

Fiziologija mikroorganizama

Ishrana i razmnožavanje bakterija · razmnožavanje kvasaca
i plesni

Prof. dr Andrea Radalj



Sadržaj predavanja

01

Fiziologija i ishrana

Metabolizam, enzimi, tipovi ishrane

02

Razmnožavanje bakterija

Prosta deoba, generacijsko vreme, kriva rasta

03

Hranljive podloge i kolonije

Agar, vrste podloga, priprema, kolonije

04

Razmnožavanje gljivica

Vegetativno, bespolno i polno – spore i životni ciklus

Fiziologija mikroorganizama

ISHRANA

Proučava **biohemijske aktivnosti** unutar i izvan mikroorganizama. Glavne funkcije: **rast i razmnožavanje**

Rast – ravnomerno povećanje svih sastavnih delova ćelije. Kod mikroorganizama „rast“ najčešće označava **povećanje broja ćelija** u populaciji.



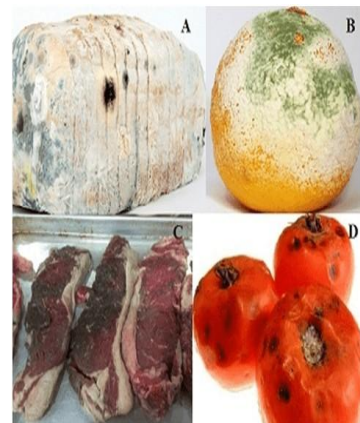
Kruženje elemenata – razmena materija sa sredinom – kruženje azota, ugljenika, sumpora, fosfora



Kontrolisani procesi – industrija mesa i mleka (sir, jogurt, fermentisane kobasice), silaža, proizvodnja antibiotika



Bez kontrole – kvar – kvarenje hrane i hrane za životinje

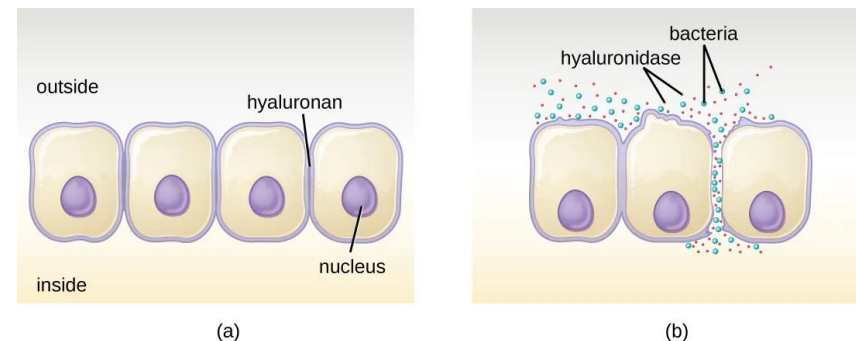


Fiziologija patogena – enzimi kao faktori virulencije

ISHRANA

Patogeni izlučuju enzime koji razgrađuju tkiva domaćina i omogućavaju **širenje infekcije**

Enzim	Bakterija	Funkcija
Hijaluronidaza	<i>Staphylococcus aureus</i>	razgrađuje hijaluronsku kiselinu koja povezuje ćelije → širenje kroz tkiva
DNaza	<i>S. aureus</i>	razgrađuje DNK oslobođenu umiranjem ćelija (smanjuje viskoznost gnoja)
Fosfolipaza C	<i>Bacillus anthracis</i>	razgrađuje fosfolipidni dvosloj ćelija domaćina i membrane fagozoma
Kolagenaza	<i>Clostridium perfringens</i>	razgrađuje kolagen vezivnog tkiva i podstiče širenje



Hijaluronidaza „otvara put“ bakterijama između ćelija



ZAPAMTI

Isti metabolički „alati“ koje bakterija koristi za ishranu postaju **faktori virulencije** kada je domaćin izvor hrane.

Biohemijske reakcije – identifikacija bakterija

ISHRANA

Svaka vrsta ima svoj skup enzima → svoj „biohemijski otisak prsta“. Na tome se zasniva laboratorijska identifikacija.

Katalaza

Staphylococcus +

Streptococcus –

Oksidaza

Pseudomonas +

Enterobacteriaceae –

Fermentacija laktoze

E. coli +

Salmonella –

Ureaza

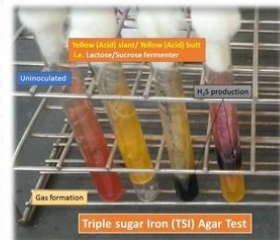
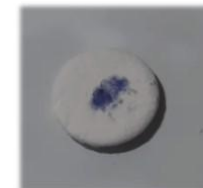
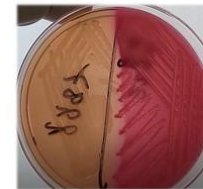
Proteus +

