

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου &
Ανάπτυξης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



Γ. Δ. Αγγελής
Καθηγητής Μικροβιολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ
I. Εισαγωγή	3
II. Γενικές οδηγίες προς τους φοιτητές	3
III. Άσκηση 1: Παρασκευή θρεπτικών υλικών.....	5
IV. Άσκηση 2: Οι διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών. Μακροσκοπικές παρατηρήσεις αποικιών και μικροσκόπηση μικροβιακών κυττάρων.....	9
V. Άσκηση 3: Απομόνωση καθαρών καλλιεργειών.....	12
VI. Άσκηση 4: Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και η χρώση Gram.....	15
VII. Άσκηση 5: Το βακτηριακό ενδοσπόριο. Απομόνωση σποριογόνων βακτηρίων από το περιβάλλον.....	18
VIII. Άσκηση 6: Ευαισθησία των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	21
IX. Άσκηση 7: Φύλο Zygomycota: μορφολογία μυκηλίου, βιολογικός κύκλος.....	24
X. Άσκηση 8: Φύλο Ascomycota: μορφολογία μυκηλίου, βιολογικός κύκλος.....	27
XI. Άσκηση 9: Φύλο Basidiomycota: μορφολογία μυκηλίου, βιολογικός κύκλος.....	30
XII. Άσκηση 10: Ζύμες και ζυμοειδή.....	34

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη της Μικροβιολογίας την τελευταία δεκαετία ήταν ραγδαία, η δε συνεισφορά της, τόσο στη βασική βιολογική έρευνα, όσο και στην εφαρμοσμένη έρευνα, στη βιομηχανία, στην ιατρική και στη γεωργία, σημαντική. Η παραγωγική δραστηριότητα πολλών βιομηχανιών (που ειδικεύονται στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές ή στην παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων, ποτών, φαρμάκων, καλλυντικών κ.ά. προϊόντων) και εταιριών που προσφέρουν τις υπηρεσίες τους στον τομέα του περιβάλλοντος (προστασία, βιοεξυγίανση, επεξεργασία αποβλήτων κλπ), στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό σε μικροβιακές διεργασίες. Η ανάγκη ειδίκευσης των Βιολόγων στη Μικροβιολογία είναι επομένως προφανής. Αναμένεται μάλιστα, η επαγγελματική ενασχόληση άρτια καταρτισμένων Μικροβιολόγων στους ανωτέρω παραγωγικούς κλάδους να ωθήσει την ανάπτυξη των κλάδων αυτών, προς όφελος της εθνικής μας οικονομίας.

Στα πλαίσια των ασκήσεων του μαθήματος «Μικροβιολογία» οι φοιτητές θα εξοικειωθούν με τις βασικές μικροβιολογικές τεχνικές (απομόνωση και καλλιέργεια μικροοργανισμών, μικροσκοπηση των διαφόρων κατηγοριών μικροοργανισμών), τη μορφολογία των μικροβιακών αποικιών (μακροσκοπικά), τη μορφολογία και την αναπαραγωγή των προκαρυωτικών (βακτηρίων) και ευκαρυωτικών (μυκήτων, ζυμών) κυττάρων. Κατά τη διάρκεια του εξαμήνου θα πραγματοποιηθούν 3 εισαγωγικές ασκήσεις (Παρασκευή θρεπτικών υλικών, Οι διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών, Απομόνωση καθαρών καλλιεργειών), 3 ασκήσεις βακτηριολογίας, 3 ασκήσεις μυκητολογίας και 1 άσκηση ζυμολογίας.

Οφείλουμε να επισημάνουμε ότι η εργαστηριακή εκπαίδευση δεν είναι αυτοτελής. Μάλιστα, πολύ λίγα μπορεί να προσφέρει στη μόρφωση των φοιτητών αν δε συνοδεύεται από συστηματική παρακολούθηση των μαθημάτων.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΦΟΙΤΗΤΕΣ

Η προετοιμασία της αίθουσας ασκήσεων, του εκπαιδευτικού υλικού (και ιδιαίτερα των καλλιεργειών) και των αντιδραστηρίων είναι εργασίες εξαιρετικά χρονοβόρες. Παρακαλούνται οι φοιτητές να βοηθήσουν στην καλή εκτέλεση των ασκήσεων.

