Edyta Galoch Fizjologia Prokaryota

Magdalena Gaik

Józef Ciok

Beata Kondracka

Aneta Wysmolińska

BIOLOGIA gr. 5

**Wzrost bakterii w hodowli okresowej**.

Hodowla okresowa to hodowla w której cykl rozwoju populacji jest zamknięty. Wzrost mikroorganizmów rozpoczyna się w momencie wprowadzenia substratu oraz zaszczepienia. Zmiany zawartości mikroorganizmów wykazują fazowy charakter i są przedstawiane w postaci tzw. krzywej wzrostu, która dla różnych gatunków bakterii ma odpowiednie kształty. Typowa krzywa ma kształt sigmoidalny, oraz widoczne fazy wzrostu. Przyjmując liczbę komórek jako miarę przyrostu mikroorganizmów, można wyodrębnić pięć faz : fazę zastoju, fazę wzrostu wykładniczego (logarytmicznego), fazę stacjonarną oraz fazę zamierania.

Faza zastoju, jest to faza która stanowi okres od chwili zaszczepienia do momentu ustalenia maksymalnej szybkości podziałów. Faza ta jest fazą przygotowawczą. Po przeszczepieniu bakterii na nowe podłoże początkowo nie obserwuje się rozmnażania, lecz wzrost wielkości komórek. Bakterie charakteryzuje mała aktywność metaboliczna, duża odporność, przystosowywanie się do nowych warunków środowiskowych. W fazie zastoju zachodzą procesy adaptacyjne i w efekcie bakterie zwiększają swoje rozmiary. Czas trwania tej fazy zależy od rodzaju inokulum.

Faza wzrostu wykładniczego (logarytmicznego). W fazie tej komórki zaczynają się dzielić. W momencie kiedy komórka osiągnie odpowiednia długość następują bakterie wchodzą w etap podziałów. Jest to największa w danych warunkach częstotliwość podziałów przy stałej i równomiernej syntezie składników komórkowych. Każda komórka dzieli się na dwie. Po określonym czasie wzrostu powstałe komórki znowu dzielą się na dwie itd. Czas, który oddziela od siebie kolejne podziały jest to czas generacji. Zależy on od warunków w których prowadzona jest hodowla i od cech gatunkowych drobnoustroju. W konkretnej hodowli jest on więc stały. Liczba bakterii podwaja się co każdy okres generacji, rośnie więc wykładniczo z upływem czasu.

Faza stacjonarna charakteryzuje się spadkiem przyrostu liczby bakterii, co spowodowane jest zamieraniem części komórek z powodu wyczerpywania się składników pokarmowych, tlenu i wytwarzania produktów przemiany materii. Zamieranie to jest w pewnej równowadze z dzieleniem się innych komórek.

Faza zamierania to faza kiedy pod wpływem czasu liczba komórek zamierających rośnie i dochodzi do spadku ogólnej liczby komórek – hodowla się przerzedza i zamiera. Faza ta jest ostatnią fazą w rozwoju bakterii

Celem prowadzonego doświadczenia było oznaczenie liczby żywych komórek bakteryjnych *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa.* Bakterie te hodowano w hodowli okresowej, w warunkach właściwej temperatury i napowietrzania.. Posiewy wykonano metodą powierzchniową, po przygotowaniu rozcieńczeń danego inokulum w roztworze soli fizjologicznej. Wysiewy wykonano po wyznaczonych czasach hodowli na agar odżywczy.

1. **Oznaczenie liczby żywych komórek metodą hodowlaną.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| czas trwania hodowli (h) | log liczby kolonii  *Pseudomonas aeruginosa* | log liczby kolonii  *Escherichia coli* |
| 0 | 2,8808 | 2,9777 |
| 2 | 2,8990 | 3,7240 |
| 4 | 4,1461 | 5,8200 |
| 6 | 6,3222 | 6,2944 |
| 8 | 7,0043 | 7,8921 |
| 10 | 8,4150 | 7,5315 |
| 24 | 7,6243 | 7,9248 |
| 48 | 7,2330 | 7,3032 |

1. **Gęstość optyczna OD**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Czas trwania hodowli (h) | Wartość OD przy długości fali 600 nm dla *Ps. Aeruginosa* | Wartość OD przy długości fali 600 nm dla *E. coli* |
| 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,002 | 0 |
| 4 | 0,017 | 0 |
| 6 | 0,323 | 0,004 |
| 8 | 0,730 | 0,153 |
| 10 | 1,754 | 0,950 |

1. **Oznaczenie biomasy w hodowli bakterii**

X=(a-b)/40

1. Masa naczynka z zawiesiną (mg)
2. Masa pustego naczynka (mg)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Czas trwania hodowli (h) | Biomasa (mg) Pseudomonas aeruginosa | Biomasa (mg)  *Escherichia coli* |
| 2 | - | - |
| 4 | 0 | - |
| 6 | 0,005 | - |
| 8 | 0,011 | 0,006 |
| 10 | 0,010 | 0,010 |
| 24 | 0,35 | 0,04 |
| 48 | 0,029 | 0,63 |

1. **Specyficzna szybkość wzrostu- µ:**

- Obliczyć µ hodowli, biorąc pod uwagę ilości biomasy bakteryjnej X:

µ = 2,3 x  (logXn– logX0) / Δt

µ- specyficzna szybkość wzrostu czyli ilość masy bakterii wytworzona w ciągu 1h

Xn– masa komórek bakteryjnych w mg/ml hodowli po czasie tn

X0– masa komórek bakteryjnych w mg/ml hodowli po czasie t0

Δt = tn – t0

*Pseudomonas aeruginosa*

µ=2,3\*(6,322-2,8808)/6=1,3192

*Escherichia coli*

µ=2,3\*(5,82-2,9777)/4=1,6343

1. **Czas podwojenia biomasy Td:**

Td = ln2 / µ

*Pseudomonas aeruginosa*

Td =0,69314/1,3192=0,5254

*Escherichia coli*

Td =0,69314/1,6343=0,4241

1. **Czas generacji Tg:**

Tg = log2 (tx – t0) / (logNx – logN0)

Tg – czas generacji, czyli czas między dwoma podziałami komórek podczas fazy logarytmicznej wzrostu

tx – czas trwanie fazy logarytmicznej wyznaczony z wykresu

Nx – liczba bakterii w czasie x

*Pseudomonas aeruginosa*

Tg =(0,3010\*6)/(6,322-2,8808)=0,5248

*Escherichia coli*

Tg =(0,3010\*4)/(5,82-2,9777)=0,4236

1. **Liczba pokoleń n:**

n = (logNx – logNo) / log2

n – liczba pokoleń podczas fazy logarytmicznej

*Pseudomonas aeruginosa*

n=(6,322-2,8808)/0,3010=11,43

*Escherichia coli*

n=(5,82-2,9777)/0,3010=9,4428

Wnioski: