ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

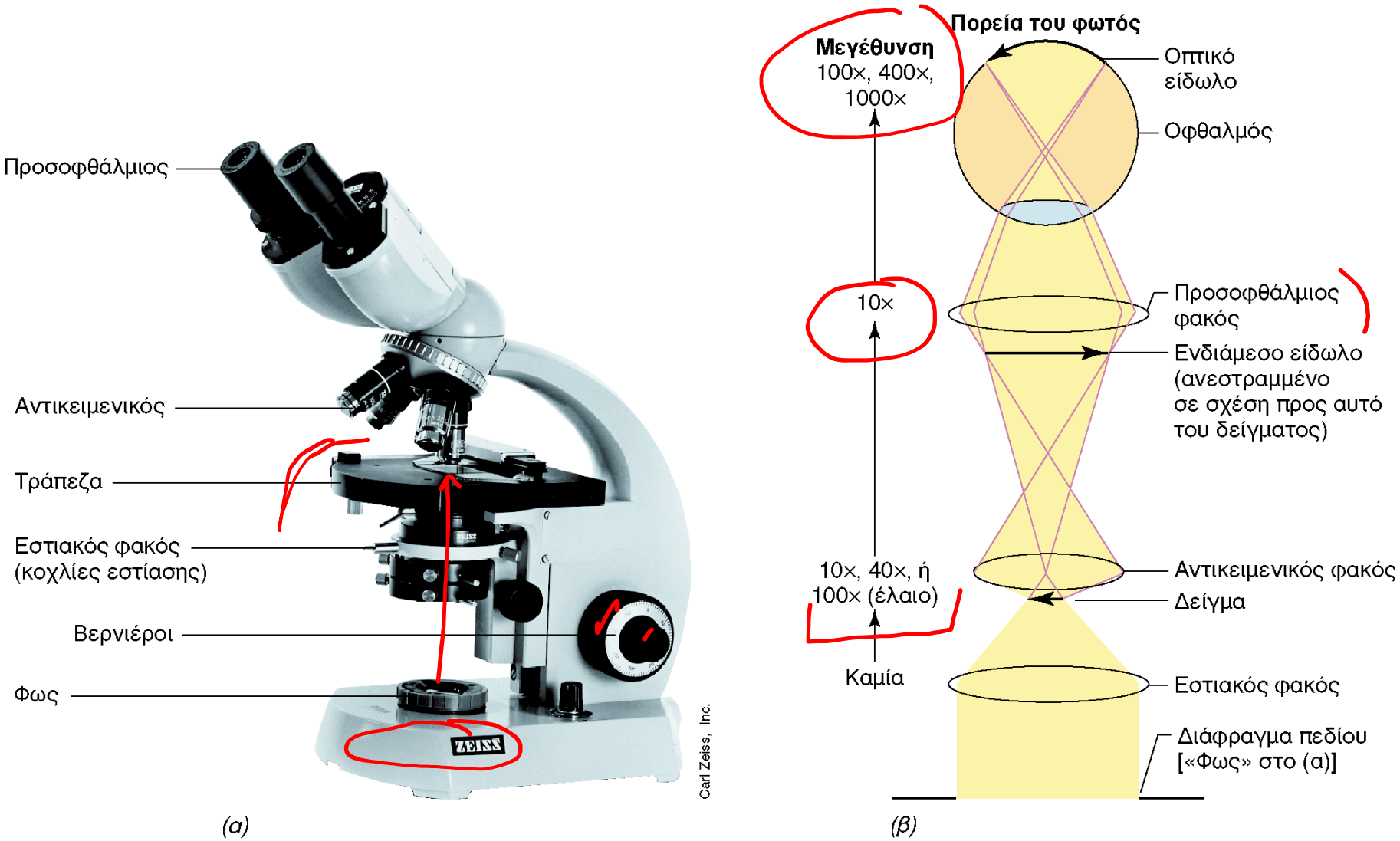
Γιώργος Τσιάμης

Αναπληρωτής Καθηγητής

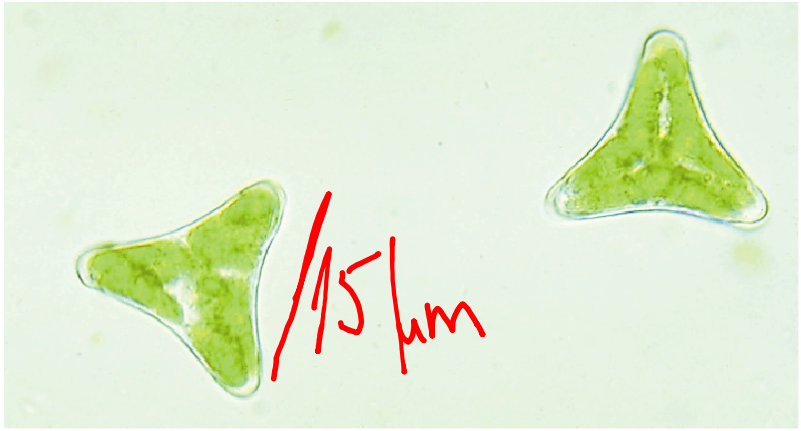
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας

4

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

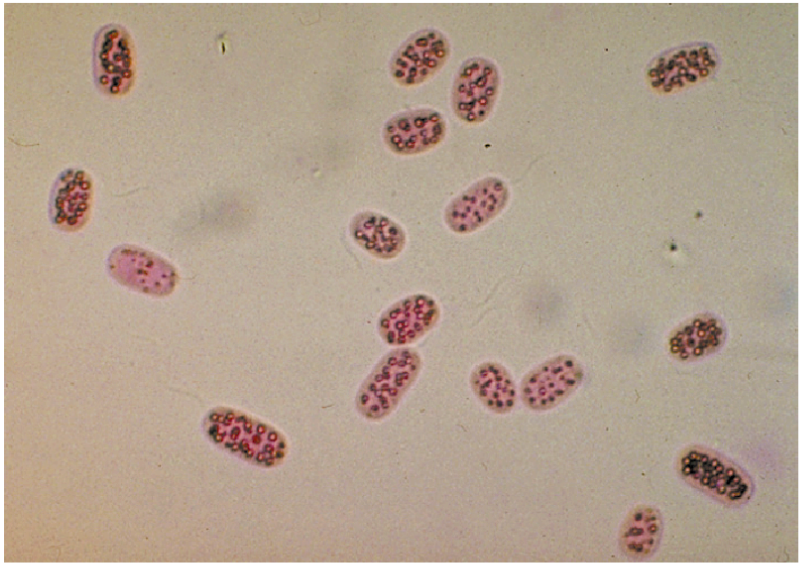


Εικόνα 4.1 (*α*) Σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο. Υποδεικνύονται ορισμένα βασικά μέρη του. (*β*) Πορεία του φωτός διά μέσου του σύνθετου οπτικού μικροσκοπίου. Εκτός των 10Χ, υπάρχουν και προσοφθάλμιοι φακοί των 15-30Χ.



T. D. Brock

(α)



Norbert Pfennig

(β)

Εικόνα 4.2 Μικροφωτογραφίες χρωσμένων μικροοργανισμών που έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου. (*α*) Ένα χλωροφύκος (ευκαρυώτης). (*β*) Ένα πορφυρό φωτοτροφικό βακτήριο (προκαρυώτης). Τα κύτταρα του χλωροφύκους έχουν διάμετρο περί τα 15 μm, ενώ τα βακτηριακά κύτταρα έχουν διάμετρο περί τα 5 μm.

Οπτικό μικροσκόπιο

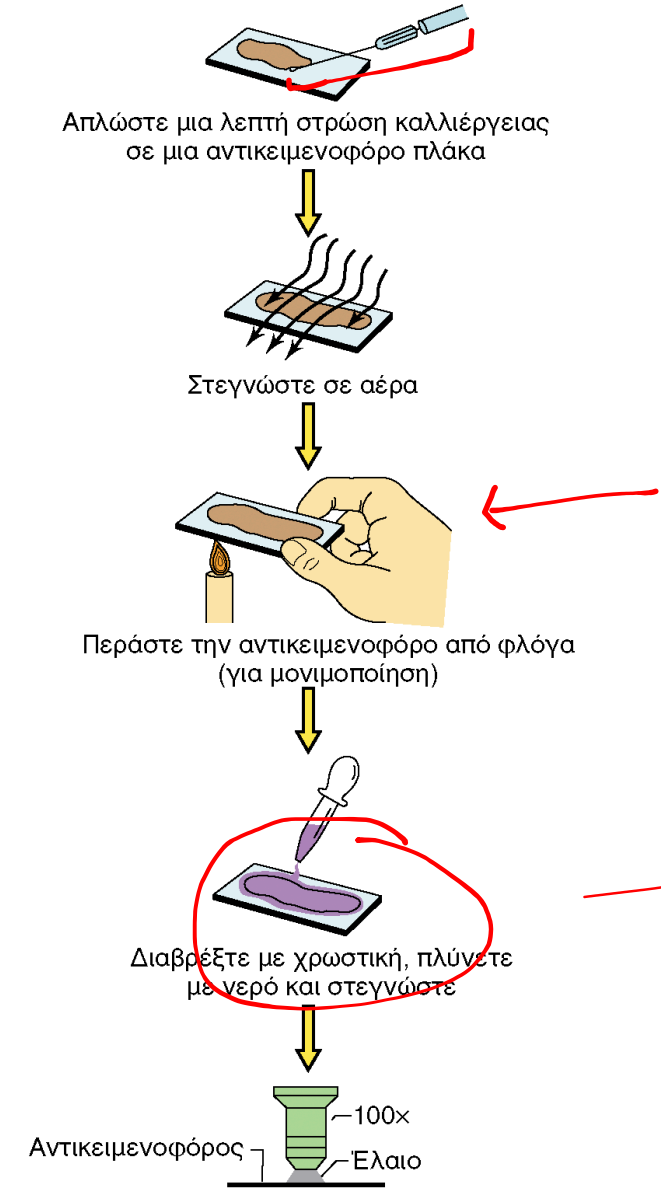
Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων

Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου

Μικροσκοπία φθορισμού

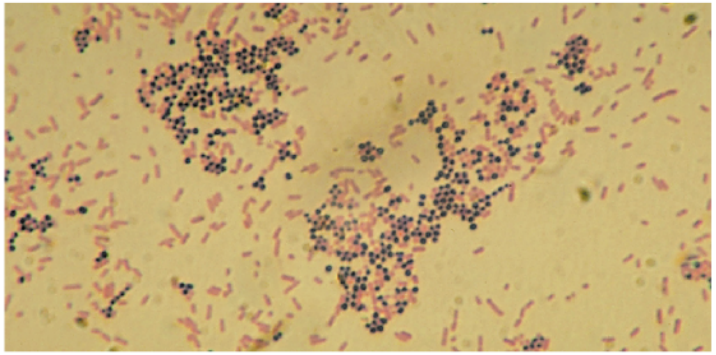
Μικροσκοπία συνεστιακής σάρωσης με λέιζερ

Ηλεκρονιακή μικροσκοπία διέλευσης & σάρωσης

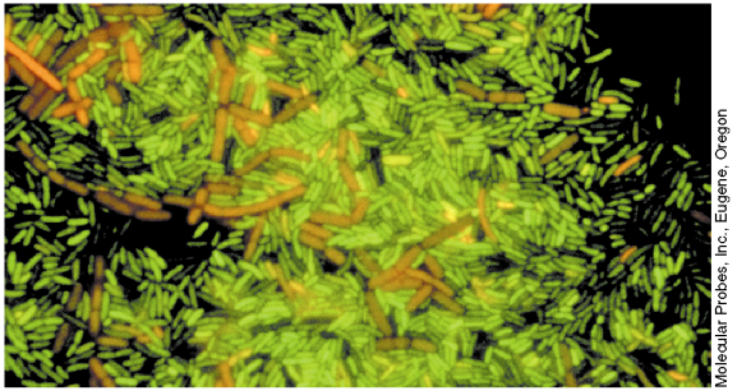


καλυπτρίδα

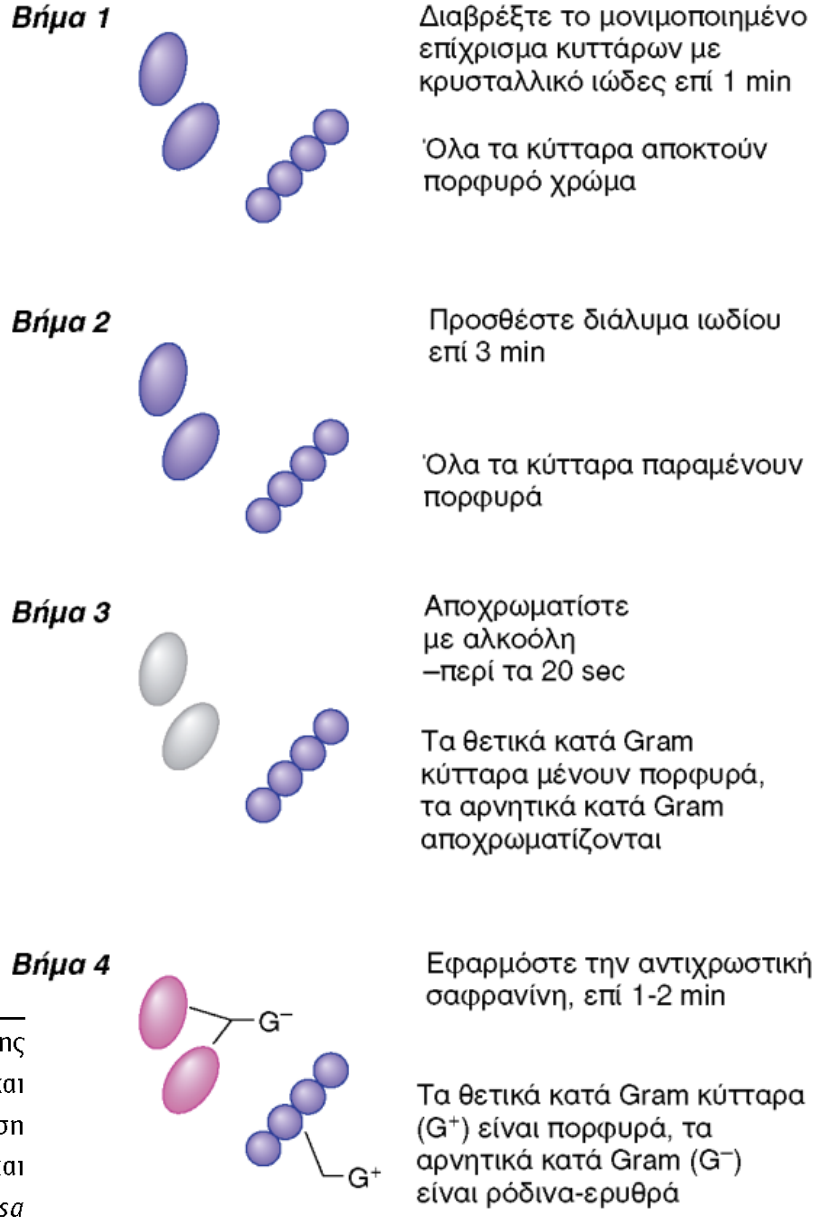
Εικόνα 4.3 Χρώση κυττάρων για μικροσκοπική παρατήρηση.