Οι υποχρεώσεις των φοιτητών που θα παρακολουθήσουν τις εργαστηριακές ασκήσεις Μικροβιολογίας συνοψίζονται στη συνέχεια:

1) Οι φοιτητές οφείλουν να είναι συνεπείς στο ωρολόγιο πρόγραμμα που θα τους ανακοινωθεί και να παρακολουθούν τις ανακοινώσεις. Εργαστηριακές ασκήσεις που χάνονται για διάφορους λόγους είναι πρακτικά αδύνατον να αναπληρώνονται.

2) Λόγω του μεγάλου αριθμού των φοιτητών σε σχέση με την υπάρχουσα υποδομή οι φοιτητές θα χωριστούν σε ομάδες. Αλλαγές στις ομάδες δε γίνονται δεκτές γιατί αυτές επιφέρουν αναστάτωση στην εκπαιδευτική διαδικασία.

3) Φοιτητές που θα προσέρχονται στην αίθουσα των ασκήσεων καθυστερημένοι δε θα γίνονται δεκτοί γιατί αποσπούν την προσοχή του διδάσκοντα και των διδασκομένων και προκαλούν άσκοπη καθυστέρηση.

4) Ο κάθε φοιτητής οφείλει να καταλαμβάνει πάντα στην ίδια θέση, σε όλη τη διάρκεια του εξαμήνου, και να φροντίζει για την καθαριότητά της.

5) Ο κάθε φοιτητής οφείλει να διατηρεί τετράδιο εργαστηρίου. Σε αυτό θα σημειώνει τις παρατηρήσεις του σχετικά με την εκτέλεση των ασκήσεων και θα σχεδιάζει τα μικροσκοπικά παρασκευάσματα (μικροβιακά κύτταρα, καρποφορίες των μικροοργανισμών κλπ). Το τετράδιο με την εργασία του φοιτητή θα παραδίδεται στον υπεύθυνο των εργαστηριακών ασκήσεων 2 ημέρες μετά την άσκηση και θα παραλαμβάνεται διορθωμένο και βαθμολογημένο πριν την έναρξη της επόμενης άσκησης.

Το τετράδιο είναι σημαντικό για την εμπέδωση των ασκήσεων. Εκτός αυτού, ο φοιτητής μπορεί να το συμβουλευτεί κατά την τελική εξέταση. Ο τελικός βαθμός κάθε φοιτητή στις εργαστηριακές ασκήσεις θα είναι συνάρτηση της επίδοσής του κατά τη διάρκεια του εξαμήνου (συνεισφορά στον τελικό βαθμό 50%) και της επίδοσής του στην τελική εξέταση (συνεισφορά στον τελικό βαθμό 50%). Η επίδοση κατά τη διάρκεια του εξαμήνου θα αξιολογείται με βάση την επίδοσή του κατά τη διάρκεια των ασκήσεων (25%) και τη βαθμολόγηση των εργασιών (25%).

6) Η παρακολούθηση των εργαστηριακών ασκήσεων είναι υποχρεωτική από τους φοιτητές. Η κάθε άσκηση αντιστοιχεί σε ένα τμήμα της ύλης του μαθήματος «Μικροβιολογία» το οποίο οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν μελετήσει και κατανοήσει.

Οι εκπαιδευόμενοι φοιτητές θα πρέπει επίσης να έχουν υπόψη τους τα ακόλουθα **θέματα ασφάλειας**.

1) Αν και οι μικροοργανισμοί με τους οποίους θα εργαστείτε δεν είναι παθογόνοι θα πρέπει να εργάζεστε σύμφωνα με τις οδηγίες που θα σας δοθούν, προστατεύοντας τον εαυτό σας (και τις καλλιέργειες) από μολύνσεις. Ιδιαίτερα προσεκτικοί θα πρέπει να είστε όταν χρησιμοποιείτε λύχνο (φοράτε πάντα εργαστηριακή λευκή ποδιά με κουμπωμένα τα μανίκια, έχετε τα μαλλιά σας περιορισμένα στο πίσω μέρος της κεφαλής). Προσεκτικοί επίσης θα πρέπει να είστε με το χειρισμό του γυάλινου εξοπλισμού. Πιθανοί μικροτραυματισμοί θα πρέπει να αναφέρονται αμέσως στον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

2) Τα όργανα που θα χρησιμοποιήσετε (μικροσκόπια, ζυγοί) είναι ευαίσθητα και κοστίζουν ακριβά. Θα πρέπει να τα χειρίζεστε με ιδιαίτερη υπευθυνότητα, και σύμφωνα με τις οδηγίες που θα σας δίνονται κάθε φορά. Είναι απαραίτητα για την εκπαίδευση, τη δική σας και των συναδέλφων σας.