E. coli –

Primeri testova koji razlikuju srodne rodove

Biochemical Reactions of some Enterobacteria and other Enteric Organisms

Species	Lactose	Oxidase	Citrate	MIU Medium			TSI Medium				
				Motility	Indole	Urea	Slope	Butt	H2S	Gas	
<i>E. coli</i>	+	–	–	+	+	–	Y	Y	–	+	
<i>Shigella dysenteriae</i>	–	–	–	–	±	–	R	Y	–	–	
<i>Shigella flexneri</i>	–	–	–	–	±	–	R	Y	–	–	
<i>Shigella boydii</i>	–	–	–	–	±	–	R	Y	–	–	
<i>Shigella sonnei</i>	–	–	–	–	–	–	R	Y	–	–	
<i>Salmonella Typhi</i>	–	–	–	+	–	–	R	Y	W	–	
<i>Salmonella Paratyphi A</i>	–	–	–	+	–	–	R	Y	–	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	–	–	+	+	–	–	Y	Y	+	+	
<i>Citrobacter koseri</i>	–	–	+	+	+	–	Y	Y	–	+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	+	–	+	–	–	–	Y	Y	–	+	
<i>Klebsiella aerogenes</i> (formerly <i>Enterobacter aerogenes</i>)	+	–	+	–	–	S	Y	Y	–	+	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	–	+	–	+	S	Y	Y	–	+	
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	+	–	±	–	–	S	Y	Y	–	+	
<i>K pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	+	–	–	–	–	S	Y	Y	–	+	
<i>Enterobacter</i> spp.	+	–	+	+	–	–	Y	Y	–	+	
<i>Serratia marcescens</i>	d	–	+	+	–	d	Y	Y	–	d	
<i>Proteus vulgaris</i>	–	–	d	+	+	+	R/Y	Y	+	d	
<i>Proteus mirabilis</i>	–	–	d	+	–	+	R	Y	+	+	
<i>Morganella morganii</i>	–	–	–	+	+	+	R	Y	–	d	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	–	–	+	+	+	–	R	Y	–	d	
<i>Providencia stuartii</i>	–	–	+	+	+	–	R	Y	–	d	
<i>Providencia rettgeri</i>	–	–	+	+	+	+	R	Y	–	d	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	–	–	–	+	d	S	R	Y	–	–	
<i>Vibrio cholerae</i>	–	+	d	+	+	–	R	Y	–	–	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	–	+	d	+	+	–	R	Y	–	–	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+	+	+	–	d	R	Y	–	–	
<i>Acinetobacter</i> spp.	–	–	d	–	–	d	R	NC	–	–	
<i>Alcaligenes</i> spp.	–	+	d	+	–	–	R	NC	–	–	

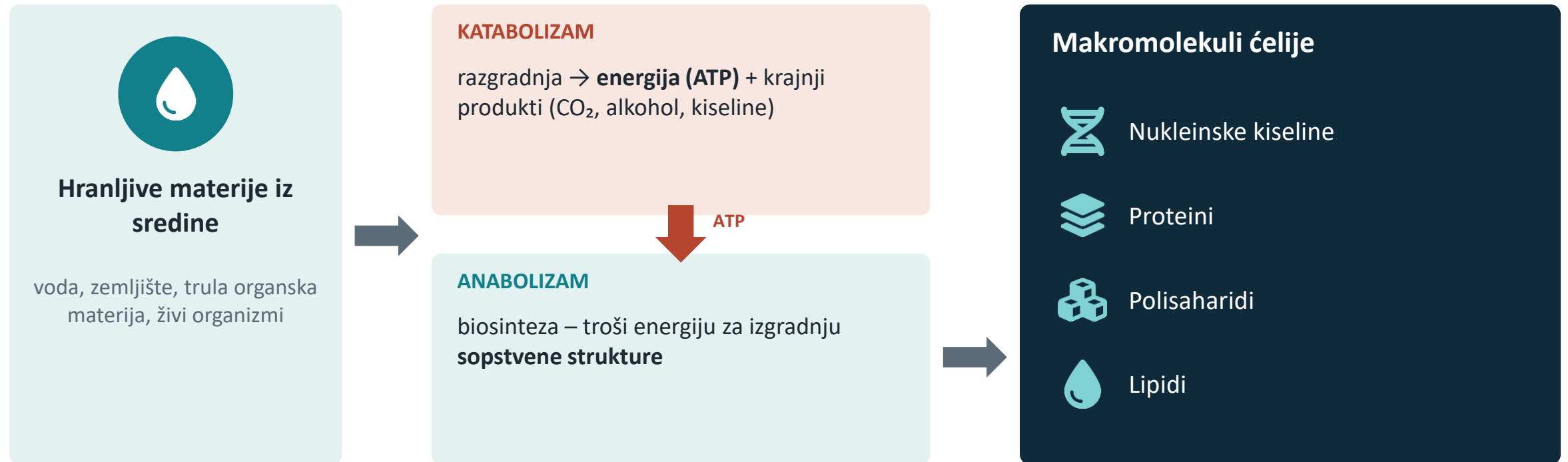


Universe84a

Biohemijske reakcije enterobakterija – tablica i testovi

Ishrana – od hrane do nove ćelije

ISHRANA



Ishrana = akumulisanje hranljivih materija + metabolički procesi → energija za sintezu komponenti sopstvene strukture → rast i razmnožavanje

Tipovi ishrane bakterija

ISHRANA



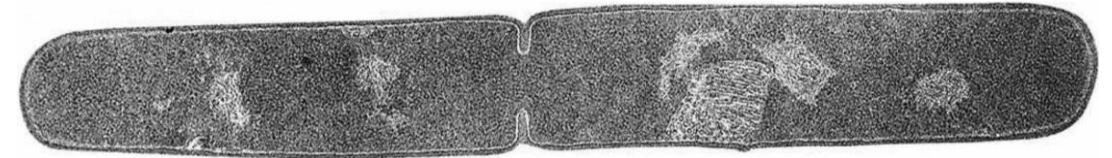
VETERINARSKI UGAO

Zato patogene bakterije u laboratoriji gajimo na podlogama bogatim **organskim materijama** (pepton, mesna voda, krv).

