) građen je od lipopolisaharida (LPS) sa dvije komponente, a to su lipid A (složeni ester ugljikohidrata i masnih kiselina, uz pirofosfatne veze) i druge komponente (lanac šećera i glikofosfata) povezane za njega. lipid A je endotoksin jer je vezan za bakteriju i otpušta se u okoliš kad se razori sama bakterije.
- b) donji listić je građen od fosfolipida.

Vanjska membrana ima funkciju sprečavanja prometa velikih molekula u ili iz stanice (enzimi ne smiju van, a antibiotici ne smiju unutra).

Unutrašnja membrana građena je od mureina.

Unutrašnja i vanjska membrana povezane su stupićastim proteinskim formacijama.

Stanična stijenka je nosilac somatskih ili O-antigena (daju serološku karakterizaciju).

Neke bakterije imaju i voštanu ovojnica (acido-alkohol-rezistentne).

3. STANIČNA MEMBRANA

Nalazi se odmah ispod staničnog zida.

Vrlo je tanka, građena od fosfolipida i proteina. Ima uvrnuća koja se zovu mezosomi, koji su preteče mitohondrija. Osim toga stvaraju pregrade kod diobe i stvaraju izvanstanične enzime. Sudjeluju kod dupliranja DNA. Stanična membrana je polupropusna pa ima sve ono što ste učili iz dinamičke i fiziologije, ne da mi se sad to pisat.

4. ORGANI ZA KRETANJE I PILI (FIMBRIJE)

Ne kreću se sve bakterije. One koje se kreću, to rade da bi našle najbolje mjesto za život i razmnožavanje i da lakše prodiru kroz organizam nesretnog domaćina.

1. Bičevi ili flagele su najčešći organi za pokretanje. Obično ih imaju štapićaste bakterije. To su končaste tvorevine duljine 12-25 mikrometara. Može ih biti jedna (monotriha) ili više (politriha). Po razmještanju mogu biti polarne (na jednom kraju), bipolarne (na oba kraja) ili peritrihijalne (po cijeloj površini).

Nastaju u loptastim tjelešcima, koja se zovu bazalne granule, a nalaze se u staničnoj stijenci.

Običnim mikroskopom se ne vide ni obojane jer su vrlo tanke, oko desetak nm.

Građene su od proteina flagelina. To je kontraktilni protein koji nema ni triptofana ni prolina. Uz to ima i nešto lipida, šećera i nukleinskih kiselina. Sadrži flagelarni H-antigen. Na duljinu bičeva utječu mnogi faktori. Dobro se razvijaju u tekućim hranilištima i površini mekih podloga a na tvrdim i u prisutnosti Cr^{3+} i fenola slabije. Mogu i potpuno nestati, pa nestaje i H-antigen. To je ipak samo privremena promjena. Broj i razmještaj bičeva je tipičan za neku vrstu.

2. Aksijalni filamenti su organi za kretanje kod spiralnih bakterija. Nalaze se u stanici koja je oko njih spiralno obavijena. Polaze s oba pola stanice i sreću se u sredini stanice gdje su ponekad spojeni. Kemijski slični bičevima. Pomoću njih se bakterija kreće rotacijom oko svoje zamišljene osi.
3. Fimbrije ili pili su končaste tvorevine na površini nekih štapićastih bakterija koji pomažu bakteriji da se prihvati na stanicu domaćina. Građeni su od proteina pilina. Tanje su i kraće od bičeva i ravne su, a vide se samo pomoću elektronskog mikroskopa. Nema ih kod Gram + bakterija a ima ih kod svih enterobakterija. Bakterije koje ih imaju izazivaju hemolizu. Neke enterobakterije imaju i seksualne pile pomoću kojih izmjenjuju plazmide. O tome više kod razmnožavanja. Iako su građene od proteina, otporne su na pepsin, tripsin, kiseline i lužine. Pile se mogu izgubiti i opet stvoriti. Nositelji su fimbrijalnog F-antigena.

5. CITOPLAZMA I STANIČNA TJELEŠKA

Tekućina unutar stanične membrane u kojoj se nalaze mikro i makromolekule. Mikromolekule kao i kod svake druge stanice (voda, trigliceridi, glukoza, aminokiseline...)

Makromolekule:

1. nemaju pravu jezgru već nakupinu DNA i nukleoproteina nazvanu kromatin ili nukleoid.
2. plazmidi su kružna DNA neovisna o glavnoj DNA i nije neophodna za život bakterije. Nose dodatna svojstva: otpornost na antibiotike, nove enzime i druga svojstva. Puno manji su od glavne DNA.
3. ribosomi su kuglasta tjelešca na kojima se sintetiziraju proteini, rijetko se nalaze pojedinačno, češće u lancima koji se zovu poliribosomi.
4. citoplazmatske inkluzije su zrnca različitih veličina i sastava. Lipidi, proteini, ugljikohidrati, kristalići, sumporna zrnca, beta-maslačna kiselina, vakuole...

SPORE KOD BAKTERIJA

Neke štapićaste bakterije imaju sposobnost stvaranja otpornog oblika nazvanog spora i takve se bakterije nazivaju sporogene bakterije. Spora je okruglo ili ovalno tjelešce koje može biti smješteno bilo gdje u citoplazmi i to su endospore. Smještaj i veličina spora su specifični za vrstu pa to može služiti za identifikaciju. Spore teško primaju boje, pa se na obojenom preparatu vide kao neobojena mjesta. Svaka bakterija pravi samo jednu sporu.

Egzospore prave samo neke bakterije i služe za razmnožavanje.

Struktura spora je određena pod elektronskim mikroskopom. Unutra prema van:

1. srž spore sadrži nukleoid, ribosome, puno enzima, puno Ca-dipikolinata (stabilizira DNA) i uglavnom se može reći da je to zgusnuta citoplazma.
2. stanična stijenka okružuje srž
3. debela kora od peptoglikana (cortex)
4. unutarnji zid od keratina
5. vanjski zid (egzosporium)

U sporama su nađeni antigeni kojih nema u vegetativnom obliku, koji su specifični za pojedine vrste. Spore su otporne na isušivanje, visoke temperature, dezinficijense, a to je zbog debele kore, manjeg udjela vode, smanjenog metabolizma, visoka koncentracija Ca-dipikolinata.