Θα πρέπει τέλος να τονιστεί ότι κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών ασκήσεων δεν είναι δυνατόν, να επαναλαμβάνεται η θεωρία που διδάσκεται στο μάθημα. Για τους λόγους αυτούς, οι φοιτητές που επιθυμούν να εκπαιδευτούν σωστά στο αντικείμενο της Μικροβιολογίας οφείλουν να παρακολουθούν ανελλιπώς τα μαθήματα της θεωρίας.

III. ΑΣΚΗΣΗ 1: Παρασκευή Θρεπτικών υλικών.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:255, 260, 263-272.

III.1. Εισαγωγή

Τα θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται στη Μικροβιολογία για την απομόνωση καθαρών καλλιεργειών (στελεχών) από μεικτούς μικροβιακούς πληθυσμούς, για την ανανέωση των καλλιεργειών των απομονωμένων στελεχών και για την καλλιέργεια των στελεχών προκειμένου αυτά να μελετηθούν.

Τα θρεπτικά υλικά μπορεί να είναι **υγρά** ή **στερεοποιημένα**. Η στερεοποίηση επιτυγχάνεται με την προσθήκη σε ένα υγρό θρεπτικό υλικό μιας στερεοποιητικής ουσίας, συνήθως **άγαρ** και σπανιότερα ζελατίνης, πολυπηκτικού ασβεστίου ή πυριτίου.

Το άγαρ είναι πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από μονάδες γαλακτόζης συνδεδεμένες με β(1-3) γλυκοζιτικούς δεσμούς στις γραμμικές περιοχές του μορίου και με α(1-4) δεσμούς στις διακλαδώσεις. Στο -OH του βου ατόμου C του μορίου της γαλακτόζης είναι εστεροποιημένο ένα θειικό ανιόν. Δεν περιέχει άζωτο και, εκτός ελάχιστων εξαιρέσεων, δεν υδρολύεται από τους μικροοργανισμούς. Το άγαρ συμμετέχει στη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων των ροδοφυκών απ' όπου παραλαμβάνεται με εκκύλιση. Συνήθως παραλαμβάνεται από τα είδη *Gelidium cartilagineum* και *Gracilaria confervoides*.

Όταν το άγαρ προστεθεί σε αναλογία 1,5-2% προκαλεί πήξη των θρεπτικών υλικών σε T<40 °C. Τα υλικά επανέρχονται σε ρευστή κατάσταση σε T=100 °C.

Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση τα θρεπτικά υλικά χαρακτηρίζονται ως **συνθετικά** ή **φυσικά**. Συνθετικά είναι τα θρεπτικά υλικά των οποίων η χημική σύσταση είναι πλήρως καθορισμένη (π.χ. διαλύματα αλάτων, βιταμινών και σακχάρων), ενώ φυσικά αυτά που παραλαμβάνονται από διάφορες φυσικές πηγές και επομένως η σύστασή τους δεν είναι πλήρως γνωστή ή καθορισμένη (π.χ. εκχυλίσματα φυτών ή κρέατος, γάλα, αίμα ζώων κλπ). Μερικά θρεπτικά υλικά χαρακτηρίζονται ως **ημι-συνθετικά**. Αυτά είναι συνθετικά υλικά στα οποία έχει προστεθεί, συνήθως σε μικρές ποσότητες, μια φυσική ουσία (πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης κλπ) ως πηγή αυξητικών παραγόντων.

Τα θρεπτικά υλικά μπορεί να είναι **γενικής χρήσης** ή **εκλεκτικά**. Τα γενικής χρήσης είναι κατάλληλα για την καλλιέργεια ενός μεγάλου αριθμού ειδών και χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των μικροοργανισμών από το φυσικό περιβάλλον. Υπάρχουν λ.χ. θρεπτικά υλικά γενικής χρήσης για μύκητες και ζύμες ή για βακτήρια. Εκλεκτικά είναι τα θρεπτικά υλικά που υποστηρίζουν την αύξηση ορισμένων μόνο μικροοργανισμών ή ομάδων μικροοργανισμών. Εάν, για παράδειγμα, επιθυμούμε να απομονώσουμε μικροοργανισμούς που υδρολύουν το άμυλο, θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό που να περιέχει ως αποκλειστική πηγή άνθρακα και ενέργειας άμυλο. Σε ένα τέτοιο θρεπτικό υλικό μπορούν να αναπτυχθούν (σε πρώτο τουλάχιστον στάδιο) μόνο μικροοργανισμοί που υδρολύουν το άμυλο.

Κάθε θρεπτικό υλικό πρέπει να περιέχει μια πηγή άνθρακα, μια πηγή αζώτου, ανόργανα άλατα, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες.