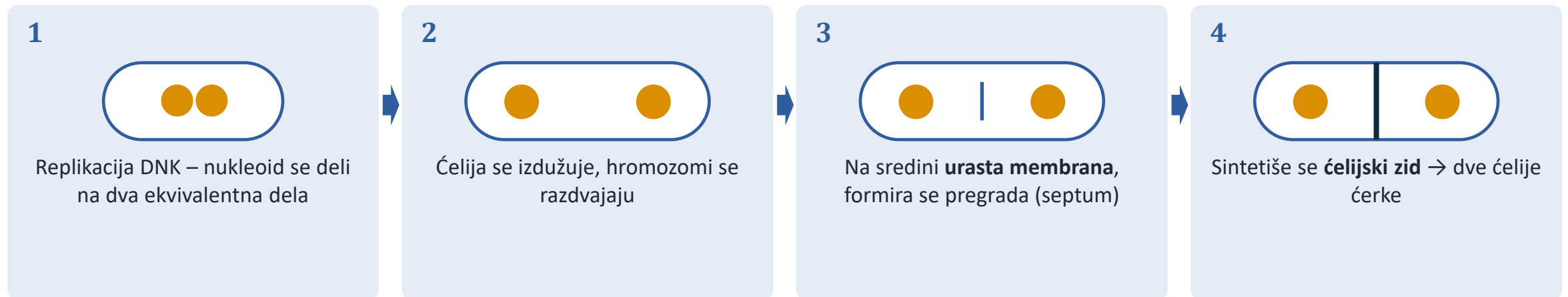
Razmnožavanje bakterija – prosta deoba

BAKTERIJE

- Najveći broj bakterija se deli na dvoje **prostom (binarnom) deobom** – poprečnim „cepanjem“
- **Bespolan** proces – potomstvo je identično roditeljskoj ćeliji
- Teoretski, u pravim uslovima – **neograničeno**



Bakterija u deobi – elektronska mikroskopija



Mesto deobe određuje protein **FtsZ** – srodnik tubulina – koji formira **prsten** na sredini ćelije (Bi i Lutkenhaus, Nature 1991)

Generacijsko vreme

BAKTERIJE

Generacijsko vreme – vreme potrebno da se ćelija podeli (da se broj ćelija udvostruči)

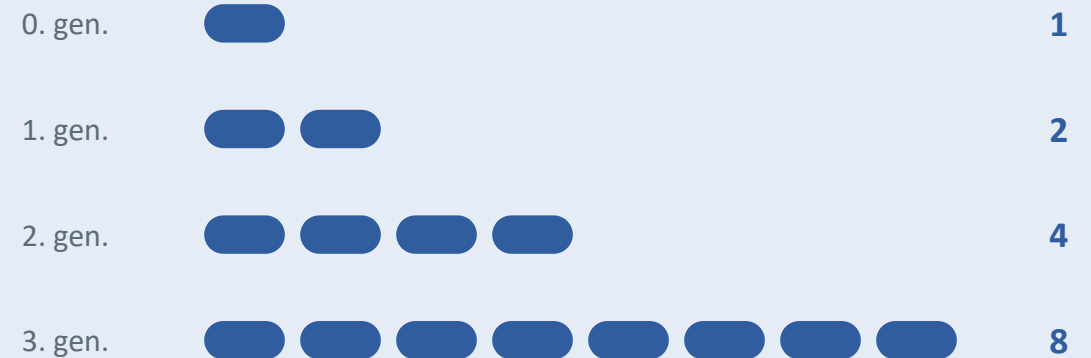
Zavisi od **vrste bakterije** i **uslova sredine** (hranljive materije, voda, temperatura...)

Bakterija	Generacijsko vreme
<i>E. coli</i> u bujonu	17 min
<i>E. coli</i> u mleku	12,5 min
<i>Staphylococcus aureus</i>	27–30 min
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	792–932 min (13–15,5 h)

Zato se kultura mikobakterija čeka **nedeljama**, a *E. coli* izraste preko noći

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

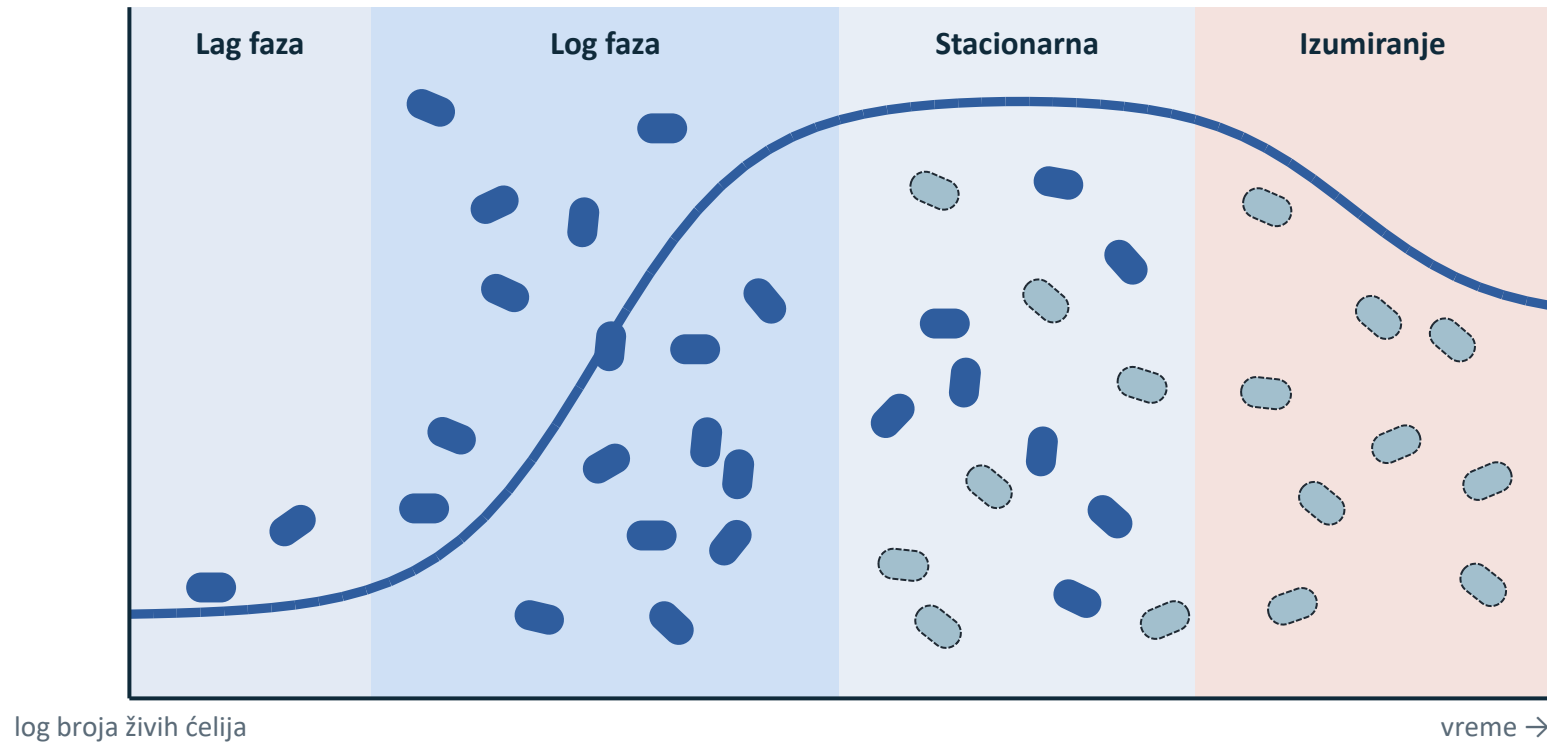
n = broj generacija



E. coli sa generacijskim vremenom od 20 min: za **8 sati** = 24 generacije → $2^{24} \approx$ **16,8 miliona** ćelija od jedne!

Dinamika razvoja bakterijske kulture

BAKTERIJE



Lag faza – Prilagođavanje novoj sredini (inicijalni period, inkubacija) – sinteza enzima, **nema deobe**

Log faza – Intenzivna deoba u pravilnim intervalima – broj raste **eksponencijalno**

Stacionarna faza – Troše se hranljive materije i O_2 , gomilaju se produkti, nema mesta → **razmnožavanje = izumiranje**

Faza izumiranja – Pogoršanje uslova sredine – broj živih ćelija **opada**



ZAŠTO JE VAŽNO

U **log fazi** ćelije su najosetljivije na antibiotike koji deluju na sintezu zida (npr. β -laktami), a za identifikaciju se koristi **mlada kultura** (18–24 h).

Hranljive podloge

PODLOGE

Hranljive podloge – medijumi za rast i razmnožavanje mikroorganizama u laboratorijskim uslovima



Aдекватne hranljive materije – osnova većine podloga je **mesna voda (bujon)**



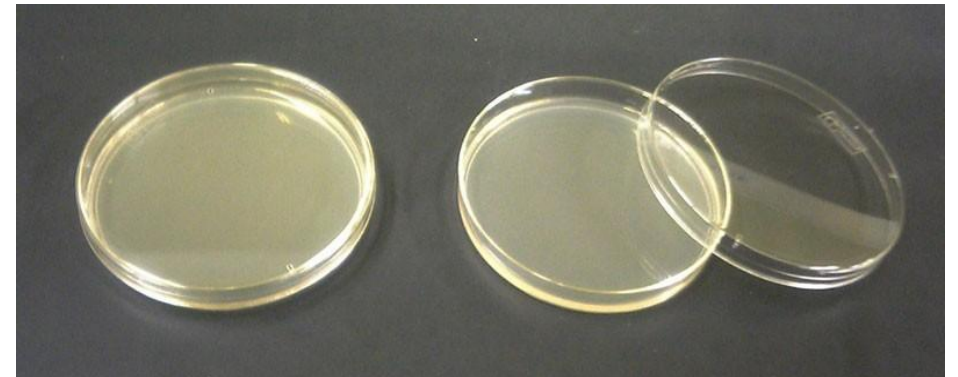
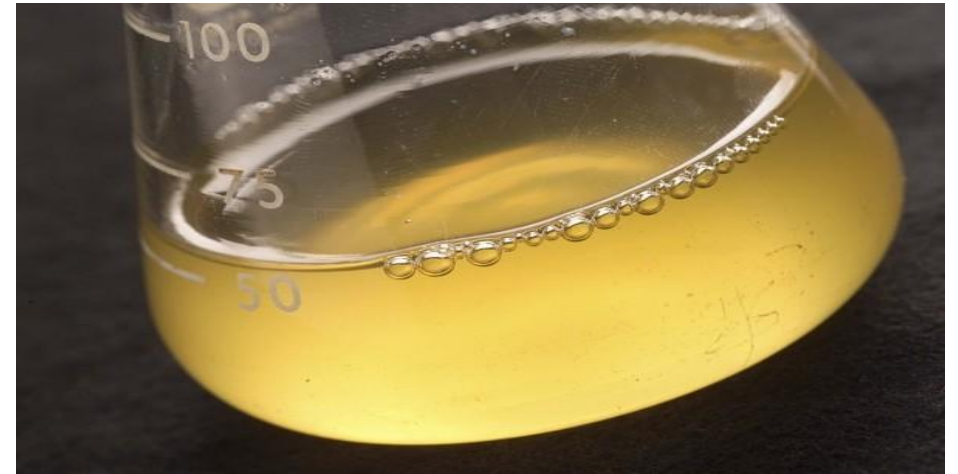
Optimalna pH vrednost – većina patogena raste najbolje oko neutralne pH