SPORULACIJA

Bakterija pravi sporu u nepovoljnim uvjetima za život iako su nađene i kod povoljnih uvjeta. Nepovoljni uvjeti su temperatura, nepovoljni pH, prisustvo ili odsustvo kisika (ovisi da li aerobna ili ne), manjak hrane, prisutnost nekih otrovnih tvari za bakteriju.

Kad se bakterija odluči praviti sporu, poveća se, udvostruči DNA ali se ne podijeli. Prva vidljiva faza je zgušnjavanje DNA i pomicanje prema jednom kraju bakterije, kamo idu i ostala citoplazmatska tjelešca. Zatim se membrana uvrne tako da zaokruži taj dio zgusnute citoplazme i napravi dvoslojnu membranu. Unutar te dvostruke membrane je srž spore. Ta tvorba je predspora. Od te dvostruke membrane nastaju ostale opne. Tijelo bakterije u kojoj se nalazi spora naziva se sporangij.

GERMINACIJA

Kad spora dođe u povoljne uvjete života prelazi nazad u vegetativni oblik. To se zove klijanje ili germinacija. Osim povoljnih uvjeta, mora postojati neki faktor aktivacije: povišena temperatura, određeni pH, neki spojevi. Bez bez tog faktora spore neće proklijati ni na obogaćenim podlogama.

Prvi znak klijanja je da spora izgubi refraktilnost (lom svjetlosti), nabubri i počne primati obične boje kojima se inače spora ne može obojati. Povećani pritisak u spori uzrokuje pucanje zida i sadržaj spore se vraća u stare granice.

BOJANJE

Bakterije se boje da bi se pojedini dijelovi bolje vidjeli (živjela logika). Ponekad je to i jedini način da bi se bakterije identificirale. Pojedini dijelovi bakterije ne primaju sve boje na isti način.

Prije su se koristile samo prirodne boje (karmin, indigo, tanin), a danas ih zamjenjuju anilinske boje koje se dobivaju iz katrana kamenog ugljena. Neke su derivati anilina, ali ne sve kako bi ime sugeriralo.

Boje su obično soli pa otopljene imaju 2 iona. Jedan je nosilac boje ili boja kao takva i naziva se kromfor, a drugi dio omogućava spajanje boje na cilj bojanja i naziva se auksokrom. Boje mogu biti:

1. Kisele su one kod koji je kromfor anion: Na-eozinat, kiseli fuksin, vezuvin. Najjače boje citoplazmu.
2. Lužnate kod kojih je kromfor kation: metilensko modrilo, kristal ljubičasto, lužnati fuksin, tionin.
Najjače boje jezgru i druge nukleinske kiseline. Ove boje se intenzivnije hvataju na bakteriju jer bakterija ima puno nukleinskih kiselina.

Jednostavna bojenja su kad se koristi samo jedna boja, najčešće Loefflerova lužnata otopina metilenskog modrila.

Puno su češća i korisnija diferencijalna bojenja:

1. Bojenje po Gramu je toliko često i rašireno da se sve bakterije trpaju u G +,G- ili G neodređene.
Prvo se bakterije boje nekom plavo-ljubičasto lužnatom bojom (kristal ljubičasto). Sve bakterije u preparatu će primiti tu boju (osim nekih iznimaka). Nakon se dodaje I-KI po Lugolu (nastaje kompleks jod-boja) i slijedi odbojavanje 95% etanolom. Neke bakterije će otpustiti plavu boju. Nakon toga se dodaje neka crvena (karbol fuksin, safranin, neutralno crvenilo) i one koje se otpustile plavu će sada primiti crvenu.

G- bakterije u svom staničnom zidu imaju lipidne spojeve, koje se kod odbojavanja etanolom otapaju pa plava boja izlazi. Zato su G+ plave a G- crvene.

G+ su osjetljivije na peniciline, sulfonamide, deterdžente, fenole i lužnate boje.

G- su osjetljivije na telurove soli, oksidanse, spojeve klora, i proteolitične enzime.

G+ imaju manje enzima pa su veći izbirljivci hrane.

2. Bojenje acido-alkohol-rezistentnih bakterija (AAR). One imaju ovojnici od voska i fosfolipida koja ne prima boju dok se ne zagrije i otopi, a kad primi boju više ju ne otpušta. Zato se takve bakterije boje zagrijanom crvenom (karbol fuksinom). Zatim se preparat ispire kiselim etanolom, AAR bakterije ne otpuštaju boju, ostale da. Zatim se preparat boji nekom plavom, ostale primaju tu plavu. AAR su crvene, ostale plave. To se zove Ziehl-Neelsonova metoda.
3. Spore se boje malahitnim zelenilom. One će primiti boju, ostalo neće. Preparat se odbojava alkoholom i vodom. Daje se neka crvena (safranin) i onda su spore zelene a ostalo crveno. To je bojanje po Fultonu.
4. Bičevi se bojaju nestabilnom otopinom tartarata. (ali ionako se ne vide svjetlosnim mikroskopom pa čemu to)
5. Kapsule se boje tušem ili otopinom Giemse (kaj je to?).

METABOLIZAM

Manji dio bakterija proizvodi energiju sam, ostali razgradnjom hrane iz okoline (lopovi i lijenčine).

Autotrofi:

1. fototrofi (energiju dobivaju fotosintezom)
2. kemolitotrofi dobivaju energiju oksidacijom anorganskih spojeva: H₂, CO₂, NH₃, NO₂, NO₃, H₂S i drugi spojevi sumpora, jednostavni spojevi Fe.