Αν και οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να μεταβολίζουν μια μεγάλη ποικιλία πηγών άνθρακα, **η γλυκόζη** είναι η πλέον «προσφιλής» πηγή

άνθρακα για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Άλλες πηγές άνθρακα είναι η φρουκτόζη, η σακχαρόζη, η μαλτόζη, η γαλακτόζη, το άμυλο, διάφορα λιπίδια κλπ. Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να μεταβολίζει κάποιες πηγές άνθρακα καθορίζεται από την ικανότητά του να βιοσυνθέσει τα ένζυμα που απαιτούνται για το μεταβολισμό των συγκεκριμένων πηγών. Για τους ετερότροφους μικροοργανισμούς συνήθως η πηγή άνθρακα είναι και πηγή ενέργειας. Οι αυτότροφοι χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα το CO₂ και ως πηγή ενέργειας το φως ή κάποιες ανόργανες ή οργανικές ουσίες.

Η **πηγή αζώτου** είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των κυτταρικών υλικών. Μπορεί να είναι οργανικής φύσης (ουρία ή πρωτεΐνες) ή ανόργανης φύσης. Το αμμώνιο είναι η μοναδική μορφή ανόργανου αζώτου που αφομοιώνεται από τους μικροοργανισμούς. Η ικανότητα επομένως των μικροοργανισμών να χρησιμοποιούν άλλες πηγές αζώτου (π.χ. NO₃⁻) εξαρτάται από την ικανότητά τους να μετατρέπουν τις πηγές αυτές σε αμμώνιο. Οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί αξιοποιούν το μοριακό άζωτο (N₂) που βρίσκεται σε αφθονία στην ατμόσφαιρα και επομένως δεν έχουν ανάγκη από κάποια πηγή αζώτου. Αυτοί όμως αποτελούν εξαίρεση στη φύση αφού όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί (μικροοργανισμοί, φυτά, ζώα) έχουν ανάγκη από δεσμευμένες πηγές αζώτου. Γενικά, όσο απλούστερες μορφές αζώτου μπορεί να χρησιμοποιεί ένας μικροοργανισμός τόσο πλουσιότερες βιοσυνθετικές ικανότητες διαθέτει.

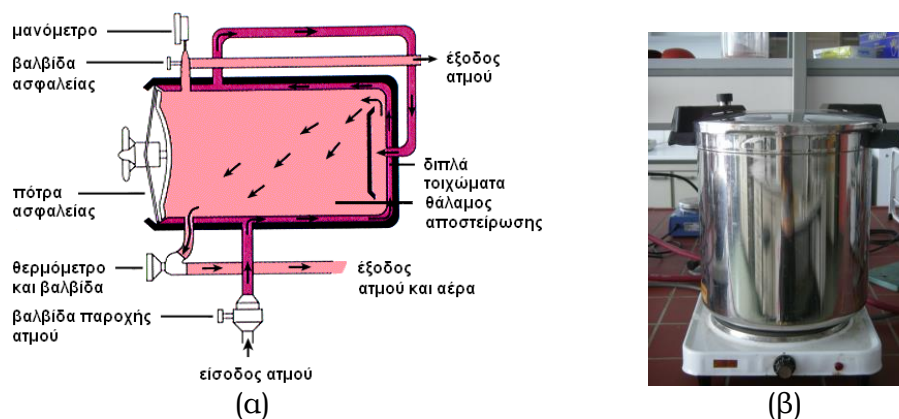
Τα **ανόργανα άλατα** χρησιμοποιούνται ως πηγή PO₄³⁻, K⁺, Mg²⁺ και άλλων συστατικών που είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων, των πρωτεϊνών και για μερικές μεγάλης βιολογικής σπουδαιότητας διεργασίες που πραγματοποιούνται στο μικροβιακό κύτταρο. Μερικά απαραίτητα μέταλλα (Fe⁺³, Cu⁺², Co⁺² κ.ά.) οι μικροοργανισμοί τα έχουν ανάγκη σε πολύ μικρές ποσότητες (ή σε ίχνη). Αυτά καλούνται **ιχνοστοιχεία**. Αν τα ιχνοστοιχεία προστεθούν σε μεγάλες ποσότητες στο θρεπτικό υλικό συνήθως προκαλούν φαινόμενα τοξικότητας στα μικροβιακά κύτταρα.