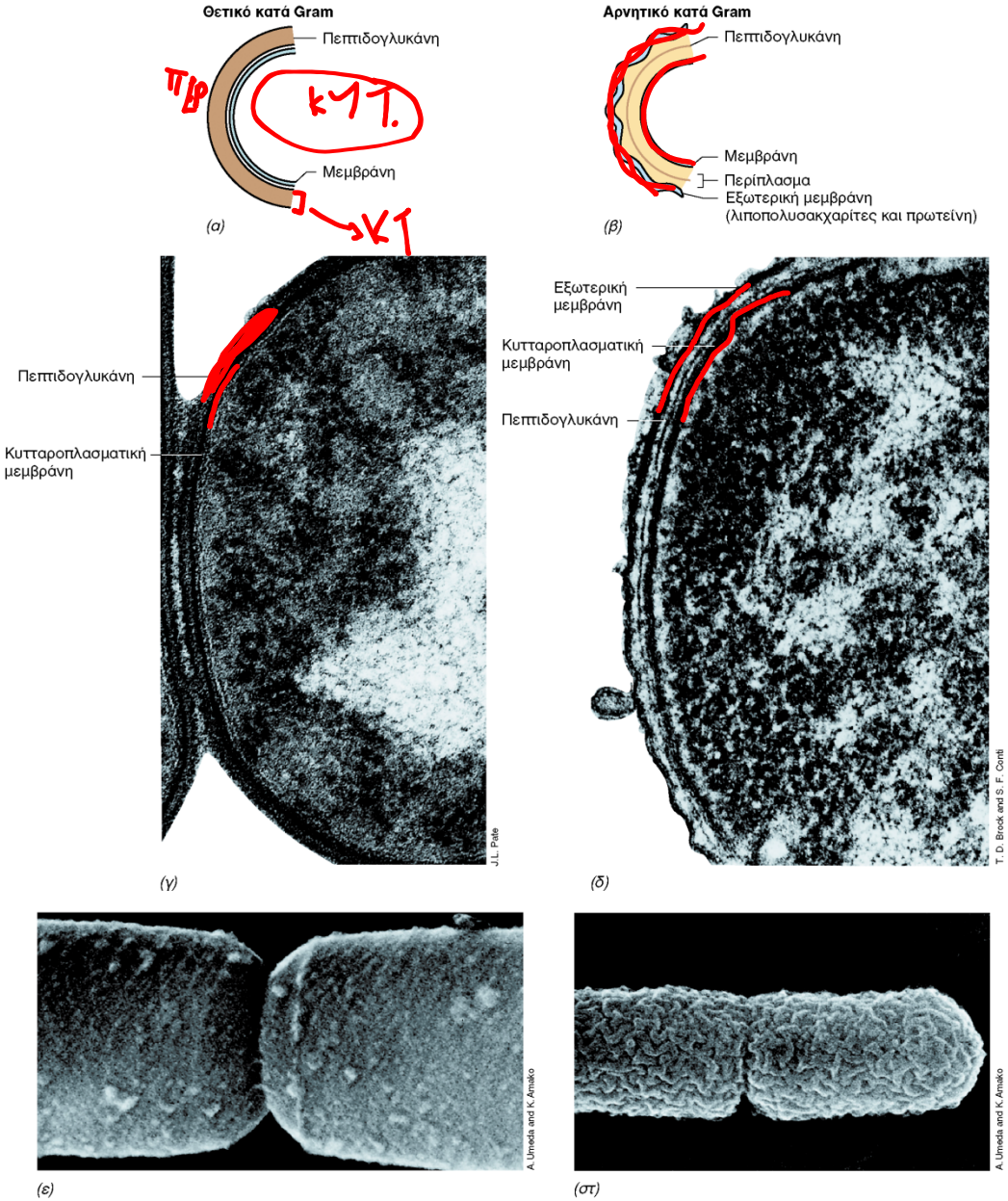
(β)



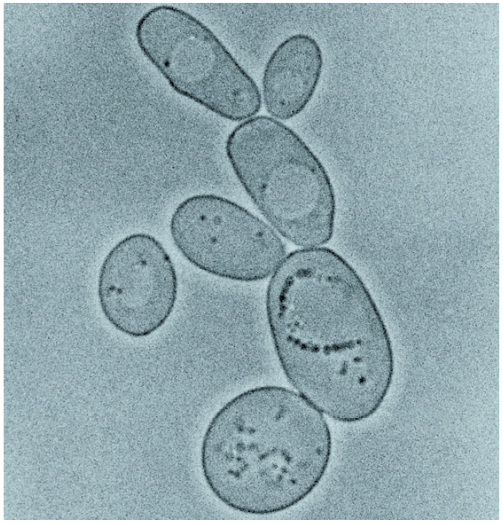
(γ)



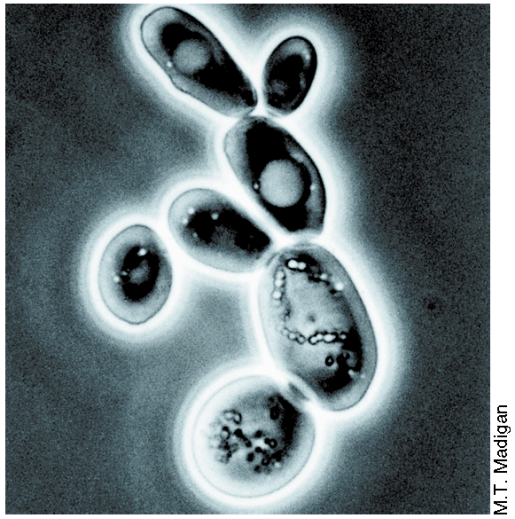
Εικόνα 4.4 Χρώση κατά Gram. (*α*) Βήματα στη διαδικασία της χρώσης κατά Gram. (*β*) Μικροφωτογραφία θετικών κατά Gram (πορφυρό-κυανό) και αρνητικών κατά Gram (ερυθρό-ρόδινο) βακτηρίων που έχουν υποστεί χρώση κατά Gram: πρόκειται, αντιστοίχως, για τα είδη *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*. (*γ*) Μικροφωτογραφία κυττάρων *Pseudomonas aeruginosa* (αρνητικό κατά Gram, πράσινο) και *Bacillus cereus* (θετικό κατά Gram, πορτοκαλί) μετά από χρώση με την μέθοδο **LIVE *Bac* Light**™. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram κυττάρων σε ένα και μόνο βήμα χρώσης.



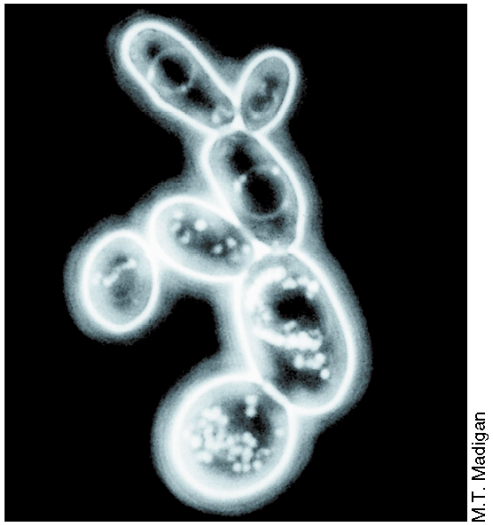
Εικόνα 4.28 Κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων. (*α*, *β*) Σχεδιαγράμματα θετικών και αρνητικών κατά Gram κυτταρικών τοιχωμάτων. (*γ*) Ηλεκτρονιακό μικρογράφημα που δείχνει το κυτταρικό τοίχωμα ενός θετικού κατά Gram βακτηρίου, του *Arthrobacter crystallopoietes*. (*δ*) Ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το *Leucothrix mucor*. (*ε*, *στ*) Ηλεκτρονιακά μικρογραφήματα σάρωσης ενός βακτηρίου θετικού κατά Gram (*Bacillus subtilis*) και ενός αρνητικού κατά Gram (*Escherichia coli*). Παρατηρήστε την υφή επιφανείας στα κύτταρα των (*ε*) και (*στ*). Διάμετρος ενός κυττάρου *B. subtilis* ή *E. coli*: περί το 1 μm.



(α)

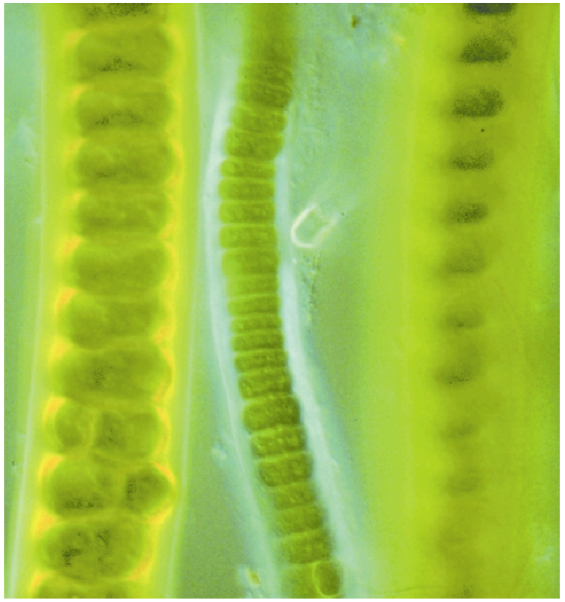


(β)



(γ)

Εικόνα 4.5 Μικροφωτογραφίες του ίδιου πεδίου κυττάρων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, που έχουν ληφθεί με τρεις διαφορετικούς τύπους οπτικού μικροσκοπίου· (*α*) φωτεινού πεδίου, (*β*) αντίθεσης φάσεων, (*γ*) σκοτεινού πεδίου. Μέση διάμετρος κυττάρων: 8-10 μm.



(α)

(β)

(γ)

Εικόνα 4.6 Μικροφωτογραφίες διαφόρων μικροοργανισμών, από μικροσκοπία φθορισμού. (*α*, *β*) Κυανοβακτήρια. (*α*) Κύτταρα παρατηρούμενα με μικροσκοπία φωτεινού πεδίου. (*β*) Τα ίδια κύτταρα παρατηρούμενα μέσω φθορισμού, μετά από έκθεση σε φως μήκους κύματος 546 nm: το ερυθρό χρώμα οφείλεται σε αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης και άλλων χρωστικών. (*γ*) Κύτταρα του νηματοειδούς βακτηρίου *Leucothrix mucor*, χρωσμένα με τη φθορίζουσα χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», η οποία φθορίζει στο πράσινο. Τα κύτταρα αυτά έχουν διάμετρο 3 μm και μπορεί να φθάσουν σε μήκος μεγαλύτερο των 100 μm.

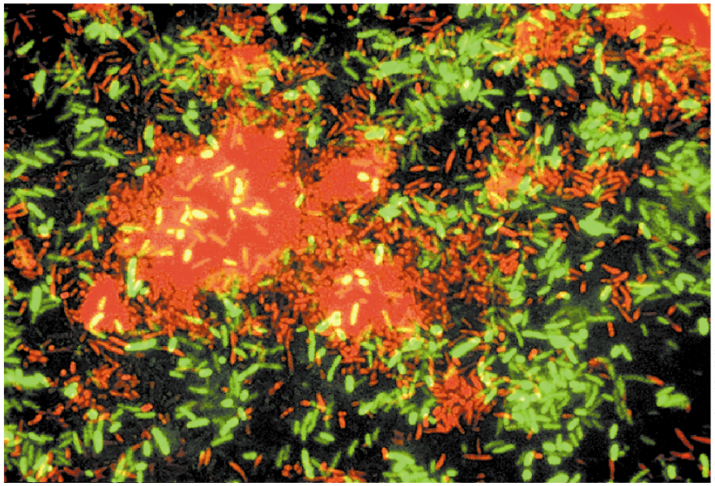
Linda Barnett and James Barnett

(α)

Suzanne Kelly

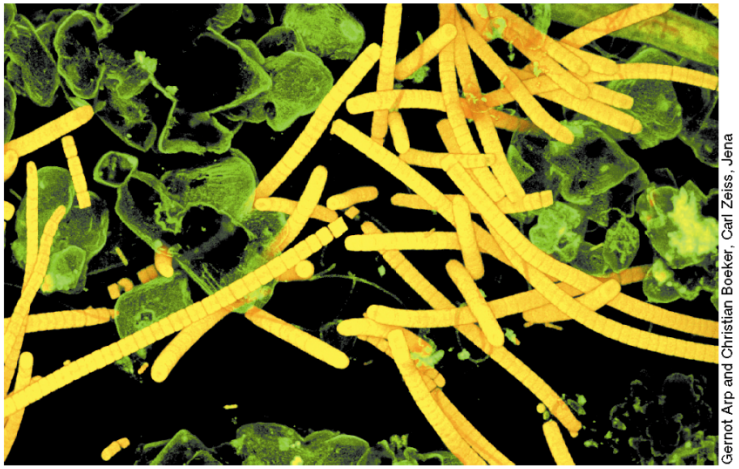
(β)

Εικόνα 4.7 Τριδιάστατη απεικόνιση κυττάρων (*α*) με μικροσκοπία αντίθεσης συμβολής, και (*β*) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης. Τα κύτταρα ζυμομύκητα στο (*α*) έχουν διάμετρο περί τα 8 μm. Παρατηρήστε πόσο ευκρινής είναι ο πυρήνας των κυττάρων αυτών (πρβλ. Εικόνα 4.7*α* με Εικόνα 4.5*α*). Τα βακτηριακά κύτταρα στο (*β*) έχουν μήκος περί τα 2,2 μm. Το μικρογράφημα έχει ληφθεί από φυσικό βιοφίλμ που αναπτύχθηκε στην επιφάνεια αντικειμενοφόρου, η οποία εμβαπτίσθηκε επί 24 h σε ποτίστρα σκύλου, αφέθηκε να στεγνώσει, και παρατηρήθηκε με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης.



Subramanian Karthikeyan

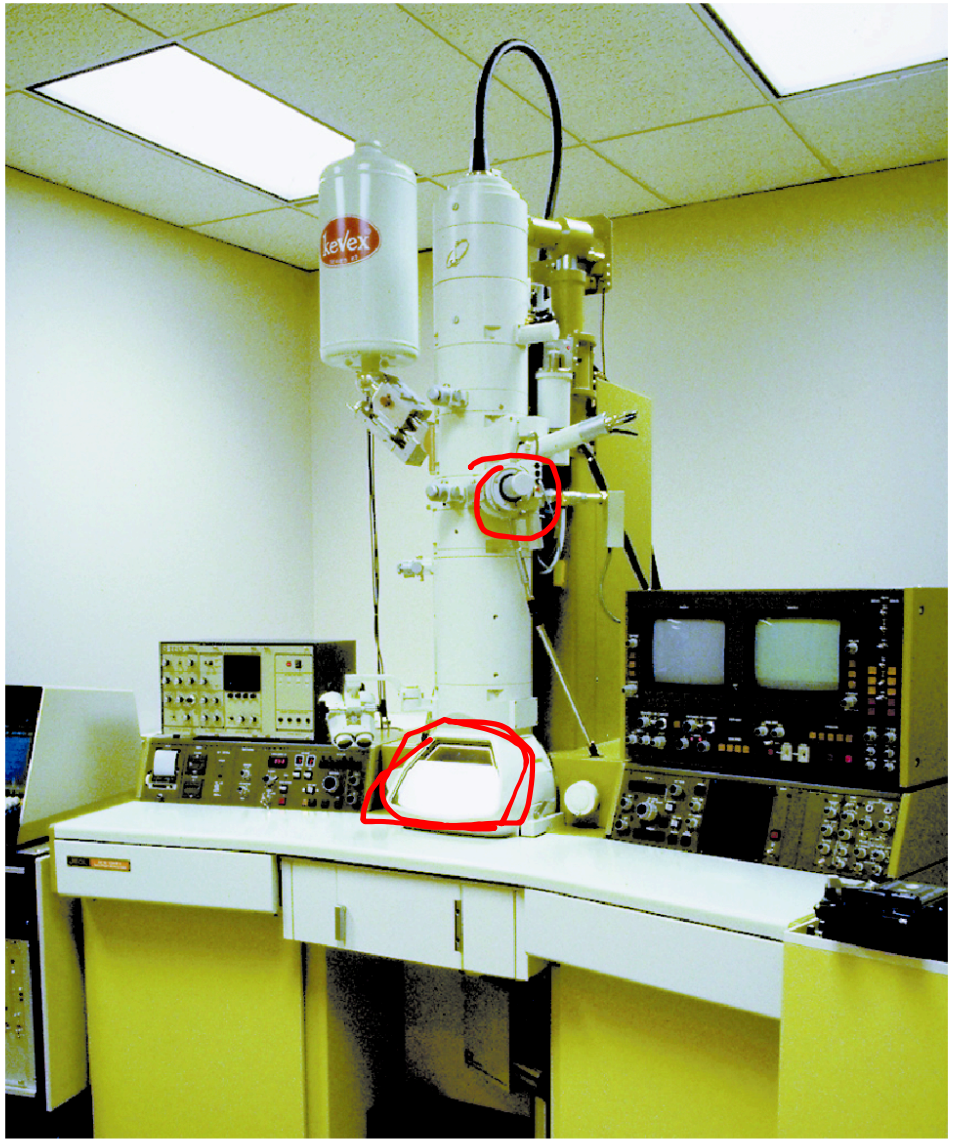
(α)