Odgovarajuća temperatura – termostat – za patogene najčešće 37 °C



Koncentracija O₂ ili CO₂ – aerobni, anaerobni ili mikroaerofilni uslovi

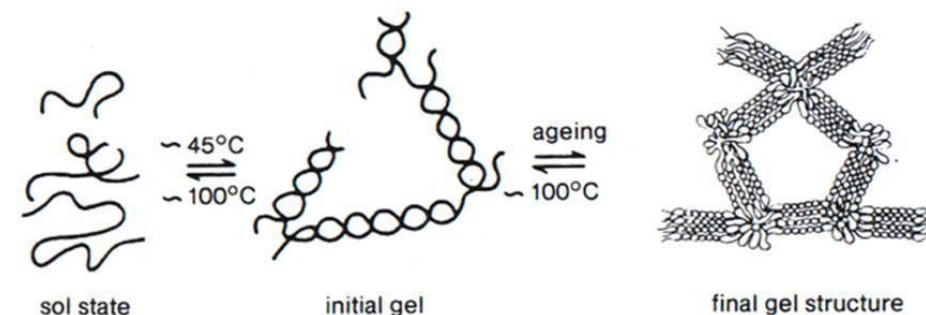


Razlivaju se u Petrijeve ploče ili epruvete

Agar

PODLOGE

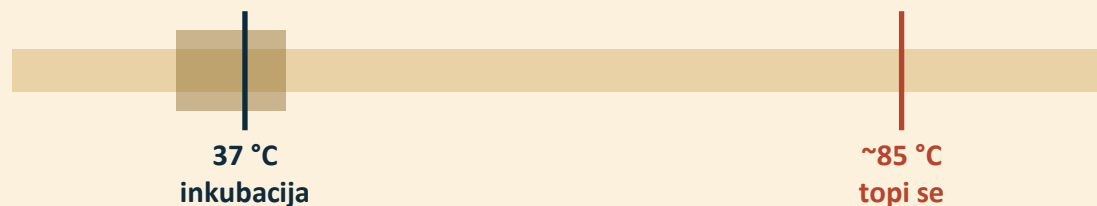
- **Polisaharid** iz crvenih morskih algi (npr. *Gelidium*, *Gracilaria*)
- Daje podlozi **čvrstinu** – zato se čvrste podloge zovu **agari**
- **Sam po sebi nema hranljivu vrednost!**
- Retko koja bakterija može da ga razgradi



Hlađenjem se lanci agaroze povezuju u gel

KONZISTENCIJA ZAVISI OD TEMPERATURE

očvršćava na ~32–40 °C



Zbog toga podloga je **čvrsta na 37 °C**, a tečan agar ohlađen na ~45–50 °C može se mešati sa krvlju ili uzorkom



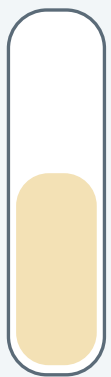
ZANIMLJIVOST IZ ISTORIJE

U Kohovoj laboratoriji koristio se **želatin** – topi se na 37 °C i mnoge bakterije ga razgrađuju. **Fanny Hesse** je 1881. predložila agar, koji je koristila u kuhinji za žele i džemove.

Podloge – konzistencija i priprema

PODLOGE

Konzistencija zavisi od **količine dodatog agara**

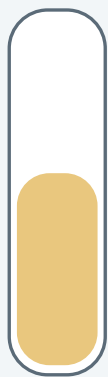


Tečne

(bujoni)

bez agara

*umnožavanje,
obogaćivanje*

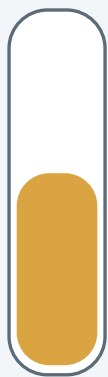


Polutečne

(polutečni agar)

~0,3–0,5 % agara

ispitivanje pokretljivosti



Čvrste

(agari)

~1,5–2 % agara

izolacija, kolonije

PRIPREMA

- 1 Prašak se odmeri prema preskripciji proizvođača
- 2 Rastvara se **kuvanjem u destilovanoj vodi**
- 3 **Sterilizacija** – najčešće autoklav (121 °C)
- 4 Hlađenje na ~45–50 °C i **razlivanje u sterilnim uslovima**
- 5 Očvršćavanje za nekoliko minuta



Kolonije

Kolonija – grupacija mikroorganizama vidljiva golim okom, nastala razmnožavanjem na površini čvrste podloge

- Posle uglavnom **24 sata** od **jedne ćelije** nastaje veliki broj novih ćelija
- Zato se broj kolonija koristi za brojanje živih bakterija (CFU – engl. *Colony forming units*, jedinice koje formiraju kolonije)
- Osobine kolonije: oblik, veličina, struktura, pigment, prozračnost, konzistencija, ivice
- Morfologija kolonija pomaže u **identifikaciji bakterija i gljivica**

Jedna kolonija = potomstvo **jedne ćelije** → **čista kultura** za dalje ispitivanje