Heterotrofi su kemoorganotrofi (energija razgradnjom organskih spojeva):

1. saprofiti razgrađuju nežive ili inertne organske tvari koje su otpadni ili razgradni produkti drugih živih bića. Truljenje i gnjiljenje je dio kruženja elemenata u prirodi neophodnog za održanje ukupnog života.
2. paraziti za preživljavanje iskorištavaju druga živa bića:
 - a) obligatni (obvezatni, striktni) sve moraju dobivati od živih stanica.
 - b) fakultativni (uvjetni) mogu živjeti i od neživih izvora ali bolje uspijevaju na živima.
 - c) patogeni izazivaju bolesti. Obavezni uvijek izazivaju bolest, a oportunisti samo u nekim uvjetima: oslabljen imunitet, kada se nađu na nepredviđenom mjestu, nakon narušene ravnoteže upotrebom antibiotika....

Katabolizam = sve reakcije razgradnje koje dovode do stvaranja energije u stanicima.

Anabolizam = sve reakcije sinteze novih spojeva uz potrošnju energije.

Katabolizam + anabolizam = metabolizam.

PREHRANA BAKTERIJA

Hrana u bakteriju ulazi pasivnim ili aktivnim transportom (fiziologija).

Glukoza je bakteriji najbolja hrana, ali ne i jedina. Služi za energiju i sintezu drugih spojeva.

Osim glukoze, bakterija treba i druge spojeve koje ne može sama stvarati (faktori rasta):

1. Bakterijski vitamini koji su uglavnom isti kao i ljudski: nikotinska kiselina i amidi, pantotenska kiselina, paraaminobezojeva kiselina, tiamin, biotin, riboflavin, pirdoksin, folna kiselina.
2. Spojevi koji se s malim ili nikakvim izmjenama ugrađuju i bakteriju: purini, pirimidini, esencijalne aminokiseline. Ponekad je moguće natjerati bakteriju da živi bez neke esencijalne aminokiseline ako se presađuje na hranilišta sa sve manje te esencijalne kiseline.

Pojedine vrste imaju specifične potrebe: Streptococcus pneumoniae treba kolin, Mycobacterium tuberculosis asparagin, hemolitički streptokoki glutamin, Brucellae CO₂.

Za sintezu bakterija treba razne elemente koje primaju iz okoline:

1. ugljik iz CO₂, alkohola, aldehida, ketona, organskih kiselina i njihovih soli, šećera, masti i aminokiselina
2. dušik fiksacijom iz atmosfere, nitrita, nitrata, amonijaka, aminokiselina, purina, pirimidina
3. sumpor iz sulfida, sulfata, tiosulfata, cisteina, metionina
4. fosfor iz anorganskih fosfata, ali može i organski ako je frka (NAD, NADP, ATP, flavini)
5. metali otopljeni u solima su aktivatori enzima
6. voda (znaš li funkcije vode?)

ENZIMI

Svaka vrsta ima karakteristične enzime koji se prenose s generacije na generaciju i kodirani su genomom u glavnoj DNA. To su konstitutivni enzimi.

Osim njih imamo i gene za sintezu enzima koje ta vrsta nema stalno nego samo kad dođe u dodir sa supstratom za koji nema enzim. To su inducirani ili adaptivni enzimi a u normalnim okolnostima su potisnuti represorom (vidi dinamičku).

DISANJE

Nećemo sad o reakcijama disanja. U svakom slučaju važan je krajnji primatelj elektrona. Uvijek je to vanjska anorganska tvar. Ako je to kisik onda su bakterije aerobne. Ako nešto drugo onda su anaerobne. Ali nije sve tako jednostavno:

1. Obavezni aerobi ne mogu bez kisika.
2. Obavezni anaerobi - kod njih kisik reagira sa flavinima i pretvara se u peroksid i superoksid koji su otrovni.
3. Fakultativni aerobi ili anaerobi mogu živjeti i sa i bez kisika ali im jedno od toga bolje.
4. Aero-tolerantni anaerobi (samo ime ti kaže).
5. Mikroaerofilni su oni kojima treba mala koncentracija kisika (oko 5%).

ŠTO SVE UTJEČE NA RAST I RAZMNOŽAVANJE

1. Hrana. Pa dobro, valjda znaš čemu služi hrana i da ne valja ako je ima premalo. Ali ne valja i ako je ima previše jer inhibira rast i razmnožavanje. Za objašnjenje ovoga pogledati na osmotski tlak.
2. Voda je idealno disperzno sredstvo za hranu, služi kao izvor H⁺ i OH⁻ iona, za održavanje turgora i općenito fizikalno-kemijsko stanje citoplazme (hidrofilne i hidrofobne molekule).
3. Kisik. Pogledaj pod disanje.
4. Temperatura je važna zbog enzima. Bakterije su se prilagodile raznim sredinama pa imamo:
 - a) psihofilne ili ljubitelje hladnoće koji vole 15-20, max 30, min 0
 - b) mezofilne ili one između koji vole 30-37, min 10, max 45. Tu spadaju patogene jer je to temperatura ljudskog tijela a ni ostali toplokrvni nisu daleko.
 - c) termofilni ili ljubitelji vrućine vole 60-65, min 40, max 80.Na nižim ili višim temperaturama metabolizam se usporava, još višim ili nižim prestaje rast i razmnožavanje, a još ... ubija.
5. pH povezan sa osmotskim tlakom i površinskom napetošću. Za većinu bakterija je 6-8 optimalno,

ekstremi su rijetki, a većina gljivice ne voli više od 5. Budući metabolizam bakterija mijenja lokalni pH, važno je hranjivim podlogama dodati pufer. Alkalni pH ometa saharolitičke bakterije, a kiseli proteolitičke i zato se zakiseljavanjem hrane sprečava kvarenje.