Μερικοί μικροοργανισμοί (όπως μερικές ζύμες και βακτήρια) έχουν ανάγκη από **υδατοδιαλυτές βιταμίνες** (θειαμίνη, παντοθενικό οξύ, βιοτίνη κ.ά.). Λιποδιαλυτές βιταμίνες δεν είναι απαραίτητες για την αύξηση των μικροοργανισμών.

Αμέσως μετά την παρασκευή τους τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται προκειμένου αυτά να διατηρηθούν αναλλοίωτα μέχρι να χρησιμοποιηθούν. **Αποστείρωση** είναι η διαδικασία που απαλλάσσει τα θρεπτικά υλικά από κάθε ζωντανό κύτταρο, σπόριο ή ιό. Αποστείρωση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με καταστροφή των κυττάρων με θερμότητα, ακτινοβολία, χημικά μέσα ή με διήθηση του θρεπτικού υλικού μέσω βακτηριολογικών ηθμών. Με τη διήθηση απομακρύνονται τα βλαστικά κύτταρα και τα σπόρια των μικροοργανισμών, όχι όμως και τα ισοωμάτια.

Ο πλέον αποτελεσματικός τρόπος αποστείρωσης είναι αυτός με θερμότητα. Στα εργαστήρια χρησιμοποιούνται ειδικοί αποστειρωτικοί κλίβανοι, τα αυτόκλειστα (autoclave) (Εικόνα 1.1). Σε αυτά, με κατάλληλο συνδυασμό πίεσης και θερμοκρασίας, τα διάφορα θρεπτικά υλικά και σκεύη απαλλάσσονται από κάθε μορφή ζωής.

Επειδή ο ξηρός αέρας είναι κακός αγωγός της θερμότητας, η αποστείρωση είναι αποτελεσματική μόνο όταν πραγματοποιείται σε περιβάλλον κορεσμένο με υπέρθερμους ατμούς. Έτσι, πριν την έναρξη της αποστείρωσης ο αέρας εκδιώκεται από το αυτόκλειστο με διοχέτευση σε αυτό ατμού έως ότου το περιβάλλον κορεστεί.



Εικόνα 1.1

(α) Σχηματική παράσταση, (β) φωτογραφία εργαστηριακού αυτόκλειστου.

III.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η εκπαίδευση των φοιτητών στην παρασκευή θρεπτικών υλικών και στην αποστείρωσή τους. Τα θρεπτικά υλικά που θα παρασκευάσει κάθε φοιτητής θα τα χρησιμοποιήσει σε επόμενες ασκήσεις σύμφωνα με τις οδηγίες που θα του δοθούν.

III.3. Εργασία

Θα παρασκευαστούν θρεπτικά υλικά κατάλληλα για μύκητες, ζύμες και βακτήρια.

α) PDA (Potato Dextrose Agar): Θρεπτικό υλικό κατάλληλο για μύκητες και ζύμες.

Ζυγίζονται σε εργαστηριακό ζυγό 19,5 g PDA σε ποτήρι ζέσης. Προστίθενται 500 ml απιονισμένου νερού και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C. Όταν διαυγάσει μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 1 L η οποία κλείνεται με υδρόφοβο βαμβάκι και οδηγείται προς αποστείρωση.

β) MEA (Malt Extract Agar): Θρεπτικό υλικό κατάλληλο για ζύμες.

Ζυγίζονται σε εργαστηριακό ζυγό 24 g MEA σε ποτήρι ζέσης. Προστίθενται 500 ml απιονισμένου νερού και ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με εκείνη της προηγούμενης παραγράφου.

γ) NA (Nutrient Agar): Θρεπτικό υλικό κατάλληλο για βακτήρια.

Ζυγίζονται σε εργαστηριακό ζυγό 11,5 g NA σε ποτήρι ζέσης. Προστίθενται 500 ml απιονισμένου νερού και ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με εκείνη της προηγούμενης παραγράφου.

δ) NB (Nutrient Broth): Θρεπτικό υλικό κατάλληλο για βακτήρια.

Ζυγίζονται σε εργαστηριακό ζυγό 6 g NB εντός κωνικής φιάλης όγκου 1 L. Στη φιάλη προστίθενται 500 ml απιονισμένου νερού και το μίγμα αναδεύεται (χωρίς θέρμανση) μέχρι να διαυγάσει. Στη συνέχεια η φιάλη κλείνεται με υδρόφοβο βαμβάκι και οδηγείται προς αποστείρωση.

Το θρεπτικό υλικό NB δεν περιέχει άγαρ και επομένως είναι υγρό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Χρησιμοποιείται, όπως όλα τα θρεπτικά υλικά που δεν περιέχουν στερεοποιητικούς παράγοντες, για υγρές καλλιέργειες (submerged cultures) μικροοργανισμών.