Gernot Arp and Christian Boeker, Carl Zeiss, Jena

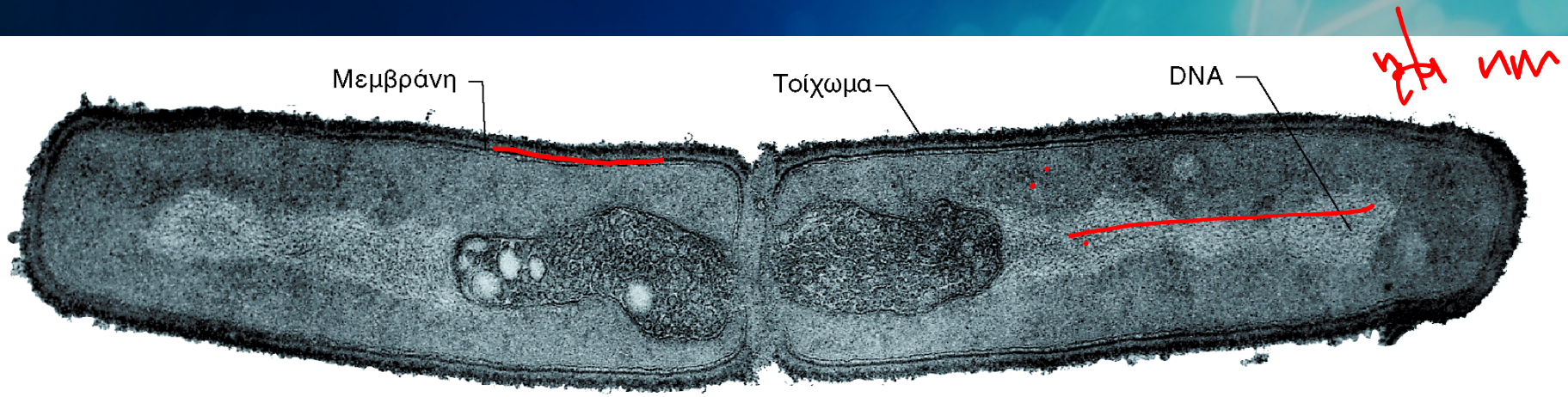
(β)

Εικόνα 4.8 Μικροσκοπία συνεστιακής σάρωσης με λέιζερ. (*α*) Συνεστιακή εικόνα μιας μικτής κοινωνίας μικροβιακού βιοφίλμ, καλλιεργημένου υπό εργαστηριακές συνθήκες. Τα πράσινα, ραβδόσχημα κύτταρα είναι *Pseudomonas aeruginosa*, που είχαν εισαχθεί στο βιοφίλμ πειραματικά. Σε διαφορετικά επίπεδα βάθους στο βιοφίλμ, υπάρχουν και άλλα είδη κυττάρων, που φαίνονται με διαφορετικό χρώμα. (*β*) Συνεστιακό μικρογράφημα νηματοειδούς κυανοβακτηρίου που αναπτύσσεται σε λίμνη πλούσια σε ανθρακικό νάτριο.

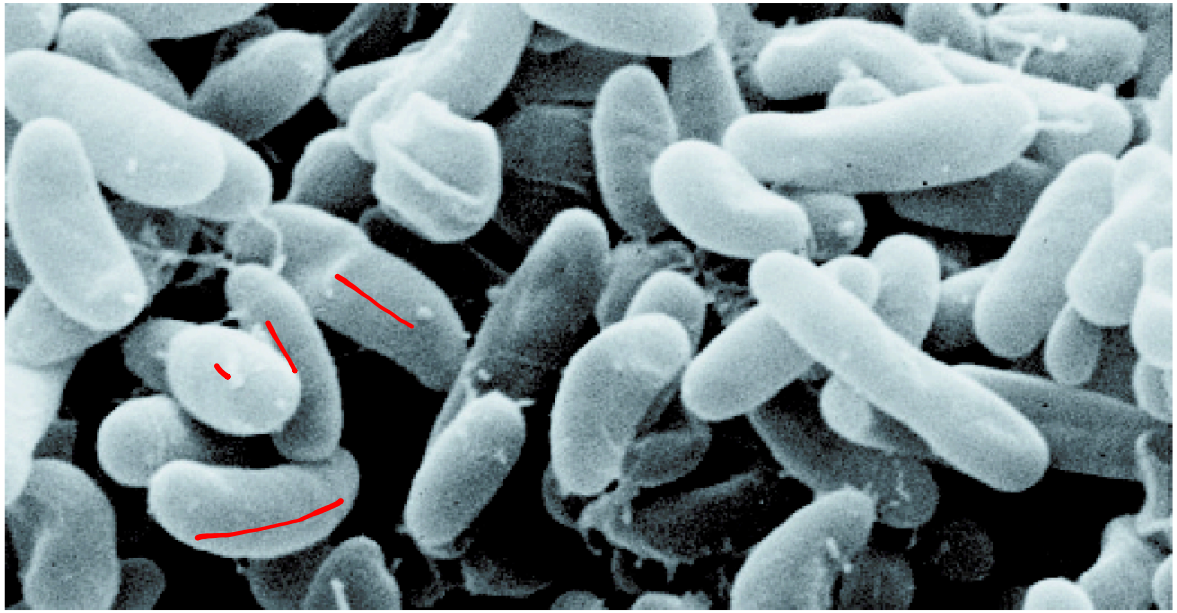


JEOL, USA Inc.

Εικόνα 4.9 Ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο. Το συγκεκριμένο όργανο λειτουργεί τόσο ως ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο διέλευσης όσο και ως ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης.



(α)

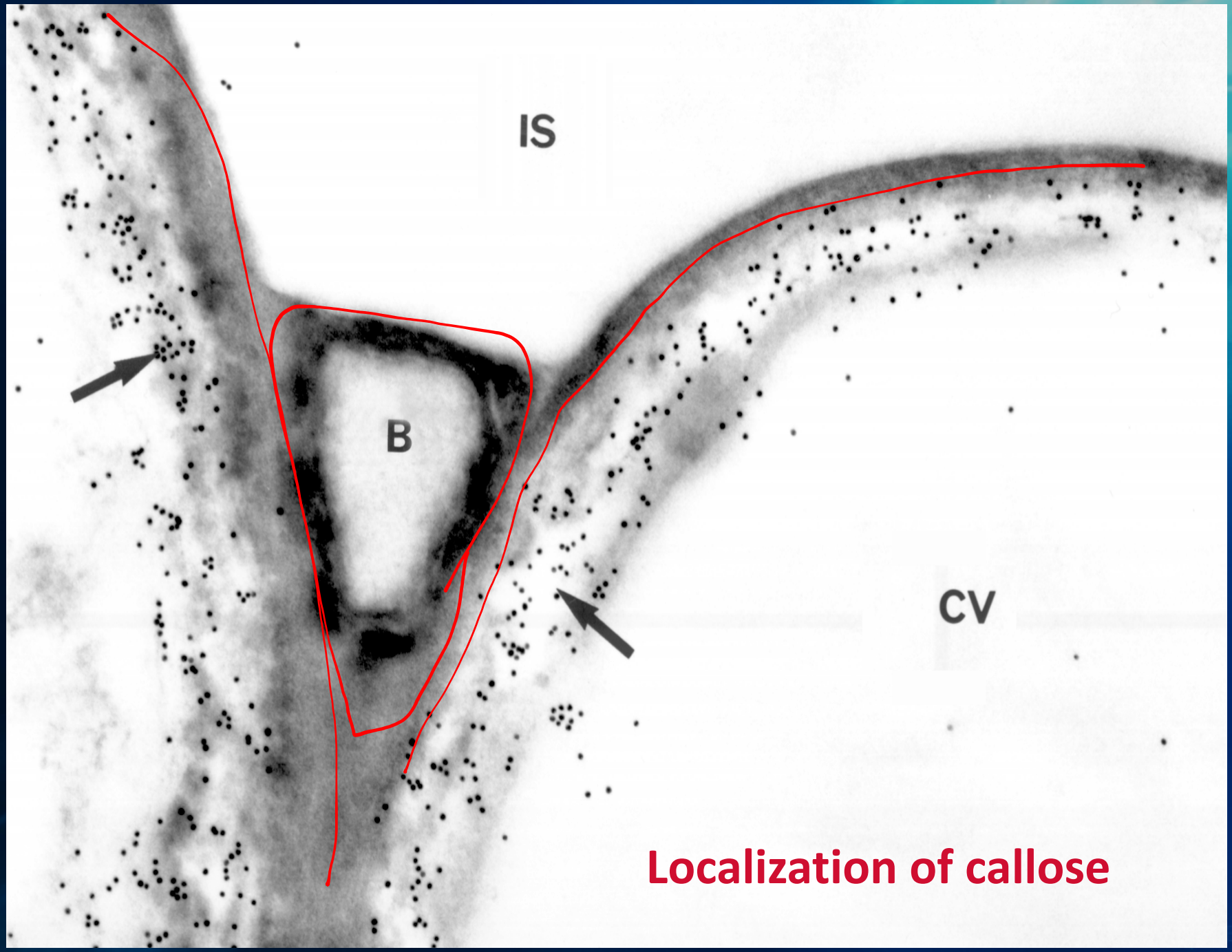


(β)

Εικόνα 4.10 Ηλεκτρονιακά μικρογραφήματα βακτηριακών κυττάρων που έχουν ληφθεί (*α*) με ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο διέλευσης και (*β*) με ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης. (*α*) Λεπτή τομή ενός τυπικού θετικού κατά Gram βακτηρίου, του *Bacillus subtilis*. Το κύτταρο έχει μόλις διαιρεθεί, και δύο δομές που περικλείονται από μεμβράνη είναι προσκολλημένες στο διαφραγματικό τοίχωμα. Παρατηρήστε τη φωτεινότερη περιοχή στο μέσον (DNA ή *πυρηνοειδές*). Διάμετρος κυττάρου: περί τα 0,8 μm. (*β*) Κύτταρα του φωτοτροφικού βακτηρίου *Rhodovibrio sodomensis*. Πλάτος ενός κυττάρου: περί τα 0,75 μm. Παρατηρήστε ότι η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία σάρωσης επιτρέπει μεγάλο βάθος πεδίου, που παρέχει εξαιρετική ποιότητα τριδιάστατης απεικόνισης.

Compatible or susceptible interaction

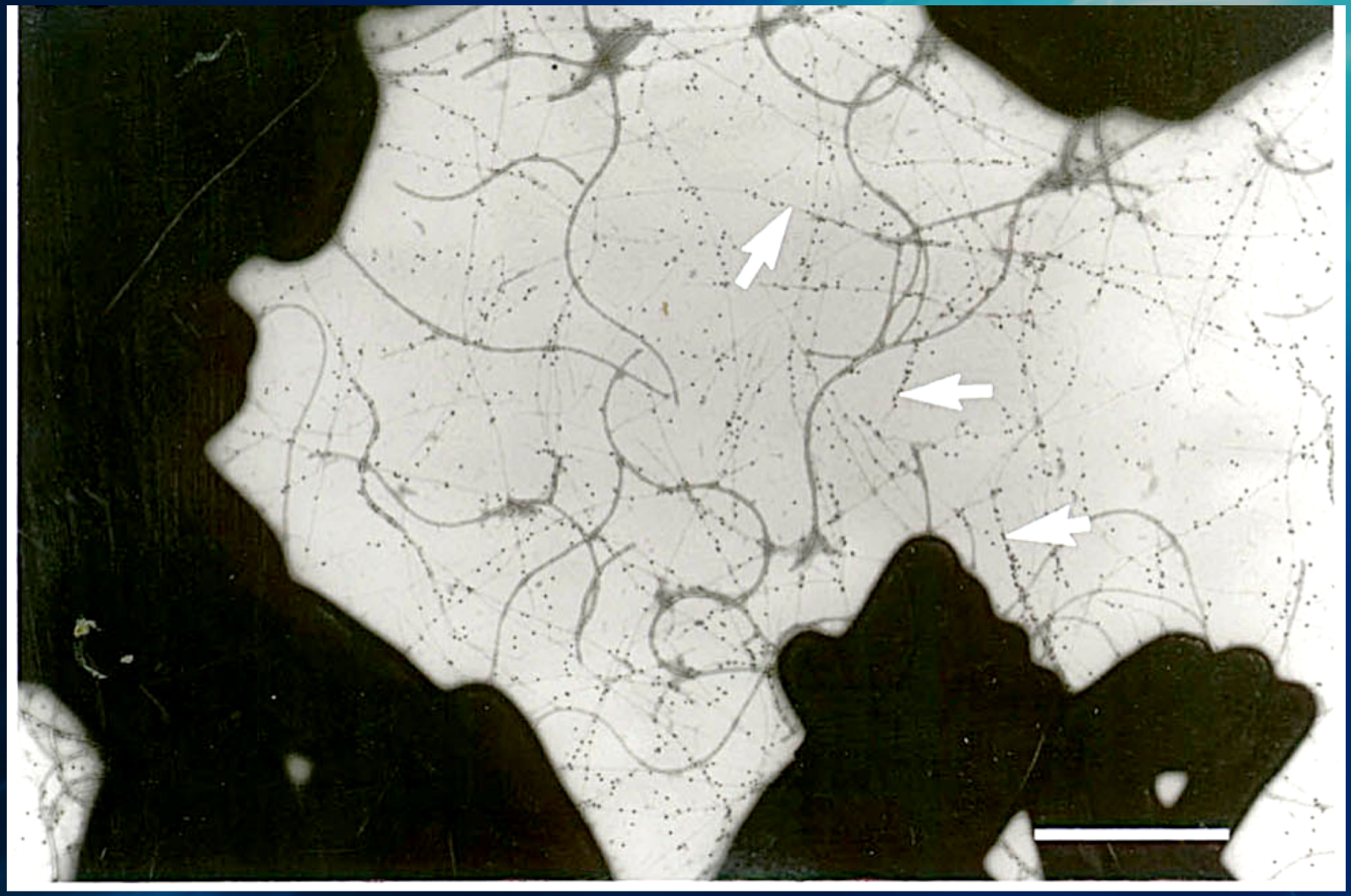
- Bacteria form large colonies in the intercellular spaces.
- Early in the infection there is no clear plant response
- Resistance is suppressed.



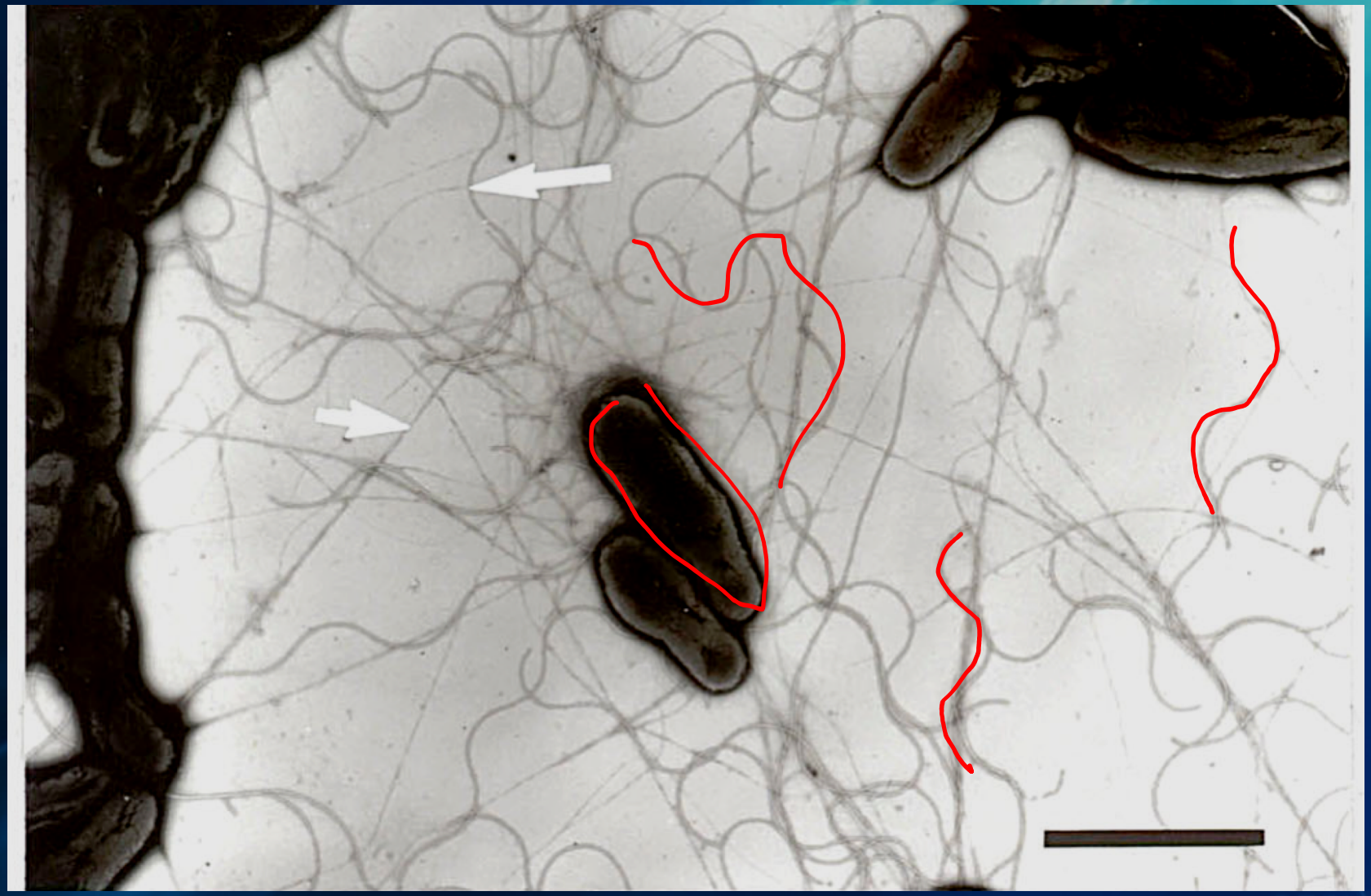
Localization of callose

The hypersensitive reaction – cell death

The Hrp pilus (arrows) is strongly labelled with antibodies to HrpA



Flagella and straight appendages produced by a HrpA mutant

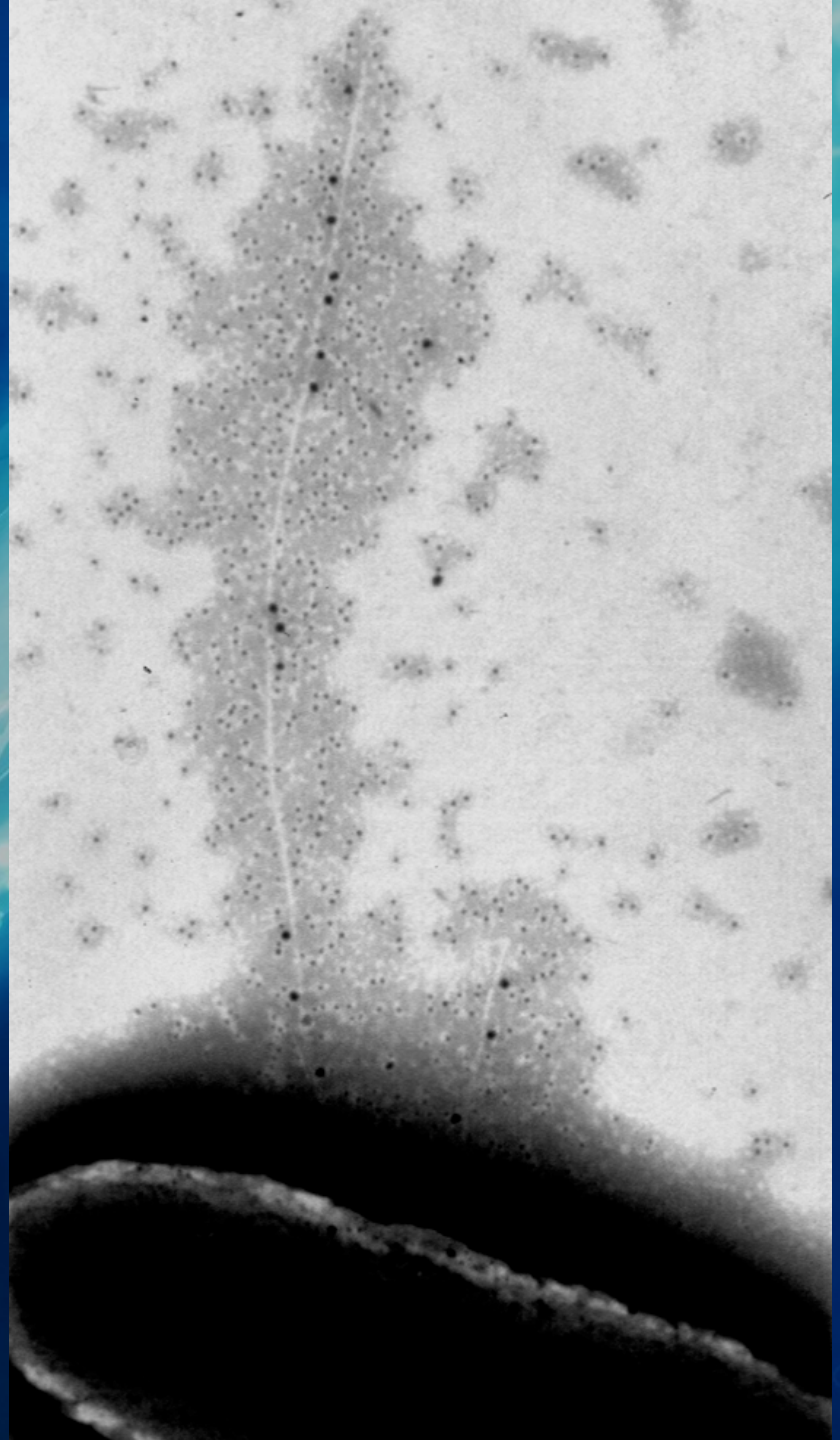


Pilus formation

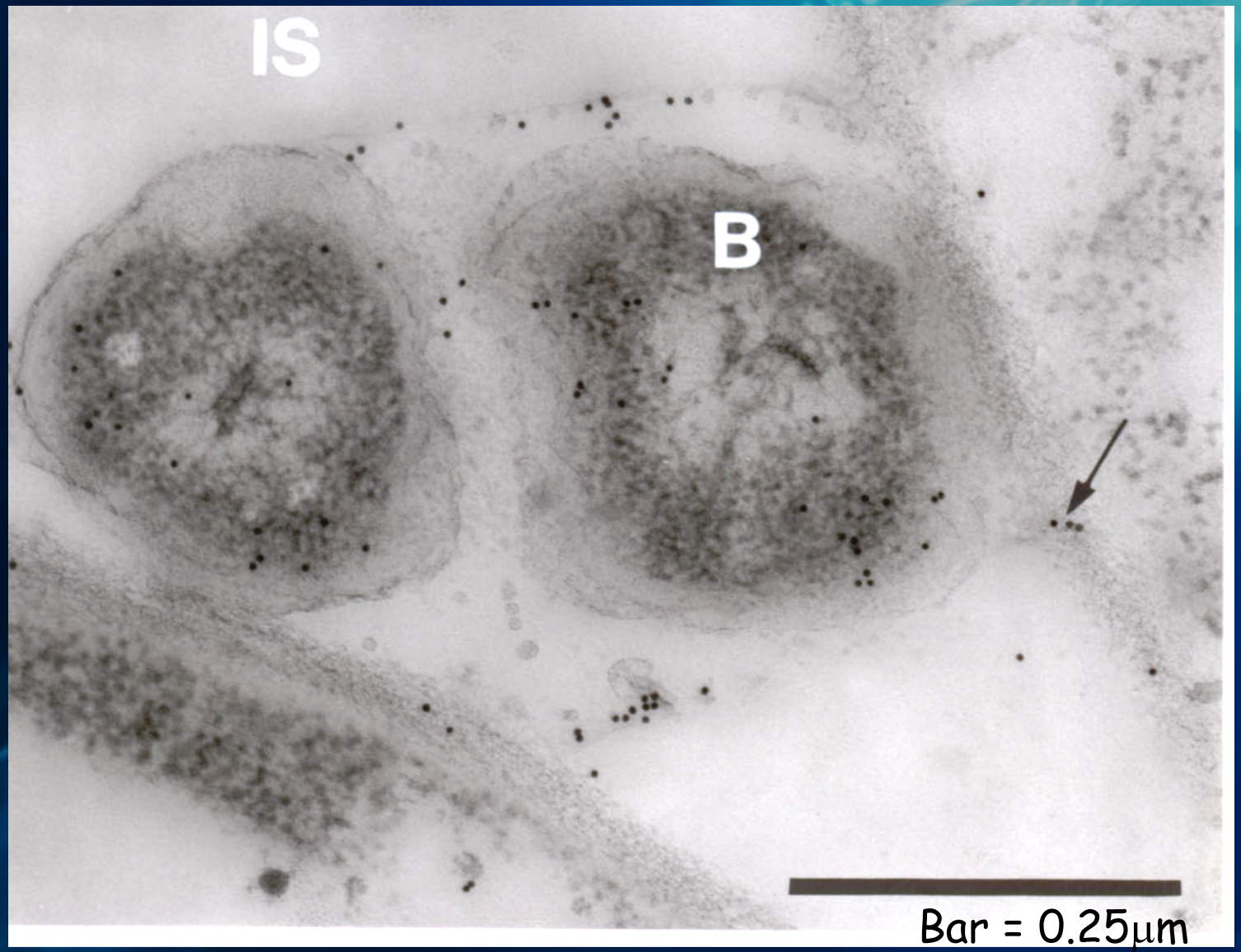
The appendage grows rapidly from the bacterial surface and is coated with HrpZ (small gold label).

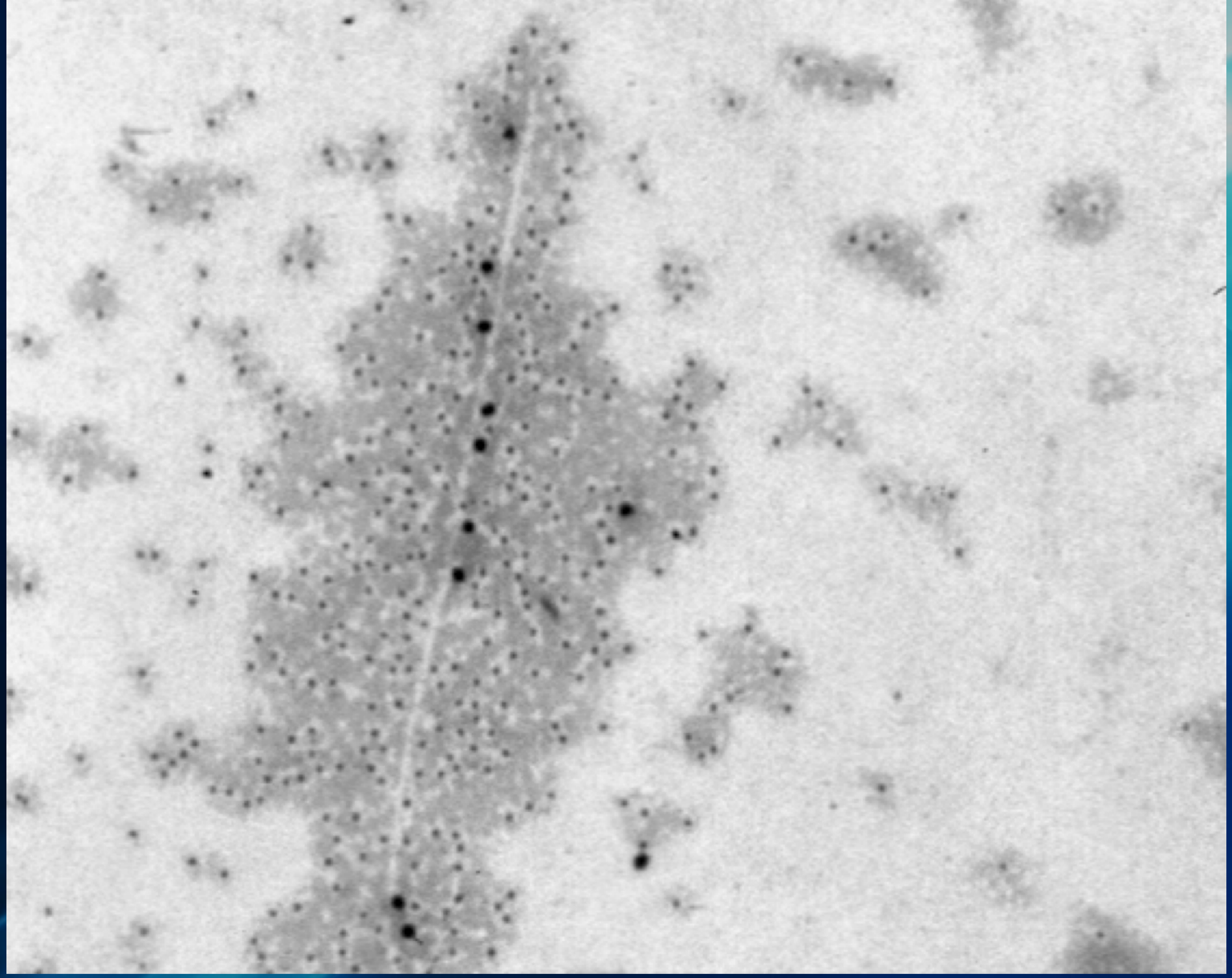
The pilus subunit is HrpA (large gold label).

Immunocytochemistry identifies protein components



Immunogold label shows tracks of HrpZ (arrow) crossing the plant cell wall from the bacterium (B) in the intercellular space (IS)

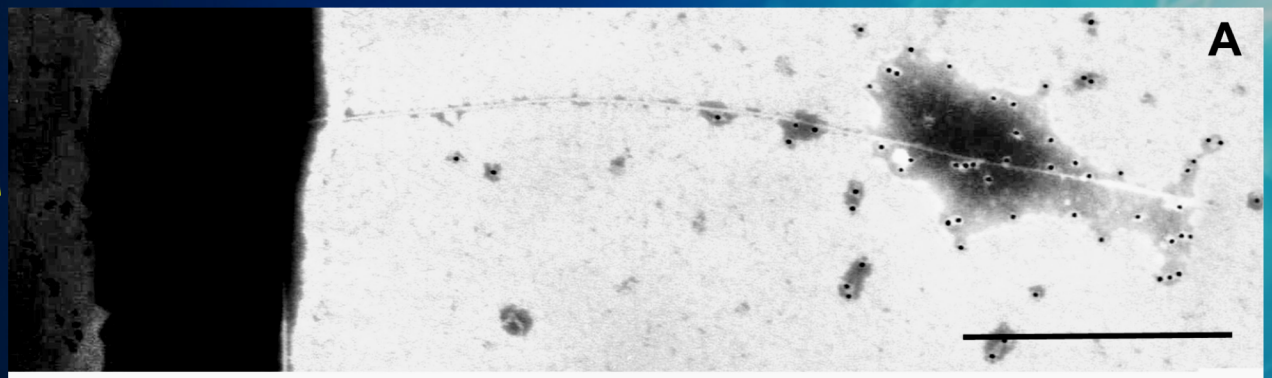




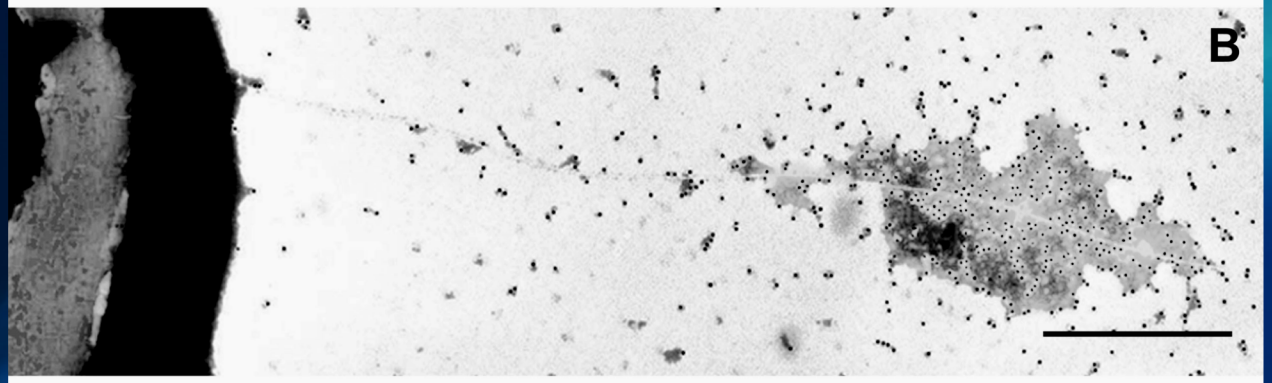
Location of HrpZ (small gold label) along the pilus made of HrpA (large gold)

Secretion of HrpZ from the pilus tip

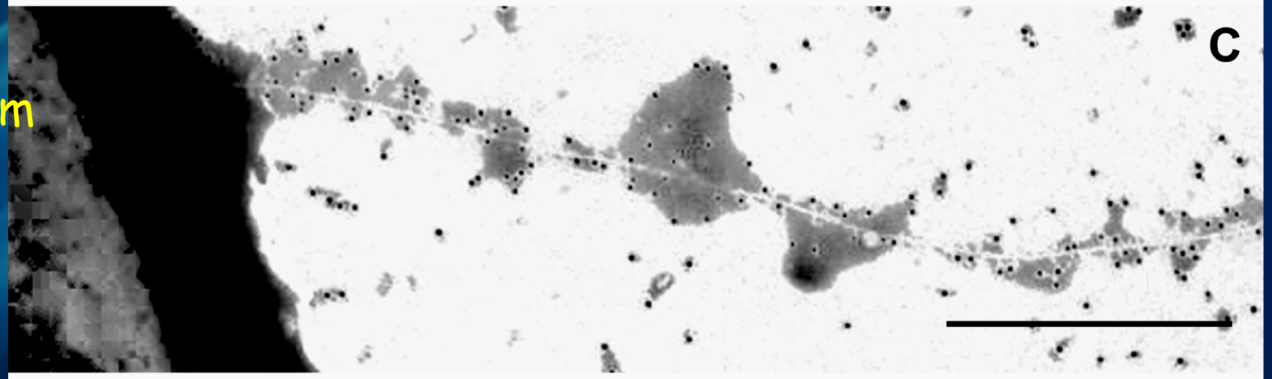
30min



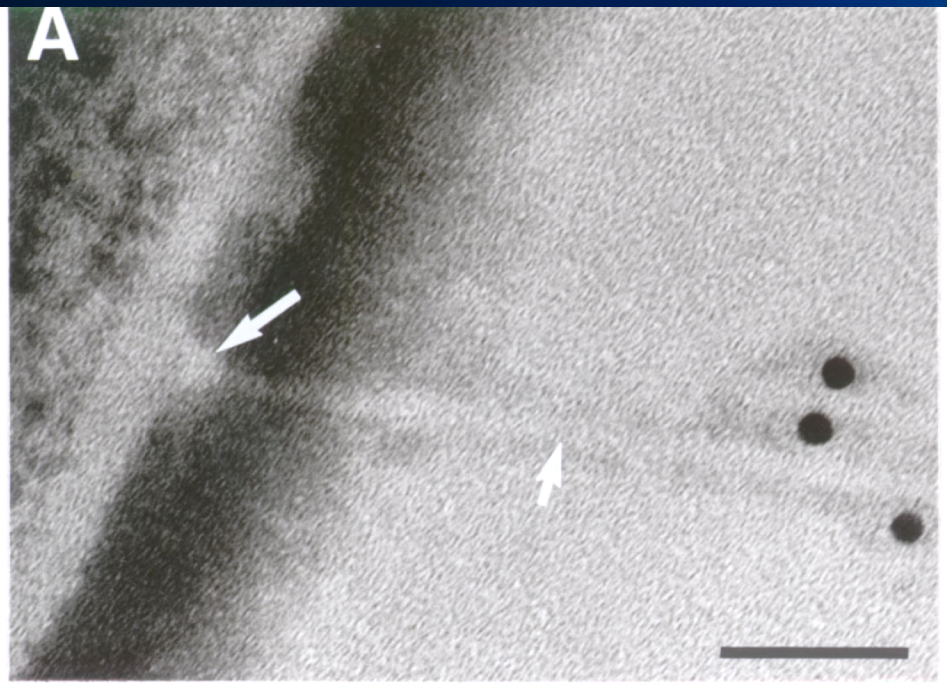
60min after induction

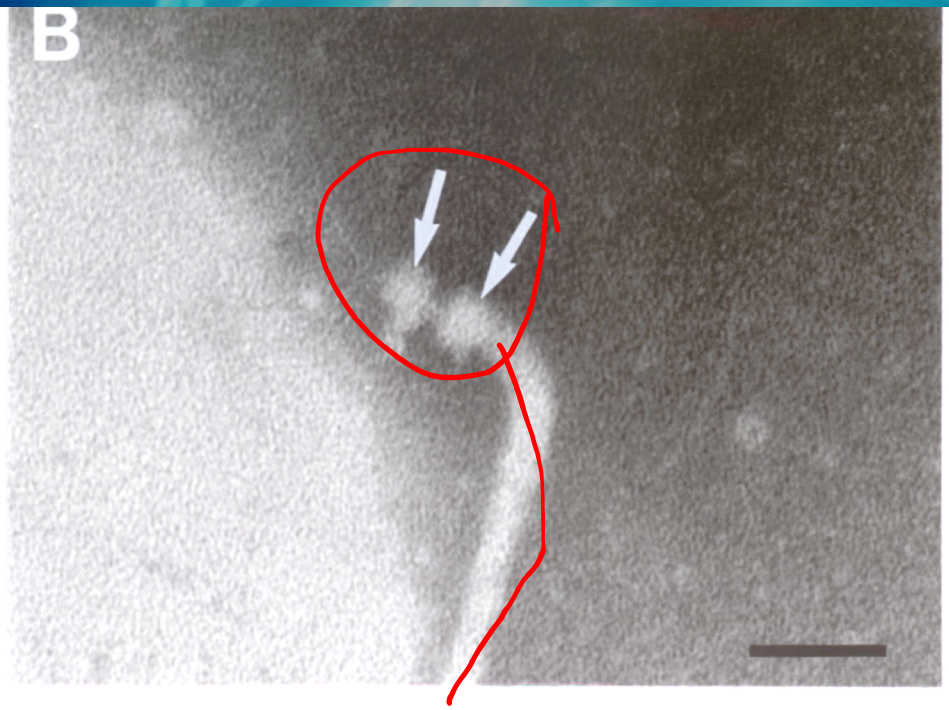


Induction from the start



Basal structures associated with appendages

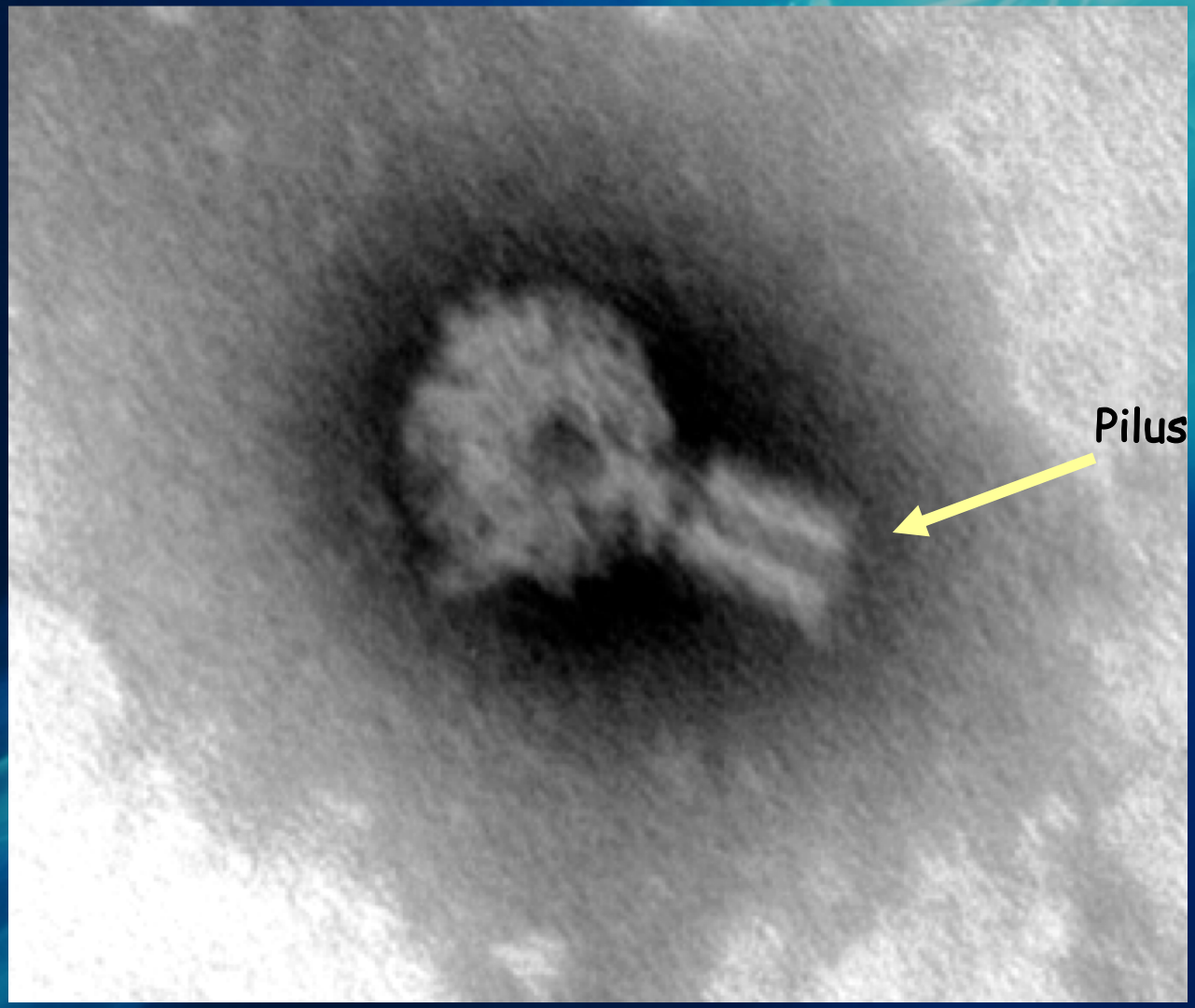


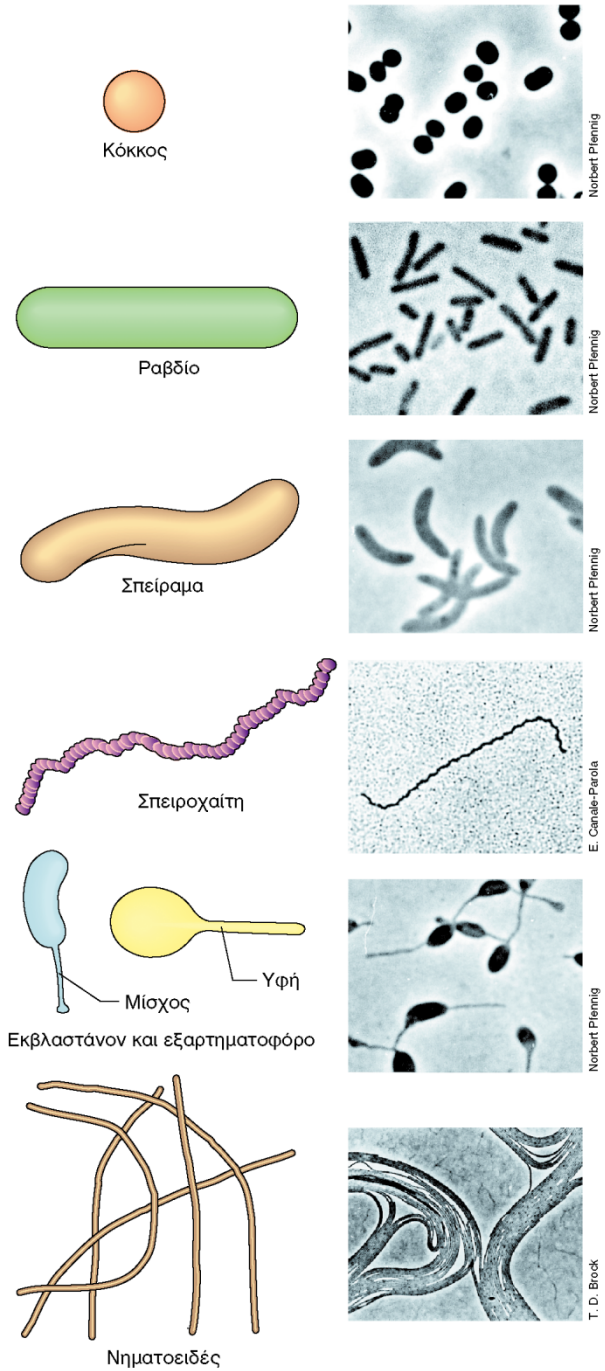


Hrp pilus (gold label to HrpA)