6. Osmotski tlak. Ako je preveliki voda izlazi van, pa dolazi do smežuravanja stanici a to se zove plazmoliza. Do jedne razine plazmoliza je povratna ali više od toga ubija bakteriju. Isto tako, bakterija ne može upijati hranjive tvari pa umire. Zato se često za konzerviranje voća, džemova i pekmeza koristi kuhinjski šećer iako je idealna hrana za bakterije jer jako povisuje osmotski tlak. Preniski osmotski tlak uzorkuje ulaženje vode u bakteriju i time razrijeđuje hranjive tvari te onemogućuje izlučivanje štetnih produkta metabolizma. Zato je čista voda loš okoliš za bakterije. Bubrenje stanice se zove plazmoptiza.
7. Površinska napetost. Crijevne bakterije su se navikle na nisku površinsku napetost pa se vodenim podlogama dodaje žuč jer voda ima veliku površinsku napetost. Neke bakterije vole visoku površinsku napetost.
8. Koncentracija CO₂. Nijedna bakterija ne može živjeti bez ovog plina. Litotrofne trebaju mnogo više od organotrofnih jer je to njima jedini izvor ugljika ali neke organotrofne vrste isto trebaju puno CO₂ (Brucella, Neisseria). Naročito velike količine potrebne su kad se bakteriju nađu u novoj sredini. Prevelike koncentracije mogu ometati i zaustaviti razmnožavanje.
9. Otrovnosti. Mogu biti neke izvane (antibiotici, dezinficijensi) i štetni produkti metabolizma koji u malim količinama ne smetaju ali polako dosegnu otrovne koncentracije pa mogu prekinuti razmnožavanje.
10. Broj bakterija u novoj sredini. što ih je više, veća je mogućnost da će se prilagoditi i početi razmnožavanje (stvaraju dovoljno CO₂).

RAZMNOŽAVANJE

Bakterija raste i skuplja mikro i makromolekule. Kad skupi dovoljno, onda se ide razmnožiti. Ima više načina:

1. Cijepanje je najčešći. Stanica se poveća, genom se podijeli i odvoji na krajeve, citoplazma se počne uvlačiti i stvara se pregrada slično kao kad stvaranja spore samo se sada citoplazma sa tjelešcima ravnomjerno podijeli. Iz te pregrade će nastati stijenka i imamo 2 bakterije.
2. Ponekad se dijele preko L-oblika. Jako se poveća i poprimi oblik kugle koja rasprši se na puno malih djelića od kojih nastaju bakterije. Ovako se razmnožavaju mikoplazme, a u nenormalnim uvjetima i rodovi Proteus, Escherichia, Streptobacillus.
3. Rod Nocardia se izduži, nastaju tanki dugački filament (kao konac), koji se raspadne u štapičaste i loptaste bakterije.
4. Neke bakterije "pupaju". Na stanici nastane pup iz kojeg se odvoji posebna bakterija.
5. Rod Streptomyces pravi egzospore iz koje nastaje nova bakterija.
6. Grananje. To rade rodovi Mycobacterium, Corynebacterium, neke štapičaste i one koje u povoljnim uvjetima pupaju, ali u nepovoljnim uvjetima ovako: štapičasta bakterija se na jednom ili oba kraja izduži i to se izduženje račva na 2 kraka u koje idu novostvorene DNA i ostalo što će činiti novu bakteriju. Dakle, stanica izgleda kao jednostruki ili dvostruki Y. Jedna "grana" od tog Y otpadne od ostatka i od toga se razvije nova bakterija.

BRZINA I FAZE RAZMNOŽAVANJA

Vrijeme generacije je vrijeme potrebno da se jedna stanica podijeli u dvije. Na 37 stupnjeva se E.coli podijeli se za 15 do 20 minuta, Treponema pallidum za 2 minute a Mycobacterium tuberculosis za 13 do 15 sati. Zato većina bakterija napravi koloniju za 24 sata a M. tuberculosis više tjedana.

Formula za računanje vremena generacije:
$$v. g = \frac{\log N - \log N_0}{\dots}$$

No je broj početnih bakterija
N broj bakterija nakon određenog vremena

1. Faza pritajenosti ili adaptacije. Bakterije se prilagođavaju na novu sredinu, ne razmnožavaju se, a neke uginu. Naziva se i lag faza.
2. Faza eksponencijalnog rasta. Prilagodile su se i razmnožavaju se ko blesave. Ako je na podlozi, stvara se kolonija, ako u organizmu onda bolest. Zove se log-faza.
3. Stacionarna faza. Prvo počine opadati razmnožavanje, i polako se broj umrlih i novostvorenih bakterija izjednači. Stacionarna faza.
4. Odumiranje. Umiru u sve većem broju, eksponencijalno.

SIMBIOZA

Simbiozom se naziva bilo kakva povezanost živih bića, bilo korisna, bilo štetna:

1. Neutralizam je simbioza pri kojoj ne postoji nikakva interakcija između dva bića koja žive zajedno. To je teško zamislivo a još teže provedivo.
2. Mutualizam (sinergizam) je simbioza gdje oba organizma imaju korist. **TREBA NAĆI PRIMJER!!!!!!**
3. Komenzalizam je simbioza kad jedan organizam ima korist od druge a druga nema štetu ili korist. *Staphylococcus aureus* izlučuje tzv. V-faktor koji stimulira razvoj *Haemophilus influenzae*. Taj se fenomen naziva satelitizam.
4. Antagonizam je kad ne mogu živjeti zajedno obično zato jer jedan organizam luči neku tvar koja ubija drugi organizam. *E. coli* stvara kiselinu koja inhibira *Shigella dysenteriae*. Gljivice luče antibiotike da bi se obranile od bakterija.
5. Kompeticija nastaje kad se dva različita organizma istih potreba međusobno natječu. Pobjedit će onaj koji se brže i bolje adaptira na uvjete sredine. *E. coli* brže fermentira šećer od *Salmonelle* pa poslije izvjesnog vremena u kulturi neće više biti *Salmonelle*.
6. Parazitizam je interakcija u kojoj jedan organizam živi na račun drugog (npr. bakteriofag). Čak postoji jedna bakterija koja je parazit na drugim bakterijama. Nevjerojatno ali istinito.
7. Predatorstvo je kad veći i jači jede manjeg i slabijeg. *Entamoeba histolytica* jede bakterije.