ε) MRS Broth: Θρεπτικό υλικό κατάλληλο για βακτήρια του γένους *Lactobacillus* κ.ά. γαλακτικά βακτήρια σύμφωνα με τους DeMan, Rogosa και Sharpe.

Ζυγίζονται σε εργαστηριακό ζυγό 25,5 g MRS broth εντός κωνικής φιάλης όγκου 1 L. Στη φιάλη προστίθενται 500 ml απιονισμένου νερού και το μίγμα αναδεύεται (χωρίς θέρμανση) μέχρι να διαυγάσει. Στη συνέχεια η φιάλη κλείνεται με υδρόφοβο βαμβάκι και οδηγείται προς αποστείρωση.

Η **αποστείρωση** πραγματοποιείται σε αυτόκλειστο (autoclave) σε $T=121$ °C ($P=1$ atm) για $t= 20$ min. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης τα αποστειρωμένα υλικά αφήνονται να ψυχθούν και είναι έτοιμα προς χρήση. Συντηρούνται αναλλοίωτα σε σκοτεινό και δροσερό χώρο για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Από τις φιάλες που φυλάσσονται μεταγγίζονται ασηπτικά σε αποστειρωμένα σκεύη (μικρότερες φιάλες, δοκιμαστικούς σωλήνες) στα οποία πρόκειται να καλλιεργηθούν οι μικροοργανισμοί. Τα θρεπτικά υλικά που περιέχουν άγαρ πριν τη χρήση τους τήκονται σε υδατόλουτρο $T=100$ °C και στη συνέχεια αφήνονται να ψυχθούν σε υδατόλουτρο $T=45$ °C. Στη θερμοκρασία αυτή μεταγγίζονται ασηπτικά σε τρυβλία ή σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αφήνονται να στερεοποιηθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Προσοχή: Η μεταφορά των θρεπτικών υλικών στα τρυβλία πραγματοποιείται σύμφωνα με την ασηπτική τεχνική (κοντά σε φλόγα λύχνου Bunsen) προκειμένου αυτά να προστατευτούν από μολύνσεις.



Εικόνα 1.2
Λύχνος Bunsen.

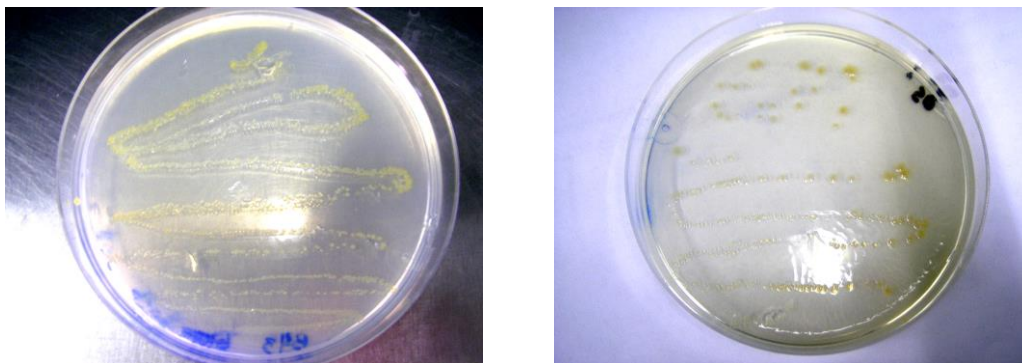
IV. ΑΣΚΗΣΗ 2: Οι διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών. Μακροσκοπικές παρατηρήσεις αποικιών και μικροσκόπηση μικροβιακών κυττάρων.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:29-36.

IV.1. Εισαγωγή

Οι μικροοργανισμοί αναπτυσσόμενοι σε στερεοποιημένα θρεπτικά υλικά σχηματίζουν χαρακτηριστικές αποικίες, ορατές με γυμνό μάτι. Οι αποικίες που σχηματίζουν οι βασικές κατηγορίες μικροοργανισμών παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και επομένως είναι δυνατόν να αναγνωρισθούν μακροσκοπικά μετά από σχετική εξάσκηση.