PODLOGE

1. Veličina

tačkaste sitne srednje veličine velike

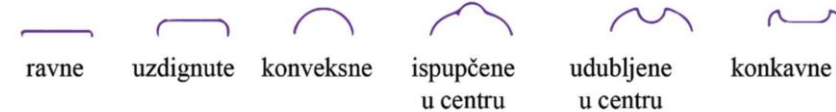
2. Boja



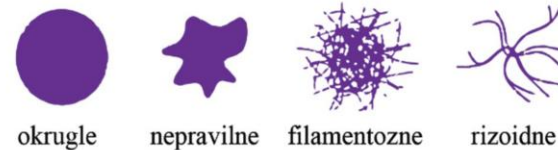
3. Tekstura

suve vlažne lepljive mukoidne

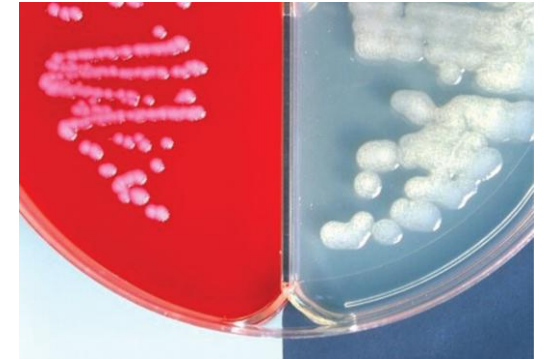
4. Odnos prema ravni podloge



5. Oblik



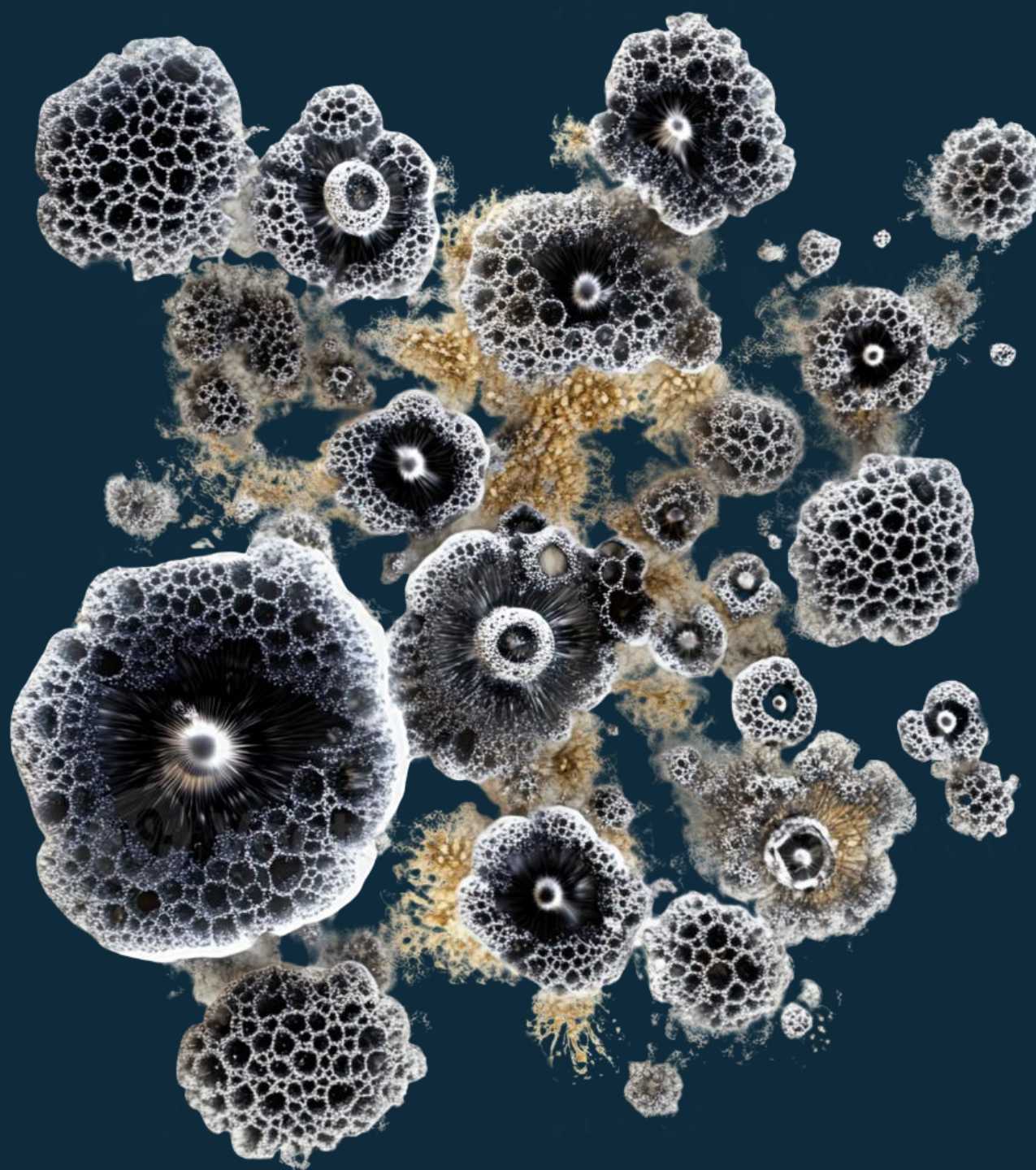
6. Ivice



04

Razmnožavanje gljivica

Kvasci i plesni – vegetativno, bespolno i polno
razmnožavanje

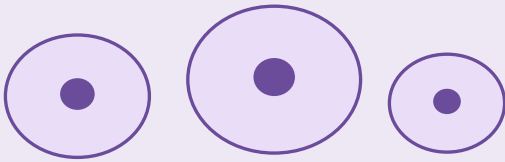


Gljivice – kako se hrane i kako izgledaju

GLJIVICE

Gljivice **izlučuju enzime** u spoljašnju sredinu, razlažu hranljive materije i **apsorbuju** rastvorljive razgrađene produkte. Druga faza životnog ciklusa je **razmnožavanje**.

Kvasci



jednoćelijski, okrugli do ovalni; kolonije glatke, kremaste – liče na bakterijske

Candida, Malassezia, Cryptococcus

Plesni



višećelijske – grade končaste **hife**; splet hifa = **micelijum**; kolonije vunaste, praškaste

Aspergillus, Penicillium, Mucor, dermatofiti

Dimorfne gljivice

u sredini (25 °C)

u tkivu (37 °C)



menjaju oblik prema temperaturi: **plesan ↔ kvasac**

Histoplasma, Blastomyces, Sporothrix

Tri načina razmnožavanja gljivica

GLJIVICE



Vegetativno

deo tela gljivice postaje nova jedinka – **bez spora**

- fragmentacija hifa
- binarna deoba
- pupljenje



Bespolno

bespolne spore nastaju **mitozom** – haploidne, identične roditelju (klonovi)

- sporangiospore
- konidije
- artrokonidije, hlamidospore



Polno

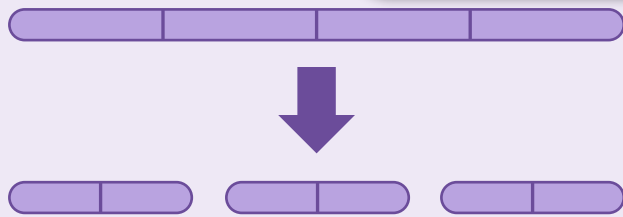
spajaju se dve ćelije → zigot → **mejoza** → **polne spore** sa novim kombinacijama gena

- zigospore
- askospore
- bazidiospore

Ključna razlika: bespolne spore = **mitoza** (kopije) · polne spore = **mejoza** (nove kombinacije gena). Mnoge gljivice imaju oba oblika: **anamorf** (bespolni) i **teleomorf** (polni stadijum)