RASPROSTRANJENOST MIKROORGANIZAMA

Ima ih posvuda u prirodi - to se kaže ubikvitarni:

1. Zemlja. Bakterije i gljivice od kojih većina ne uzrokuje bolest, ali ima i nekih vrlo opakih mikroba: *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, spore *Bacillus anthracis*, ličinke i jajašca parazita.
2. Voda: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, vibrioni, protozoe, spirohete, *Clostridium*. Čista voda je loša sredina za mikrobe zbog osmotskog tlaka i nedostatka hrane. Otpadne i prljave vode imaju *Salmonelle*, *Shigele*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, ciste *Entamoebae histolytica*, viruse polimijelitisa i hepatitisa.
3. Zrak je nepogodna sredina za mikrobe, pa mogu kratko živjeti. Pogodniji su zatvoreni prostori zbog prašine: streptokoki, stafilokoki, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, virusi polimijelitisa, kapljične infekcije. Mikroorganizmi sa ljudi u zrak dospijevaju ljuštenjem kože, sa sasušenog gnoja rana, a najviše sekretima dišnog trakta. Flueggeove kapljice iz zaraženog dišnog trakta padaju na predmete i tlo, zalijepe na prašinu i osuše, a zatim tu prašinu udahne neki zdravi pehist.
4. Biljke, životinje, hrana. Pogotovo gljivice i plijesni, ali i bakterije, npr. *Salmonelle*. Osobito su ugroženi mlijeko, meso, jaja. *Clostridium botulinum* je prije bio strah i trepet konzervi.

MIKROFLORA LJUDSKOG TIJELA

Čovjek nije podesna sredina za život i razmnožavanje većine mikroorganizama. Većina ih brzo umre dospije li na ili u nas. Ipak, na i u čovjeku žive određene vrste koje su se prilagodile na čovjeka i od njega zavise, a nazivaju se stalnom ili rezidualnom mikroflorom i mikrofaunom. Postoje i oni mikroorganizmi koji čine prolaznu mikrofloru. Broj i vrsta svih ovih mikroorganizama u znatnoj mjeri ovise o klimatskim faktorima, vrsti vode i hrane koju čovjek koristi, osobne higijene i drugih faktora.

1. KOŽA

Epiderma nije pogodna za razvoj mikroba iz više razloga: suha je, ljušti se, ima blago kiseli pH zbog organskih kiselina koje luče lokalni stafilocoki, znoj je visoko osmolaran zbog visokog sadržaja NaCl, a lizozim iz znoja ima direktno antimikrobno djelovanje. Bakterije su na koži smještene na pločastom površinskom epitelu i kraj znojnih i lojnih žlijezda. Najčešće vrste su *Staphylococcus epidermidis* i *Propionibacterium acnes* (iz skupine difteroida). Potonji je vezan uz tipični pubertetski kožni poremećaj zvan prištevi, koji nastaje kada povišena razina spolnih hormona izaziva pojačano lučenje loja koji je idealna hrana za *P. acnes* koji se namnože i izazovu upalni proces. Ostale bakterije mogu se naći na područjima gdje ima dovoljno vlage (dlanovi, skalp, uške, pazusi, genitalno i analno područje), a riječ je o vrlo šarolikoj skupini streptokoka, stafilocoka, bacila, difteroida, a mogu se naći i gljivice (*Candida*, *Trychophyton*, *Epidermophyton*) koje uvijek mogu izazvati razne bolesti.

2. DIŠNI TRAKT

Na sluznici nosa žive uglavnom isti mikrobi kao na drugim dijelovima lica (*S. aureus*, *S. epidermidis*, difteroidi).

U nazofarinksu možemo naći difteroide, nepatogene sojeve *Neisseria*, diplokoka, streptokoka, stafilocoka. Orofarinks udomaćuje *S. aureus*, *S. epidermidis*, difteroide, streptokoke, neke vrste roda *Bacteroides* i *Neisseria*. Donji dijelovi respiratornog trakta nemaju MO budući postoji stalan tijekom sluzi zbog pokretanja cilijarnog epitela, a važna je i fagocitička djelatnost alveolarnih makrofaga.

3. USNA ŠUPLJINA

Usnu šupljinu naseljava velik broj različitih mikroba jer je vrlo pogodna sredina - vlaga, pogodan pH i temperatura, puno hrane.

Neke bakterije sudjeluju u nastanku zubnih plaka (vrste roda *Bacteroides*, neki streptokoki). To su naslage dekstrana i drugih polisaharida na zubnoj caklini, na kojima se koloniziraju bakterije. Plak može dovesti do karijesa, gingivitisa (upale zubnog mesa), parodontoze.

4. PROBAVNI TRAKT

U želucu ima vrlo malo mikroba jer ne mogu preživjeti vrlo kiseli pH (iznimka: *Helicobacter pylori*).

Duodenum također ima malo bakterija zbog inhibitornog djelovanja kiselog želučanog sekreta i žuči (visoka osmolarnost).

U jejunumu ima nešto koka i difteroida, a kako pH postaje sve viši duž ileuma, flora postaje sve sličnija onoj u debelom crijevu.

Debelo crijevo ima najveću populaciju mikroba u tijelu. Iz izmeta je izolirano više od 300 vrsta u brojevima od više stotina milijardi (10^{na}12) po gramu. Riječ je o anaerobnim i fakultativno anaerobnim bakterijama: vrste roda *Bacteroides*, porodice *Enterobacteriaceae*, streptokoki, stafilocoki i brojne druge bakterije, gljivice, virusi, amebe.

5. UROGENITALNI TRAKT

Bubrezi, ureteri i mjehur obično su sterilni uslijed čestog ispiranja i nepovoljnog sastava urina.

Uretra ponekad sadrži manji broj stafilokoka u distalnom dijelu.

Vagina ima složenu mikrofloru koja varira kroz ciklus, ali najvažniji su tzv. Doederleinovi bacili iz roda *Lactobacillus* koji fermentiraju glikogen iz vaginalnog epitela pretvarajući ga u laktat, što rezultira kiselim pH vagine (4.4-4.6). Time je onemogućen razvoj drugih mikroba.