Flagellum

Basal body of the type III secretion system from Pseudomonas syringae

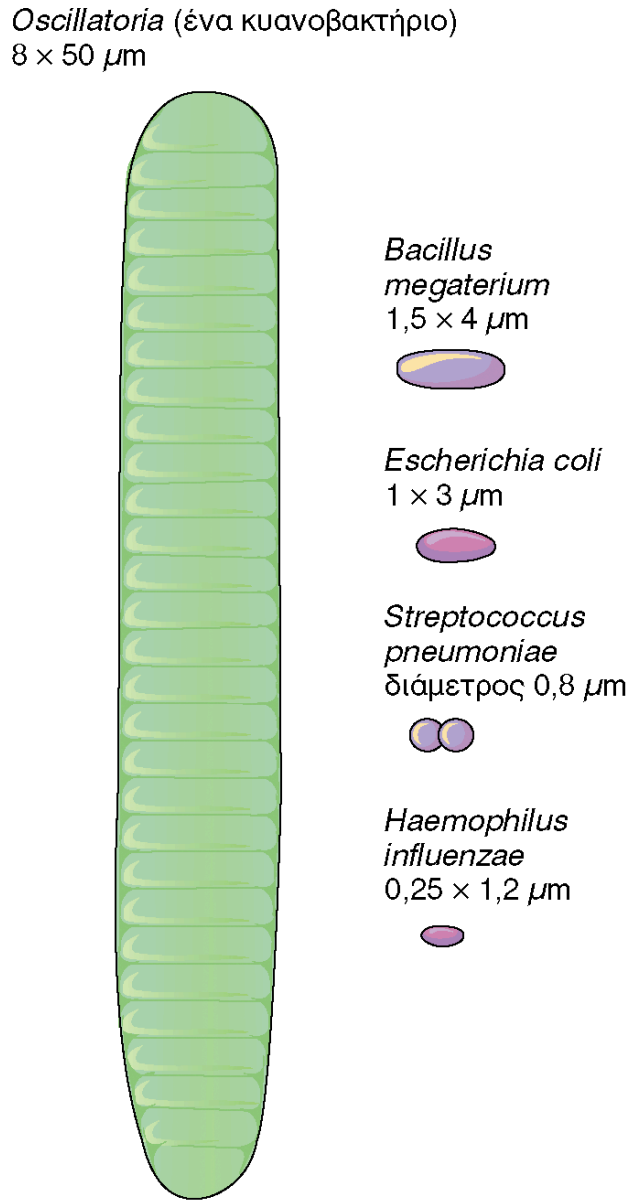




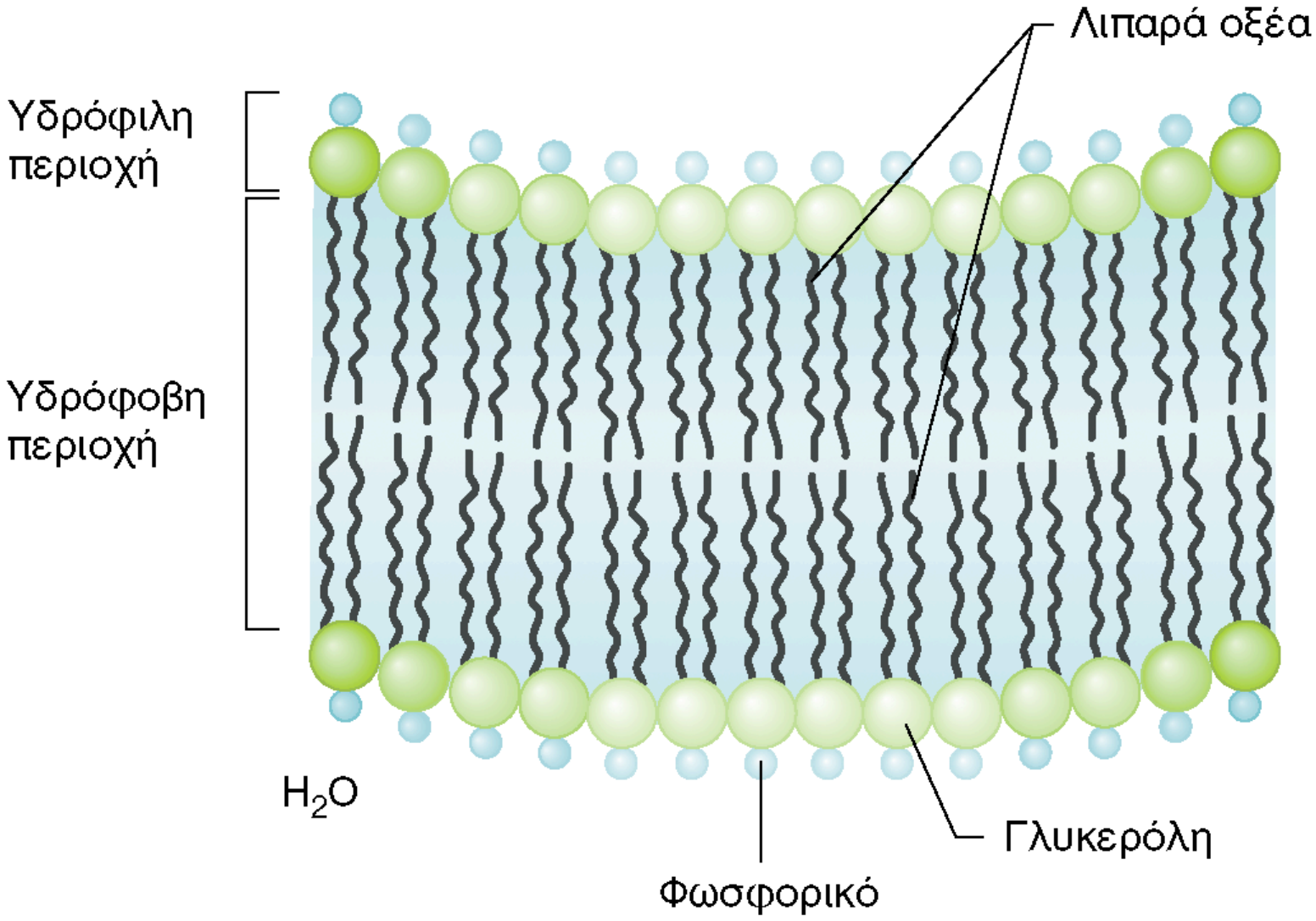
Εικόνα 4.11 Αντιπροσωπευτικά κυτταρικά σχήματα (μορφολογίες) προκαρυωτικών οργανισμών. Παρατίθενται διαγράμματα (αριστερά) και χαρακτηριστικές μικροφωτογραφίες (δεξιά). Οι οργανισμοί είναι: κόκκος, *Thiocapsa roseopersicina* (διάμετρος κυττάρου: 1,5 μm)· ραβδίο, *Desulfuromonas acetoxidans* (διάμετρος: 1 μm)· σπείραμα, *Rhodospirillum rubrum* (διάμετρος: 1 μm)· σπειροχαίτη, *Spirochaeta stenostrepta* (διάμετρος: 0,25 μm)· εκβλαστάνον και εξαρτηματοφόρο, *Rhodomicrobium vannielii* (διάμετρος: 1,2 μm)· νηματοειδές, *Chloroflexus aurantiacus* (διάμετρος: 0,8 μm).

Esther R. Angert, Harvard University

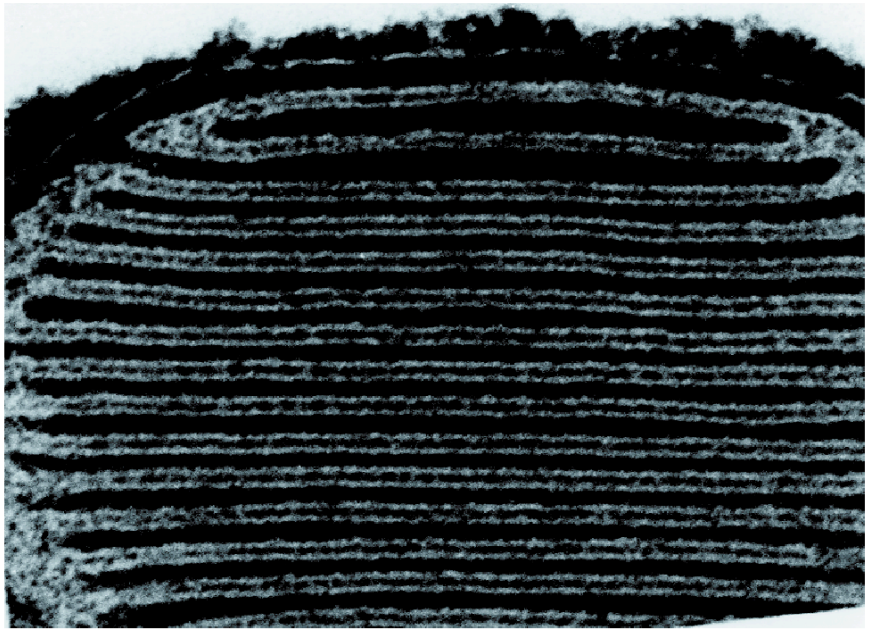
Εικόνα 4.12 Μικροφωτογραφία σκοτεινού πεδίου ενός γιγαντιαίου προκαρυώτη, του ιχθυοσυμβιώτη *Epulopiscium fishelsoni*. Το ραβδόσχημο κύτταρο *E. fishelsoni* έχει μήκος περί τα 600 μm (0,6 mm) και εμφανίζεται στη μικροφωτογραφία αυτή μαζί με 4 κύτταρα του πρωτοζώου (ευκαρυώτη) *Paramecium* (τα κύτταρα του *Paramecium* έχουν μήκος περί τα 150 μm). Το *E. fishelsoni* ανήκει στα *Βακτήρια* και είναι είδος φυλογενετικά συγγενές προς τα είδη του γένους *Clostridium*.



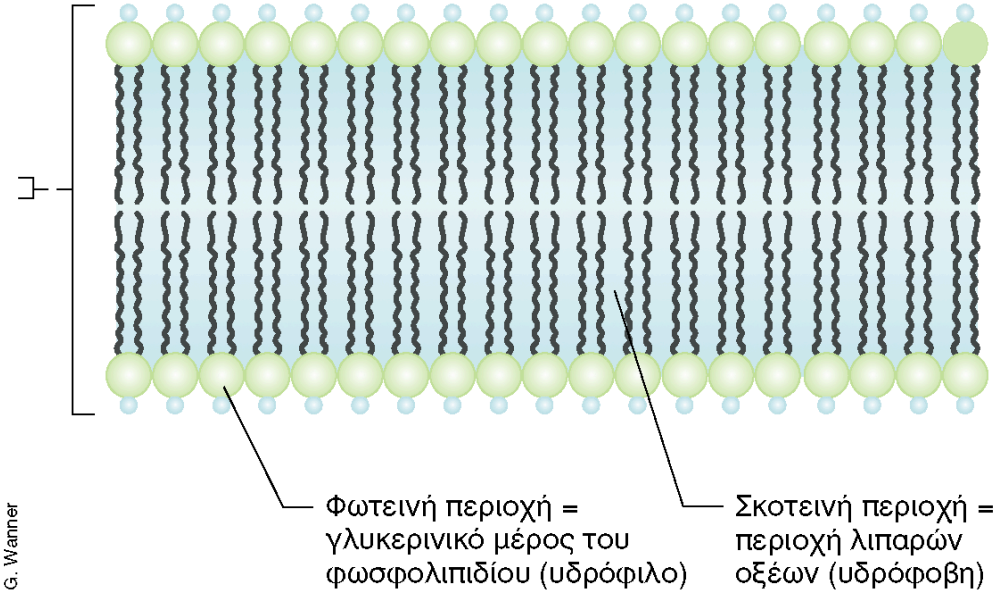
Εικόνα 4.13 Σύγκριση μεγέθους διαφόρων προκαρυωτών. Οι περισσότεροι από τους γνωστούς προκαρυώτες έχουν διάμετρο μεταξύ 0,5-2 μm.



Εικόνα 4.15 Δομή μιας διπλοστιβάδας φωσφολιπιδίων. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη έχει πλάτος περί τα 8 nm (80 Å).

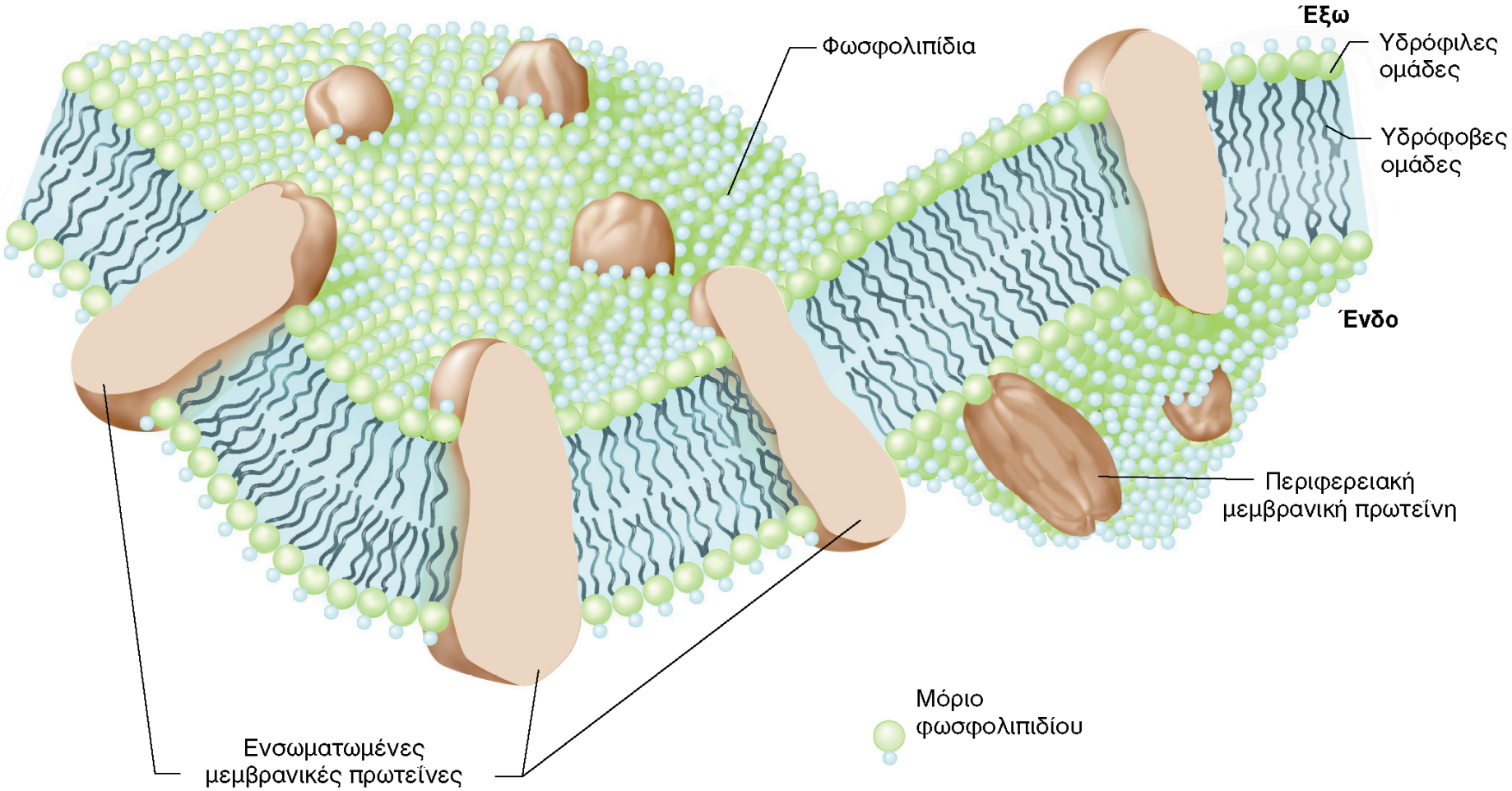


(α)

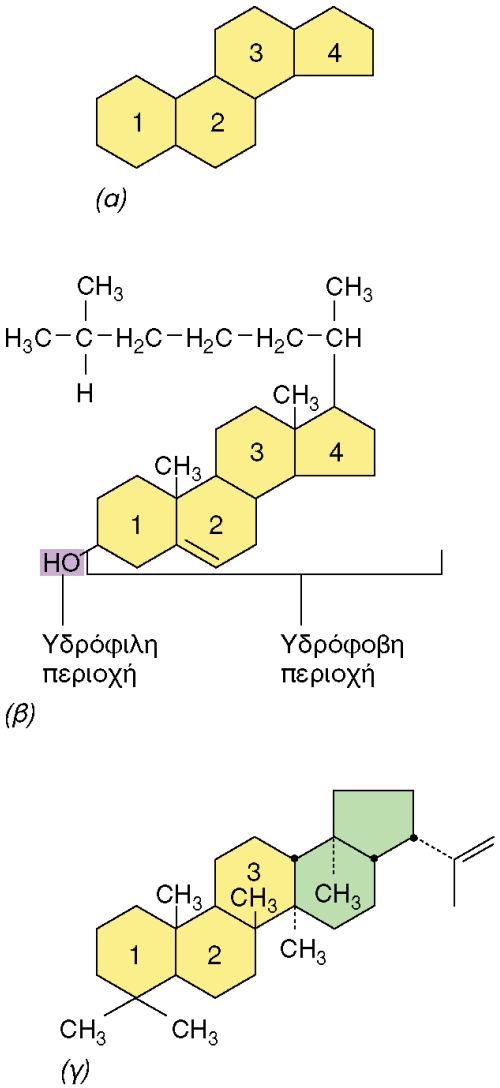


(β)