Vegetativno razmnožavanje

Fragmentacija



Hifa se raspadne na delove; **svaki fragment** izraste u novi micelijum

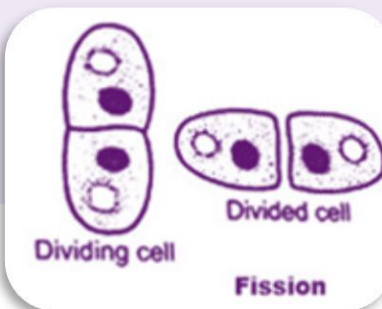
plesni; zato i mali komadić micelijuma pri presejavanju daje novu koloniju

Binarna deoba

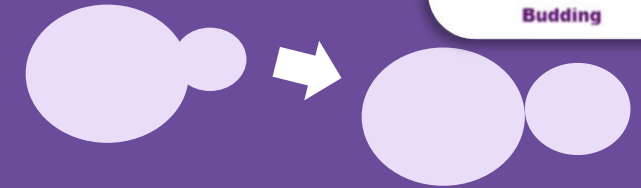


Ćelija se izduži i **pregradom** podeli na dve jednake ćelije – kao kod bakterija

retko – npr. kvasac Schizosaccharomyces pombe („kvasac deobe“)



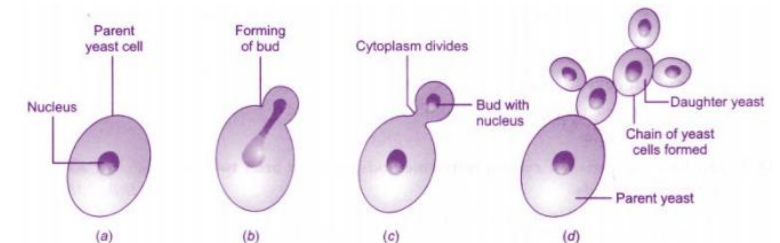
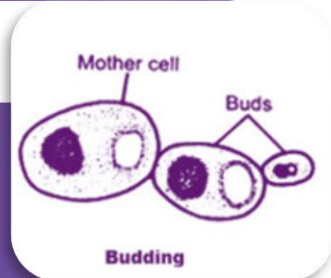
Pupljenje



Na ćeliji majci izraste **pupoljak**, u njega pređe jedro posle mitoze, pupoljak se odvoji

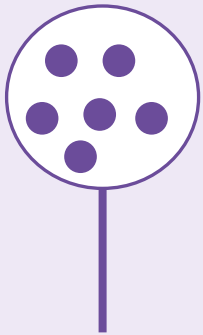
najčešći način kod kvasaca: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*. Ako se pupoljci ne odvoje → **pseudohife** (*Candida*)

GLJIVICE



Bespolno razmnožavanje – vrste spora

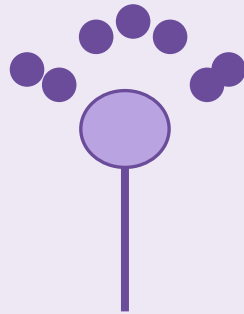
Spore su specijalizovana telašca od jedne, dve ili više ćelija. **Bespolne spore su haploidne** i isključavaju u haploidne gljivice.



Sporangiospore

nastaju **unutar** vrećaste **sporangije**

Mucor, Rhizopus



Konidije

nastaju **slobodno** na vrhu konidiofora

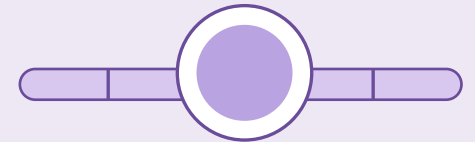
Aspergillus, Penicillium; makro- i mikrokonidije dermatofita



Artrokonidije

hifa se **raspada na segmente**

Dermatofite u dlaci



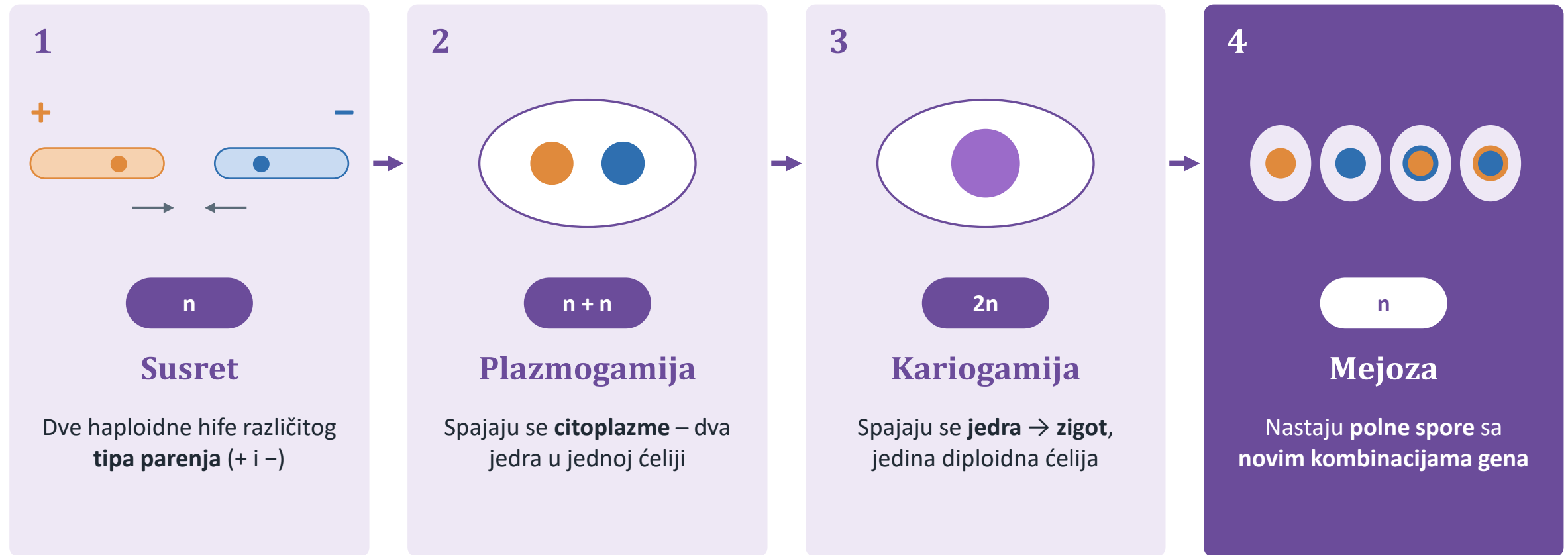
Hlamidospore

krupne, **debelog zida**, otporne

Candida albicans – dijagnostički znak

Polno razmnožavanje – kako nastaju polne spore

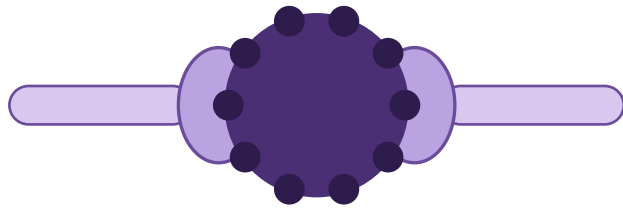
GLJIVICE



Smisao polnog razmnožavanja: potomci nisu kopije roditelja → **raznovidnost** i lakše prilagođavanje novim uslovima

Tri vrste polnih spora

GLJIVICE



zigospora

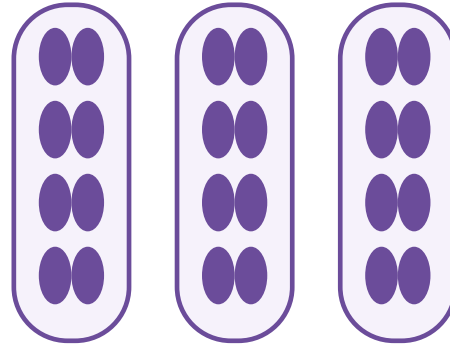
Zigospore

zigomicete

Nastaju **spajanjem dve hife** – jedna krupna, debelozidna spora

Mucor, Rhizopus

ZIGO = spoj dve hife



askusi sa askosporama

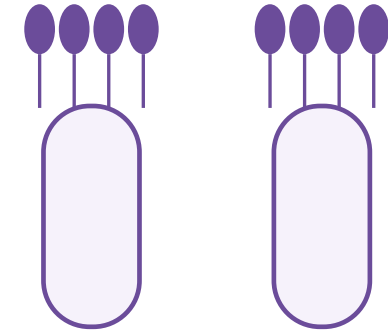
Askospore

askomicete

Nastaju **unutar kesice – askusa**; obično **8** (kod kvasaca 4)

Saccharomyces, Aspergillus, dermatofite

ASKO = u kesici



bazidije sa bazidiosporama

Bazidiospore

bazidiomicete

Nastaju **spolja, na vrhu štapa – bazidije**; obično **4**

pečurke, Cryptococcus

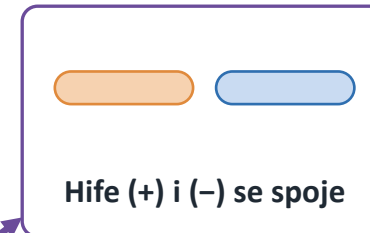
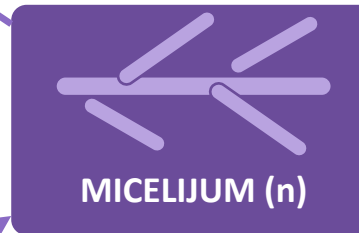
BAZIDIO = na štapiću

Životni ciklus gljivice – dva kruga

GLJIVICE

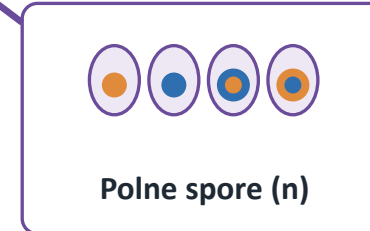
BESPOLNO · mitoza

brzo širenje – spore su kopije



POLNO · mejoza

nove kombinacije gena



klijanje

Gljivica je **većinu života haploidna (n)** – diploidan (2n) je samo **zigot**, koji odmah prolazi mejozu

Pregled: razmnožavanje gljivica na jednom mestu

GLJIVICE

Način	Oblik / spora	Kako nastaje	Primeri
Vegetativno	Fragmentacija	raspad hife na delove	plesni
	Binarna deoba	ćelija se podeli pregradom	<i>Schizosaccharomyces</i>
	Pupljenje	pupoljak na ćeliji majci	<i>Candida, Malassezia, Cryptococcus</i>
Bespolno (mitoza)	Sporangiospore	unutar sporangija	<i>Mucor, Rhizopus</i>
	Konidije	slobodno na konidioforu	<i>Aspergillus, Penicillium</i> , dermatofite
	Artrokonidije	segmentacija hife	dermatofiti
	Hlamidospore	debelog zida, otporne	<i>Candida albicans</i>
Polno (mejoza)	Zigospore	spajanje dve gametangije	<i>Mucor, Rhizopus</i>
	Askospore	unutar askusa (4–8)	<i>Saccharomyces, A. fumigatus</i>
	Bazidiospore	spolja na bazidiji (4)	pečurke, <i>Cryptococcus</i>

Zašto je ovo važno u veterinarskoj praksi

GLJIVICE



Aspergiloza ptica

Sitne **konidije** *A. fumigatus* (oko 2–3 μm) udisanjem dospevaju duboko u pluća i vazdušne kese



Dermatofitoze

Artrokonidije u dlaci su infektivne i otporne – prenose se kontaktom i preko predmeta; u kulturi tipične **makrokonidije** (*Microsporum canis*)



Otitis pasa

Malassezia pachydermatis **pupi na jednom polu** – ćelije liče na otisak stopala ili kikiriki



Kandidijaza

Candida albicans – **pupljenje, pseudohife i hlamidospore** pomažu u identifikaciji

 **ZAPAMTI** Oblik spora i način razmnožavanja – na njima se zasniva **mikroskopska identifikacija** gljivica i razumevanje **puta infekcije**.