KRVI TKIVA su kod zdravog čovjeka su sterilni. OKO i UHO imaju mikrofloru sličnu koži, uz neke druge vrste.

GENETIKA BAKTERIJA

Genotip je skup svih gena koje određuju nasljedna svojstva.

Fenotip je skup svih morfoloških, fizioloških i ostalih osobina uvjetovan genotipom i okolnim uvjetima, mijenja se tokom života.

MUTACIJA je izmjena u redosljednu nukleotida što može uzrokovati promjenu strukture i funkcije proteina i tu promjenu može se prenijeti na potomke. Mogu biti spontane, rijetke su, i rijetko dovode do promjene u fenotipu a uzrok je tautomerizacija (vidi dinamičku kod nukleotida).

Umjetne su češće od spontanijih, događaju se zbog nekih kemikalija ali i zbog zračenja ili drugih stvari.

5-brom uracil je mutageni spoj koji se ugrađuje u DNA umjesto timina nakon čega stanica propada ili divlje raste.

2-amino-purin se ugrađuje u DNA umjesto adenina.

Nitratna kiselina deaminira adenin pa nastaje hipoksantin koji se veže na citozin umjesto na timin nakon čega lanac može puknuti.

Etil-metan-sulfonat metilira gvanidin koji se sparuje s timinom.

Hidroksilamin hidroksilira citozin koji se sparuje umjesto timina a adeninom

Proflavin uzrokuje umetanje ili gubitak 1 para baza za vrijeme replikacije.

Daljne generacije mogu nositi grešku bez da se pokaže dok jednom to ne postane dominantno svojstvo.

PRENOŠENJE GENA:

1. Transformacija: stanica primalac prihvaća mali dio topljive DNA koju oslobađa stanica davalac (*Neisseria*, *Bacillus*, pneumokoki, *Haemophilus*). Rijetko se događa u prirodi.
2. Transdukcija preko bakteriofaga tako da bakterije ne moraju biti u kontaktu. Fagi koji nastanu u bakteriji mogu ponijeti neke gene te bakterije i prenijeti ih u drugu bakteriju.
3. Konjugacija: enterobakterije imaju seksualne pile s kojima se pričvrste jedna na drugu i naprave kanalić. Jedna od njih ima F-plazmid pa je ta mužjak (F+) a druga nema pa je ženka (F-). Genetski materijal putuje kroz kanalić. Na ovaj način bakterije dijele novostvorene osobine kao što je otpornost na antibiotike. Ovo neki zovu spolno razmnožavanje iako se ne povećava broj bakterija, ali često je uvod u razmnožavanje

PLAZMIDI su male kružne izvankromosomske molekule dvolančane DNA koje se mogu samostalno replicirati. Postoji više vrsta:

1. F-plazmidi (fertility) se koriste pri konjugaciji, mogu se integrirati u kromosom (nukleoid) bakterije.
2. R-plazmidi (resistance) su nosioci otpornosti prema antibioticima (kodiraju enzime koji uništavaju ili modificiraju antibiotike, mogu se prenositi među bakterijama, čak i među različitim vrstama, obično se

ne integriraju u kromosom.

3. Col-plazmidi kodiraju proteine bakteriocine (ubijaju druge bakterije, npr. stvarajući pore u staničnoj membrani ili degradirajući DNA ili staničnu stijenku).
- 4 ostali plazmidi mogu biti nosioci virulencije (bolja obrana ili jači toksin) ili poboljšavati metabolizam (različiti enzimi).

UZGOJ BAKTERIJA

Bakterije uzgajamo zato da bismo ih identificirali, proučavali i vidjeli na koje antibiotike su osjetljive. Radimo to i zato da bismo proizveli cjepiva i stvarali korisne mutante (oni koji proizvode ljudski inzulin ili antibiotike).

PODLOGE ZA RAZVOJ KOLONIJA

Podloge oponašaju prirodni okoliš bakterija. Osim hrane i ostalih tvari (pogledaj na metabolizam), moramo osigurati prihvatanje elektrona na kraju respiratornog lanca (kisik ili nešto drugo). Podloge mogu biti prirodne, polusintetske i sintetske. Sintetske se spravlja od definiranih sintetskih spojeva, pa omogućuju usporedbu podataka iz cijelog svijeta. Mogu biti tekuće, krute i polukrute.

1. TEKUĆE

Najčešće se koriste hranjivi bujon (najčešće mesni ekstrakt+NaCl) ili peptonska voda. Peptoni su polipeptidi koji se dobiju proteolitičkom razgradnjom mesa. Dodaci: šećeri, boje, indikatori, serum, žuč, krv. Javlja se zamućenje, paučinaste tvorbe, ponekad talog, kožica na površini, hemoliza (razbistri se), ponekad mjehuri plinova.

2. KRUTE

Agar se dobiva od alge *Gellidium corneum* i to tako da se dotična zagrije na 100 stupnjeva i tako se otopi, zatim se suši pa stavi u vodu da nabubri, i ohladi se ispod 45 stupnjeva da se skrutne i tako dobijemo želatinozna masa koja sadrži agaropentozu i agaropektin. To je osnova za tvorbu krutih podloga i zove se neutralni agar. Ako se doda 10% krvi onda se to zove krvni agar, a iz krvnog se dobije čokoladni ako se zagrijava da hemoglobin pređe u methemoglobin. Kad se dodaje neki šećer onda se agar zove po njemu (npr. saharoza agar), možemo imati i sojin agar i ko zna kakav sve agar. Ako se agar stavi u epruvetu onda je to duboki agar a ako se ukosi onda je ukošeni (živjela logika). Agar izliven u Petrijevu naziva se agar ploča.

Želatina se rijetko koristi jer ju je teško učiniti sterilnom. Dobiva se kuhanjem životinjskih kostiju, hrskavice i drugih dijelova. Kad se to ohladi dobije se hladetina masa - želatina.

Da se spriječi rast bakterija dodaju se antibiotici, ali tada rastu gljivice pa se pH povisuje preko 5 ili se dodaje nistatin pa neće rasti.

3. POLUKRUTE (ili polutekuće kome se više sviđa).

Uvijek u epruveti, a sadrže 0,2-0,4 % agara. Koriste se za praćenje kretanja mikroorganizama.

Po sastavu podloge mogu biti jednostavne i složene. Jednostavne sadrže samo jednu esencijalnu supstanciju (npr. mesni bujon, peptonska voda). Složene se dijele na selektivne i diferencijalne.

Diferencijalne podloge najčešće sadrže neku fermentabilnu tvar uz odgovarajući indikator, što omogućuje razlikovanje pojedinih vrsta. Krvni agar služi za ispitivanje hemolize a endo-agar ima spoj koji pri niskom pH pocrveni, pa se tako vidi da li bakterije snižavaju pH svojim metabolizmom.

Selektivne podloge potiču razvoj nekih vrsta a koče razvoj drugih: selenit-F bujon (za salmonele), Salmonella-Shigella (SS) agar, MacConkey agar (za Escherichiu coli), Loewenstein-Jensen (Mycobacterium tuberculosis). Miler-Hilton agar služi za pravljenje antibiograma.

Podloge za gljivice su obogaćene šećerima i to se zove Sabourand (čitaj: saburo) agar.

KULTIVACIJA ANAEROBNIH BAKTERIJA

Dakle, bakteriju treba držati što dalje od zraka. Postoji više metoda:

1. GasPak sistem: u nepropusni lonac stave se zasijane podloge i GasPak omot sa generatorom H₂ i CO₂. H₂ će s kisikom dati vodu (lonac se zamagli iznutra) i dati anaerobne uvjete, a CO₂ će olakšati razmnožavanje osjetljivijih sojeva.
2. Posuda s dušikom: pomoću vakuum-sisaljke se iz odgovarajuće posude isiše zrak, a potom se dovede dušik. To se ponovi više puta da se istjeraju svi tragovi kisika.
3. Stakleno zvono sa svijećom: svijeća se zapali i pokrije staklenim zvonom, te zabrtvi na dnu. Svijeća će gorjeti sve dok ima kisika. Primitivna metoda prošlih stoljeća (tisućljeća).
4. Fortnerova ploča: podloga se pomoću skalpela podijeli na dvije polovice - na jednu se zasade anaerobi, a na drugu neka fakultativno anaerobna vrsta (E. coli, S. aureus). To se poklopi i zabrtvi. Fakultativni anaerob će potrošiti sav kisik i onda nastupa anaerob.
5. Duboki agar ili bujon pokriven slojem parafinskog ulja onemogućava pristup zraku.

KOLONIJE

Od jedne bakterije diobom može nastati golemi broj pa ako se to događa na hranjivim podlogama dobivamo kolonije jedne vrste jednog soja. Svaka vrsta ima svoje uvjete za razmnožavanje pa im moramo prilagoditi podloge.

Čista kultura dobije se tako da se uzorak više puta razrijedi. 1mL uzorka dopunimo do 10mL, pa 1mL toga opet dopunimo do 10ml i tako još dva puta dobijemo razrijeđenje od 1/10 000. To onda prelije po agar ploči ili ezom, štapićem vate razmaže po podlozi i tako dobijemo pojedine stanice koje izrastu u kolonije.

Kolonije se razlikuju po slijedećim osobinama:

1. Veličina: sitne, vidljive mikroskopom do promjera par mm.
2. Oblik: obično okrugli, udubljene ili ispupčene, rub može biti ravan, nazubljen, nepravilan.
3. Površina: hrapava, glatka, sjajna ili mutna.
4. Prozirnost: od prozirnih do totalno neprozirnih.
5. Boja: bezbojne ili bilo koja boja.
5. Konzistencija se vidi ako dodiruju ezom: suhe ili vlažno sluzave, lako ili teško razmazive, meke ili tvrde, zrnaste ili fibrinozne. Kolonije plijesni su baršunaste.
7. Miris (ali ne bumo gurali nos u koloniju).

Varijacije kolonija:

1. S-kolonije (smooth) su okrugle ravnih rubova, prozirne, sjajne i glatke. Prave ih bakterije s kapsulom.
1. R-kolonije (rough) nepravilne, neravni rub, neprozirne, mutne i hrapave površine. Prave ih bakterije bez kapsule.
3. I-oblici (intermediate) su između R i S.
4. M-kolonije (mucus) su sluzave od sluzave ovojnice a ako ne od toga onda od fenola ili nečeg drugog.
5. D-kolonije (dwarf) patuljaste kolonije, manje od normalnih iste vrste, dobivaju se od bolesnika s kroničnom infekcijom ili ako je uzimao/la antibiotike.
6. G-kolonije (gonidijalne = prolaze kroz bakterijske filtre) su jako male i okrugle.
7. L-kolonije jako male okrugle liče na kapljice ulja, ispupčene ili ravne, granulirana površina. Tvore ih L-oblici bakterija.
8. H-kolonije (Hauch) prave bakterije s bičevima, šire se po površini (rod Proteus).

9. O-kolonije (ohne Hauch) su kolonije bakterija koje su izgubile bičeve.

PRENOŠENJE ZARAŽENOG MATERJALA DO LABORATORIJA

Najvažnije je da uzorčnici bolesti ostanu živi ili bar toliko cijeli da se mogu identificirati. Poželjno je da se prenošenjem nitko ne zarazi.

Stoga se ZM stavlja u neku podlogu sa povoljnim uvjetima. Ta epruveta se zatim stavlja u metalnu, a ta u drvenu. Uz ZM treba dostaviti dokumentaciju u kojoj se vidi opis sindroma, o kojem materjalu je riječ (krv, urin, stolica...), da li je bolesnik uzimao/la lijekove, podaci o bolesniku i sve što bi moglo biti važno za konačnu identifikaciju. Drvena epruveta se omata papirom na kojem veliko i crveno piše: zarazni materijal.