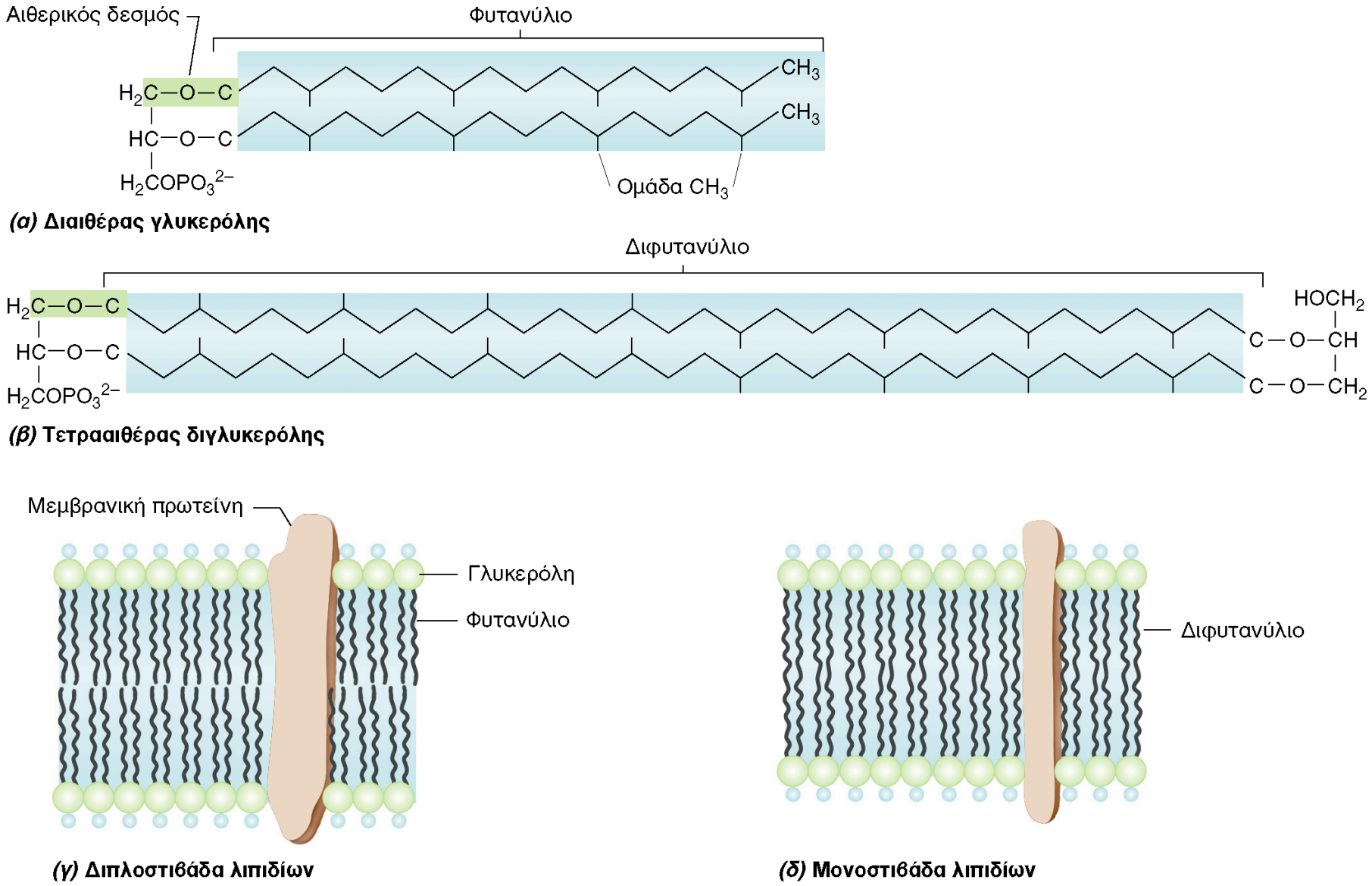
Εικόνα 4.16 Η κυτταροπλασματική μεμβράνη. (*α*) Ηλεκτρονιακό μικρογράφημα μεμβρανικών θυλακίων που προέρχονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φωτοτροφικού βακτηρίου *Halorhodospira halochloris*. Παρατηρήστε τις διακριτές διπλοστιβάδες λιπιδίων (στοιχειακές μεμβράνες). Πάχος διπλοστιβάδας: ~ 8 nm. (*β*) Σχηματική εικόνα μιας στοιχειακής μεμβράνης του (*α*), υπό μεγέθυνση.



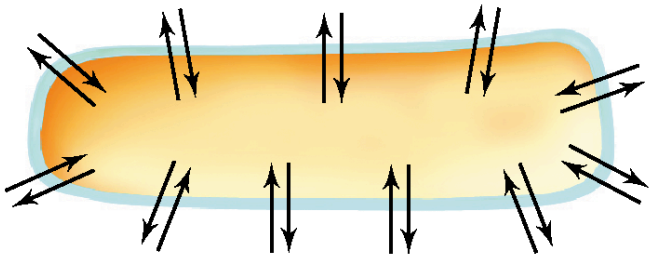
Εικόνα 4.17 Διάγραμμα δομής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η εσωτερική επιφάνεια (Ένδο) στρέφεται προς το κυτταρόπλασμα και η εξωτερική επιφάνεια (Έξω) προς το περιβάλλον. Ο θαλλός της στοιχειακής μεμβράνης αποτελείται από φωσφολιπίδια, με τις υδρόφοβες ομάδες να κατευθύνονται προς το εσωτερικό και τις υδρόφιλες προς το εξωτερικό, όπου επικοινωνούν με μόρια νερού. Ενσωματωμένες στον θαλλό της μεμβράνης είναι πρωτεΐνες με σημαντικά υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή. Στις υδρόφιλες επιφάνειες της μεμβράνης μπορούν να προσαρτώνται υδρόφιλες πρωτεΐνες και άλλες πολικές ή και φορτισμένες ουσίες, όπως ιόντα μετάλλων. Πέρα από κάποιες χημικές διαφοροποιήσεις, η γενική δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι όμοια τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (σημειώστε, ωστόσο, την εξαίρεση που αναφέρεται στην Εικόνα 4.20*δ*).



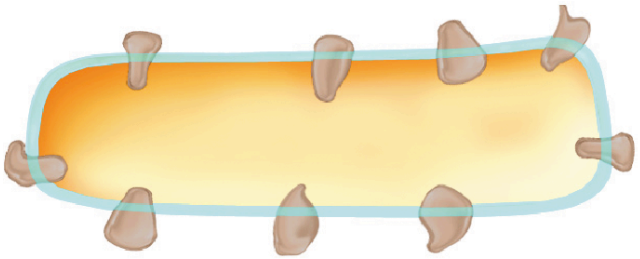
Εικόνα 4.18 Στερόλες και οπανοειδή. (*α*) Η γενική δομή μιας στερόλης. Όλες οι στερόλες περιέχουν τους ίδιους τέσσερις δακτυλίους: 1, 2, 3, και 4. (*β*) Η δομή της χοληστερόλης. (*γ*) Η δομή του οπανοειδούς διπλοπτενίου. Προσέξτε τη δομική ομοιότητα μεταξύ χοληστερόλης και διπλοπτενίου στους δακτυλίους 1 έως 3. Στερόλες απαντούν στις μεμβράνες των ευκαρυωτών και οπανοειδή στις μεμβράνες ορισμένων προκαρυωτών.



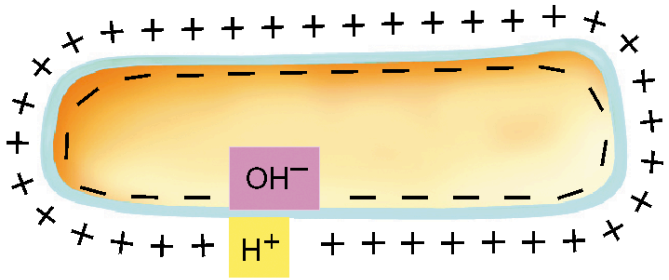
Εικόνα 4.20 Κύρια λιπίδια των *Αρχαίων* και δομή των μεμβρανών των *Αρχαίων*. (*α*) Διαιθέρες γλυκερόλης. (*β*) Τετρααιθέρες διγλυκερόλης. Παρατηρήστε ότι, και στις δύο περιπτώσεις, ο υδρογονάνθρακας προσδένεται στη γλυκερόλη μέσω *αιθερικών* δεσμών. Ο υδρογονάνθρακας είναι φυτανύλιο (C_{20}) στο (*α*) και διφυτανύλιο (C_{40}) στο (*β*). (*γ*, *δ*) Δομή των μεμβρανών των *Αρχαίων*. (*γ*) Διπλοστιβάδα λιπιδίων. (*δ*) Μονοστιβάδα λιπιδίων.



Φραγμός διαπερατότητας — Εμποδίζει τη διαρροή και λειτουργεί ως δίοδος μεταφοράς θρεπτικών ουσιών από και προς το εσωτερικό του κυττάρου

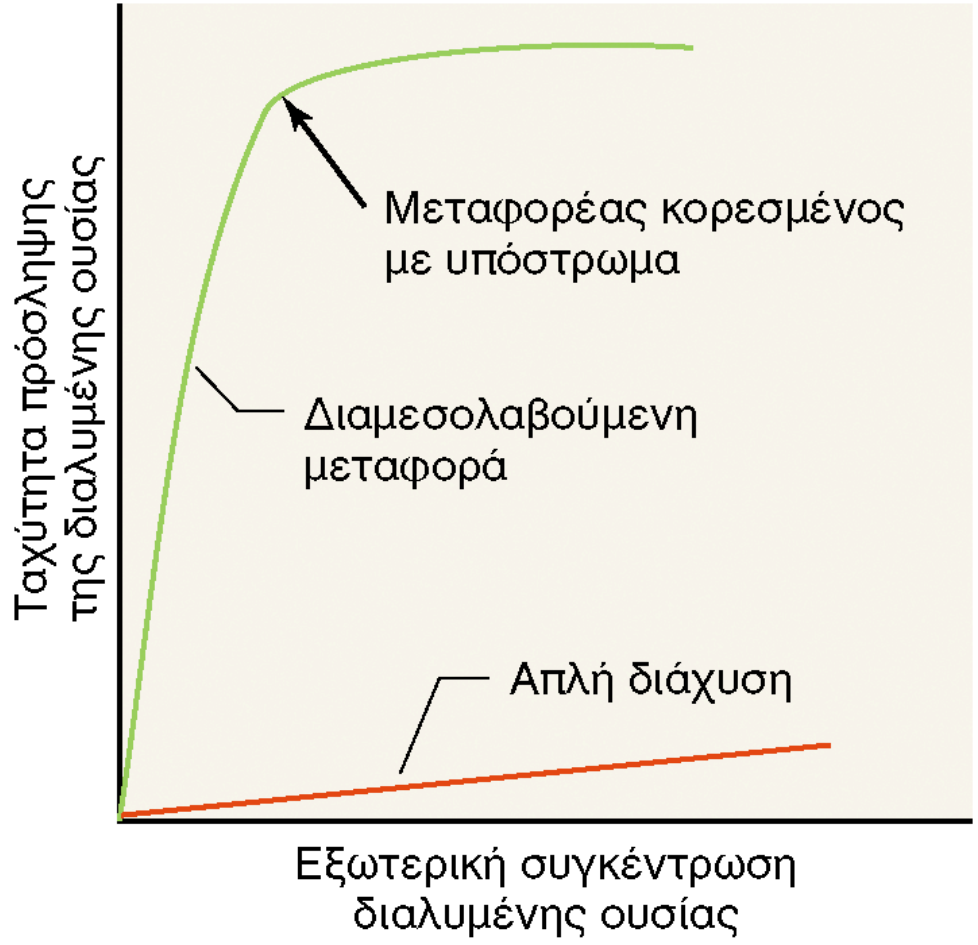


Δέσμευση πρωτεϊνών — Θέση εντοπισμού πολλών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε λειτουργίες μεταφοράς, βιοενεργειακές δράσεις, και χημειοτακτισμό

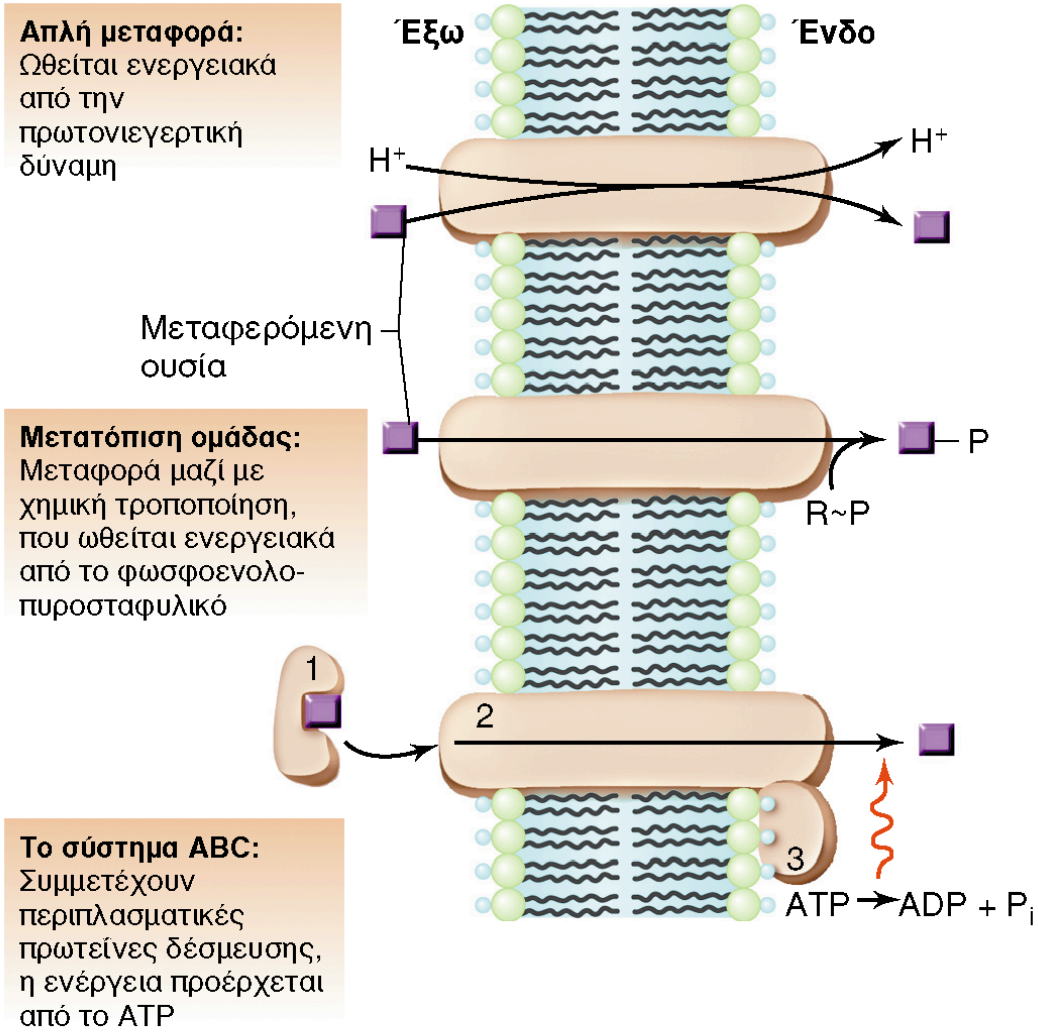


Διατήρηση ενέργειας — Θέση όπου αναπτύσσεται και δρα η πρωτονιεγερτική δύναμη

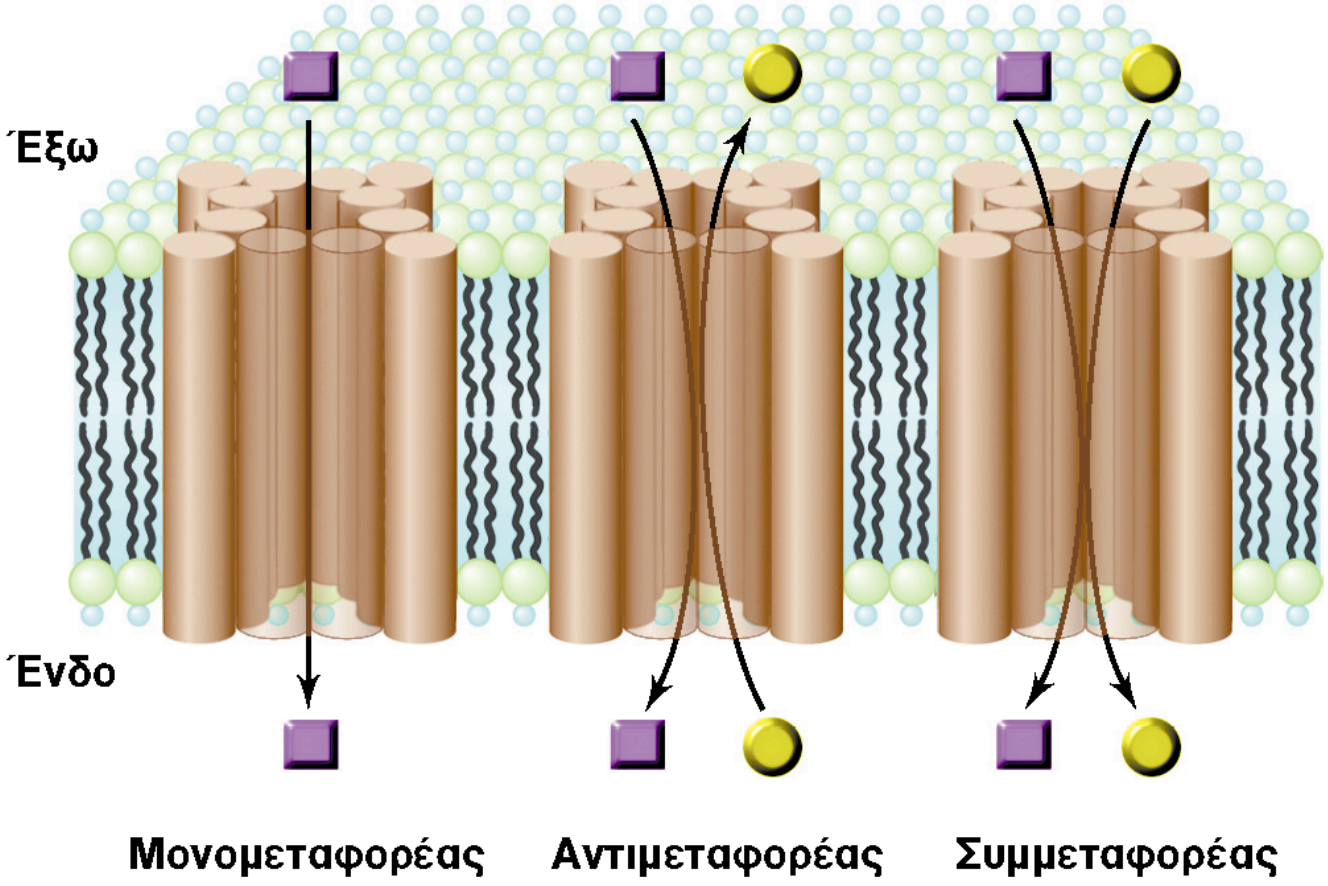
Εικόνα 4.21 Οι κύριες λειτουργίες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.



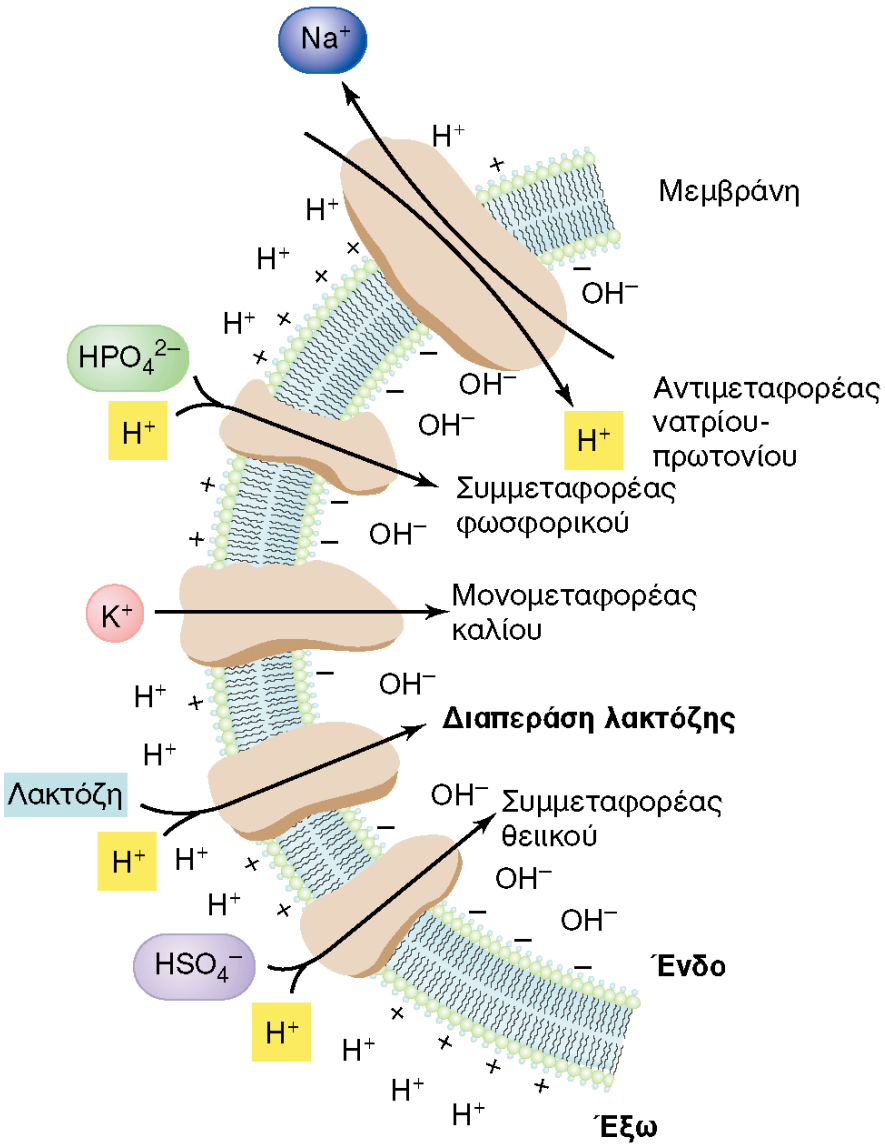
Εικόνα 4.22 Σχέση ταχύτητας πρόσληψης και εξωτερικής συγκέντρωσης στις διεργασίες της απλής διάχυσης και της διαμεσολαβούμενης μεταφοράς. Σημειώστε ότι στην περίπτωση της διαμεσολαβούμενης μεταφοράς η ταχύτητα πρόσληψης εμφανίζει κορεσμό σε σχετικά χαμηλές τιμές εξωτερικής συγκέντρωσης.



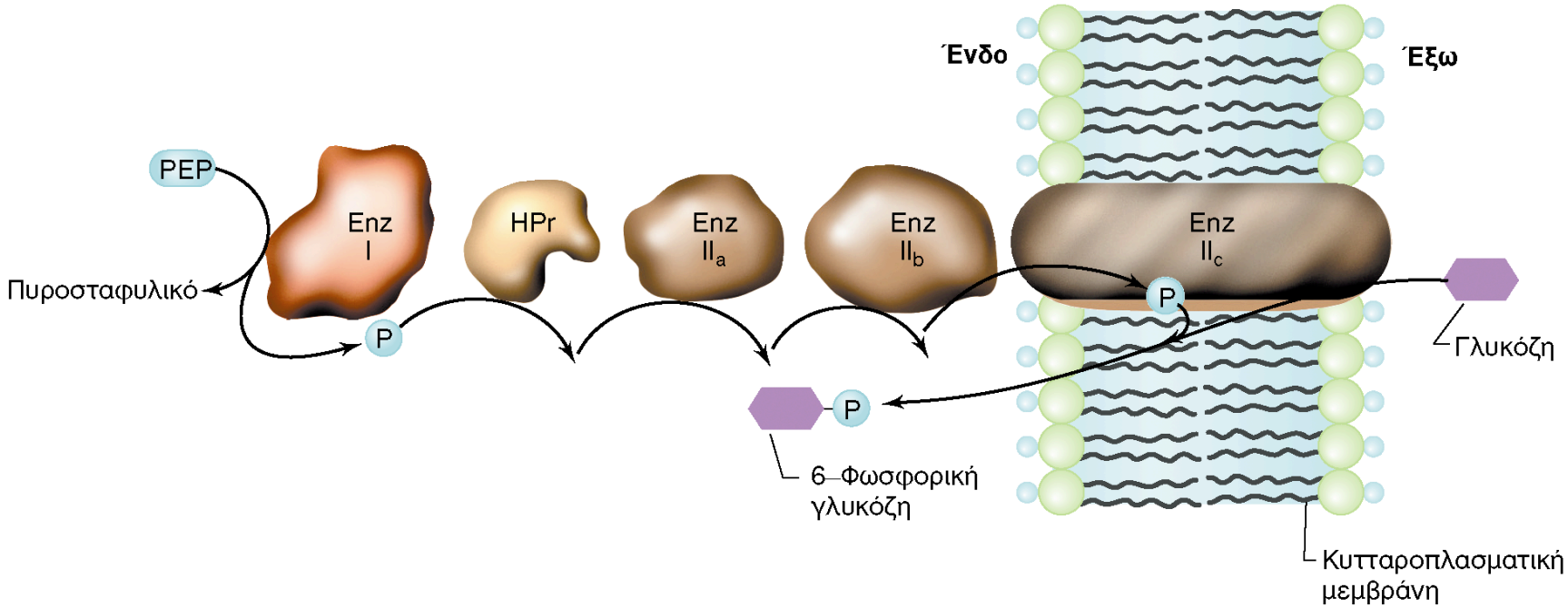
Εικόνα 4.23 Οι τρεις τύποι διαμεμβρανικών συστημάτων μεταφοράς. Προσέξτε ότι οι απλοί μεταφορείς και το σύστημα μεταφοράς ABC μεταφέρουν *χωρίς* να τροποποιούν χημικώς τα υποστρώματά τους, ενώ η μετατόπιση ομάδας οδηγεί σε μεταφορά και, συγχρόνως, σε χημική τροποποίηση (φωσφορυλίωση) της μεταφερόμενης ουσίας.



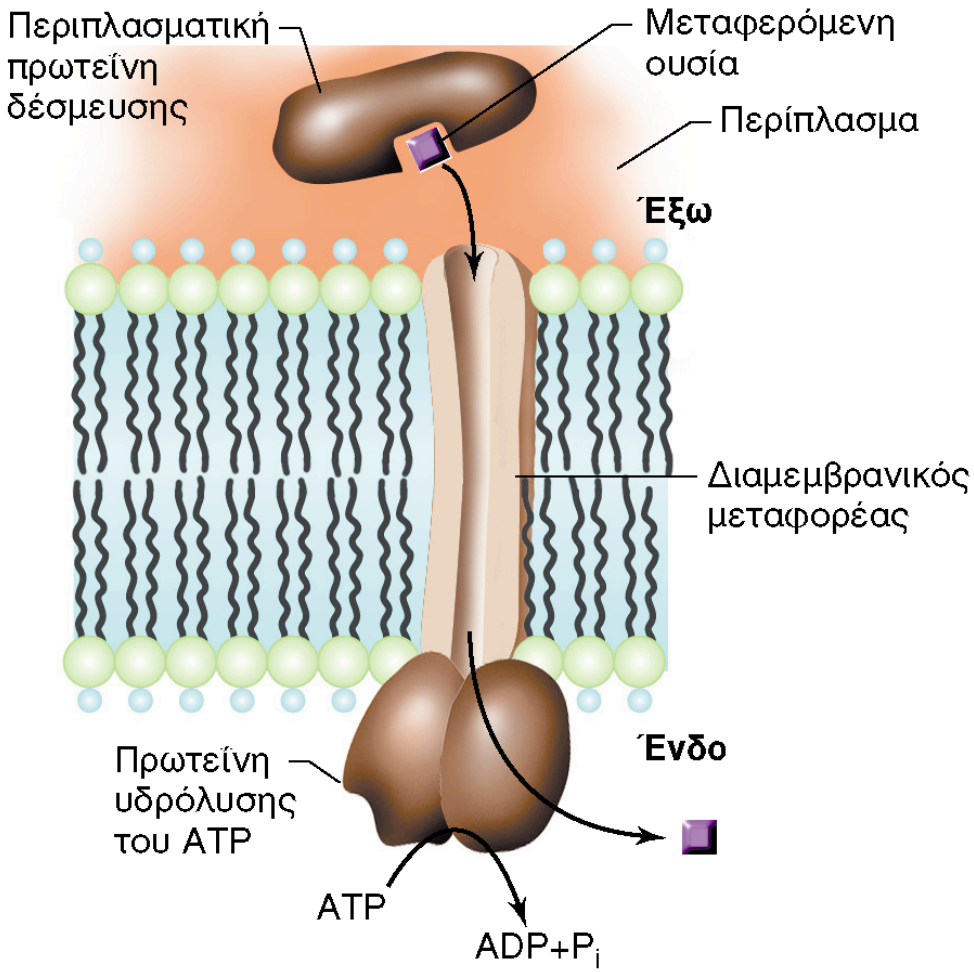
Εικόνα 4.24 Δομή διαμεμβρανικών μεταφορέων και τύποι μεταφοράς. Στους προκαρυώτες, οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς τυπικά περιέχουν 12 *α*-έλικες που διαμορφώνουν μια δίοδο (κανάλι) διά μέσου της μεμβράνης. Απεικονίζονται οι τρεις διαφορετικοί τύποι μεταφορέων. Για τους αντιμεταφορείς και τους συμμεταφορείς, το αντιμεταφερόμενο ή συμμεταφερόμενο –αντίστοιχα– μόριο παρουσιάζεται με κίτρινο χρώμα.



Εικόνα 4.25 Λειτουργία της διαπεράσης λακτόζης (ενός συμμεταφορέα) της *Escherichia coli*, και άλλων γνωστών απλών μεταφορέων. Η δομή αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών αποδίδεται απλουστευτικά με μορφή σφαιρίνης, αλλά στην πραγματικότητα είναι όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 4.24.



Εικόνα 4.26 Μηχανισμός του συστήματος της φωσφοτρανσφεράσης της *Escherichia coli*. Όσον αφορά την πρόσληψη γλυκόζης, το σύστημα συνίσταται από 5 πρωτεΐνες: Ένζυμο (Enz) I· ένζυμα II_a, II_b, και II_c· και πρωτεΐνη HPr. Μια φωσφορική ομάδα μεταφέρεται διαδοχικά από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) προς τη σειρά των πρωτεϊνών I, HPr, II_a, II_b, για να καταλήξει στην II_c, που είναι αυτή η οποία μεταφέρει (και φωσφορυλιώνει) το σάκχαρο.



Εικόνα 4.27 Μηχανισμός ενός μεταφορέα ABC (κασέτας δέσμευσης ATP). Η περιπλασματική πρωτεΐνη δέσμευσης έχει υψηλή συγγένεια προς το υπόστρωμα, κανάλι μεταφοράς είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη, ενώ την ενέργεια που απαιτεί το έργο της μεταφοράς παρέχει η πρωτεΐνη υδρόλυσης του ATP. Παράδειγμα συστήματος μεταφοράς ABC είναι ο μεταφορέας μαλτόζης της *Escherichia coli*.