ZM se šalje preko kurira ili nekako drukčije (teleport).

IDENTIFIKACIJA MIKROBA

Nakon uzimanja materijala (krv, urin, feces, likvor, tkiva, gnoj i ostale izlučevine) vrše se razna ispitivanja, ne bi li se identificiralo uzročnika i postavilo dijagnozu. Koriste se mnoge tehnike: mikroskopija, kultivacija i promatranje kolonija, serološke reakcije, biokemijsko ispitivanje, biološko ispitivanje na laboratorijskim životinjama i druge metode.

1. O mikroskopiji, bojenju i kolonijama je već napisano.

2. Seroloških tehnika ima više, a temelje se na specifičnoj reaktivnosti između antigena i homolognog antitijela.

a) Najčešće se koristi aglutinacija. Može se vršiti na predmetnom stakalcu (brza) ili u epruveti (spora i zahtijeva veće količine materijala). Suspenziji živih ili mrtvih bakterija doda se poznati serum s antitijelima i gleda se dolazi li do stvaranja zrnastih nakupina uslijed reakcije antigen – antitijelo. Mutna otopina se razbistri, a sljepljene stanice tvore grudice koje padaju na dno epruvete. Ako se vrši na stakalcu, vide se male krpice.

b) Precipitacija je reakcija otopljenog antigena i otopine antitijela, te dolazi do obaranja taloga koji je kompleks antigen-antitijelo. Pritom je važna koncentracija antigena i antitijela. Razlika od aglutinacije je što ne sudjeluju čitave stanice.

c) Reakcija vezanja komplementa ima dvije faze: prvo pomiješaju se antigen, komplement i serum s antitijelima, a onda se dodaje se hemolitički sistem (eritrociti ovna+serum kunića) s hemolizinima protiv eritrocita ovna. Ako je u prvoj reakciji došlo do vezivanja komplementa, on se neće vezati za kompleks eritrocit - hemolizin, pa neće doći do hemolize a to znači da u serumu pacijenta ima antitijela za antigen.

d) Ostale tehnike su imunoelektroforeza (kombinaciju elektroforeze i precipitacije), imunofluorescencija (antitijela se obilježe nekom fluorescentnom bojom, pa se gleda pod mikroskopom), radioimuni test (antitijela se obilježe radioaktivnim izotopom, pa se mjeri radioaktivnost preostalih antitijela), enzimsko-imuni test (antitijela se obilježe enzimom, pa se mjeri aktivnost preostalog enzima).

3. Biokemijska ispitivanja - promatra se biokemijska aktivnost bakterije. Postoji mnoštvo reakcija i indikatora, a uglavnom se koriste već pripremljeni supstrati - API-test, Roche-tube. Vidi vježbe.

4. Biološki pokus (o tome kasnije).

5. Fagotipizacija - na zasijanu podlogu se nanosi više različitih bakteriofaga (set bakteriofaga) i gleda se hoće li doći do raspada bakterija.

6. Bakteriocinska tipizacija zasniva se na tome da neke bakterije luče neke kemikalije koje ubijaju druge bakterije (bakteriocini), pa se koristi se set poznatih osjetljivih sojeva.

7. Hemolitički stupanj: alfa hemoliza - na krvnom agaru ostaje zelena zona (blaža hemoliza)
beta-hemoliza - na krvnom agaru nastaje bezbojna zona (potpuna hemoliza)
Tvari koje izazivaju hemolizu zovu se hemolizini, ima ih više vrsta a, naziv im nije povezan s vrstom hemolize koju izazivaju.

BIOLOŠKI POKUS

Provodi se davanjem mikroba ili njihovih otrova u ili na pokusnu životinju.

Koristi se za provjeru radnih teorija ili u svakodnevnom ispitivanju:

1. Dokazivanje ili provjera patogenosti i virulencije
2. Identifikacija kad ostale metode ne uspijevaju
3. Otkrivanje koji je mikrob patogen ako ih ima više
4. Pripremanje čistih kultura
5. Uzgoj i održavanje mikroba koji neće rasti na podlogama (*Treponema pallidum*)
6. Dokazivanje otrova
7. Opis bolesti
8. Proizvodnja i provjera cjepiva, antitijela i protuotrova
9. Provjera efikasnosti lijekova
10. Stvaranje atenuiranih sojeva

Koriste se male životinje: bijeli miš, zlatni hrčak, zamorac, lisica, bijeli štakor, micamaca

velike životinje: konj, govedo, ovca, koza, svinja, pas, majmun

ptice: golub, prepelica, kokoš

Životinje moraju biti zdrave prije inokulacije i uzgajane u njima povoljnim uvjetima (maziti i paziti a kasnije zaraziti i ubiti). Virus se uzgajaju na novorođenim životinjama.

Priprema:

1. Izabrati najprikladniju vrstu. Potrebno je više životinja i treba paziti na dob i spol jer to utječe na rezultate. Primjer: bakterije koje kod odraslih životinja ne izazivaju ništa ili lokalnu infekciju kod mladih izazovu sepsu.
2. Biranje pravog materijala za inokulaciju.
3. Ulazna vrata za mikrob

Nakon zaraze treba pratiti sve promjene: temperatura, težina, razvoj bolesti, krvna slika... I naravno konačni ishod: smrt, ozdravljenje ili ubijanje zbog daljnjeg proučavanja.

Najčešća mjesta za inokuliranje (ali mogu i ostala):

1. Potkožno je jako često. Koža se obrije i dezinficira alkoholom. Obično se radi na leđima.
2. Vene - na velikim životinjama vene na ušima, kod manjih na repu, pticama na krilu ili u nogu.
3. Usta - rijetko, preko hrane ili vode ili sondom
4. Trbuh
5. Mišići - obično u stražnju nogu
6. Koža - daje jako tankim i oštrim iglama, ako se pojavi blijeda kvržica onda je uspelo
7. Mozak - to se radi miševima pod narkozom