Οι **αποικίες των βακτηρίων** είναι συνήθως μικρού μεγέθους, έγχρωμες ή λευκές. Είναι στρογγυλές, ριζοειδείς ή ανώμαλες, μερικές φορές δύσσομες. Η υφή των αποικιών είναι γλοιώδης ή βλεννώδης. Αν μια ποσότητα κυττάρων μεταφερθεί σε σταγόνα νερού επί αντικειμενοφόρου πλάκας σχηματίζει δύσκολα γαλάκτωμα. Εξαιρέση αποτελούν μερικά γαλακτικά βακτήρια (γαλακτοβάκιλλοι) των οποίων οι αποικίες έχουν ευχάριστη οσμή και σχηματίζουν εύκολα γαλάκτωμα. Οι αποικίες των ακτινομυκήτων έχουν αλευρώδη υφή, είναι σκληρές (αποκολλώνται δύσκολα από το θρεπτικό υλικό) και έχουν χρώμα γκριζωπό (συνήθως) ή άλλο (κίτρινο, κόκκινο κλπ). Οι αποικίες των στρεπτομυκήτων (ομάδα ακτινομυκήτων που ενδιαφέρει τη φαρμακοβιομηχανία) έχουν χαρακτηριστική οσμή χόματος.

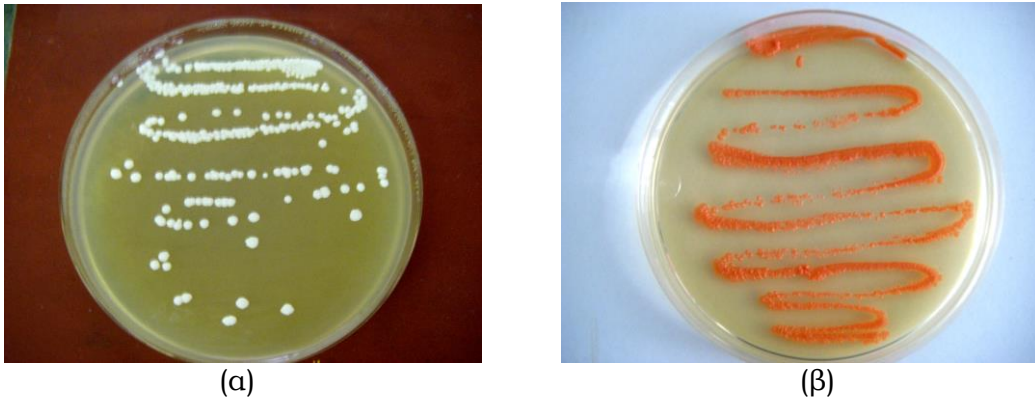


Εικόνα 2.1

Αποικίες βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*.

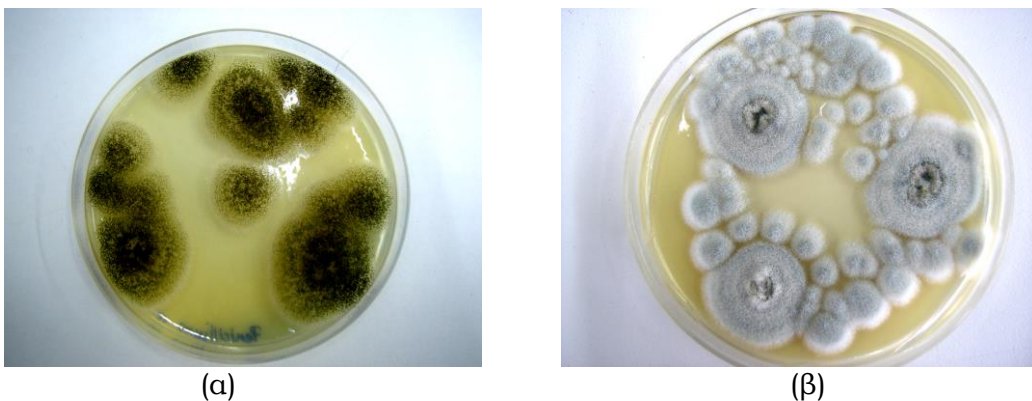
Οι **αποικίες των ζυμών** συνήθως είναι στρογγυλές και μεγαλύτερες από εκείνες των βακτηρίων. Έχουν χαρακτηριστική υφή πάστας, χρώμα λευκό κρέμας (σπάνια ερυθρό) και ευχάριστη οσμή (ή είναι άοσμες). Τα κύτταρα διασπείρονται και σχηματίζουν εύκολα γαλάκτωμα όταν μεταφερθούν σε σταγόνα νερού επί αντικειμενοφόρου πλάκας.

Μερικές ζύμες σχηματίζουν πολύ χαρακτηριστικές αποικίες και μπορούν να ταυτοποιηθούν με μεγάλη βεβαιότητα χωρίς τη χρήση μικροσκοπίου. Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* σχηματίζει χαρακτηριστικές αποικίες με ρυτίδες, ενώ η *Rhodotorula glutinis* είναι η μόνη ζύμη που σχηματίζει κόκκινες ή ροζ αποικίες.



Εικόνα 2.2
Αποικίες ζυμών: (α) *Candida robusta*, (β) *Rhodotorula* sp.

Οι **αποικίες των μυκήτων** διακρίνονται εύκολα από αυτές των ζυμών και των βακτηρίων από τις υφές του μυκηλίου που μοιάζουν με ίνες βάμβακος, τριχίδια ή βελούδο. Μπορεί να είναι λευκές ή έγχρωμες (γκριζωπές, πράσινες, μαύρες, ρόδινες κλπ). Σε μερικές περιπτώσεις οι καρποφορίες των μυκήτων είναι ορατές με γυμνό οφθαλμό.



Εικόνα 2.3
Αποικίες μυκήτων: (α) *Aspergillus* sp., (β) *Penicillium* sp.

Η παρατήρηση των μικροβιακών κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια του μικροσκοπίου. Τα κύτταρα των βακτηρίων είναι μικρά, πολύ μικρότερα αυτών των ζυμών. Μάλιστα, η παρατήρηση μερικών βακτηρίων είναι πρακτικά αδύνατη στο κοινό μικροσκόπιο, πριν αυτά χρωματιστούν με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών.

Η παρατήρηση των μυκήτων είναι σχετικά εύκολη, ακόμα και στη μεγέθυνση X10. Λεπτομερέστερη όμως παρατήρηση μπορεί να γίνει στη μεγέθυνση X40 ή X100 (με τον ελαιοκαταδυτικό φακό).

IV.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η εξάσκηση των φοιτητών στη μακροσκοπική και μικροσκοπική αναγνώριση των κυριότερων κατηγοριών μικροοργανισμών.

IV.3. Εργασία

Θα σας δοθούν τρυβλία με καλλιέργειες βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων. Παρατηρήστε τη μορφή, το σχήμα και το μέγεθος των αποικιών. Δείτε τις

διαφορές των αποικιών ζυμών που ανήκουν στα είδη: *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* και *Rhodotorula glutinis*. Μεταφέρετε ασηπτικά (με αποστειρωμένο βακτηριολογικό κρίκο και εργαζόμενοι κοντά σε φλόγα λύχνου) κύτταρα ζυμών και βακτηρίων σε σταγόνα νερού επί αντικειμενοφόρου πλάκας και προσπαθήστε να διασπείρετε τα κύτταρα (να δημιουργήσετε γαλάκτωμα). Εξοικειωθείτε με την οσμή των βακτηρίων και των ζυμών (χωρίς να έλθετε σε επαφή με τις αποικίες).

Μεταφέρετε επί αντικειμενοφόρου πλάκας κύτταρα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και παρατηρήστε τη μορφολογία τους (σε μεγέθυνση X10, X40, X100). Η ζύμη αυτή είναι μύκητας (μονοκύτταρος) και ανήκει στο φύλο Ascomycota.

Τοποθετείστε επί αντικειμενοφόρου πλάκας μια σταγόνα απιονισμένου νερού και μεταφέρετε σε αυτή με τη βοήθεια μικροβιολογικού γάντζου μυκήλιο του μύκητα *Mucor* sp. ή *Rhizopus* sp.. Διανοίξτε το μυκήλιο με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου και γάντζου και τοποθετείστε στην επιφάνεια του παρασκευάσματος καλυπτρίδα. Παρατηρήστε τη μορφολογία του μυκηλίου (αρχικά στη μεγέθυνση X10 και στη συνέχεια στη μεγέθυνση X40). Παρατηρήστε την απουσία εγκαρσίων διαφραγμάτων (σέπτων). Οι μύκητες αυτοί ανήκουν στο φύλο Zygomycota που παλαιότερα είχαν θεωρηθεί (εσφαλμένα) κατώτεροι μύκητες. Εργαστείτε παρόμοια με τον μύκητα *Morchella* sp.. Παρατηρήστε την παρουσία σέπτων. Ο μύκητας αυτός ανήκει στο φύλο Ascomycota.

Ομοίως, μεταφέρετε επί αντικειμενοφόρου πλάκας κύτταρα βακτηρίων (π.χ. *Lactobacillus* sp., *Azospirillum* sp.). Διαπιστώστε ότι είναι πολύ δύσκολη η παρατήρηση βακτηριακών κυττάρων, ακόμη και στη μεγέθυνση X100. Για την παρατήρηση βακτηριακών κυττάρων καταφεύγουμε σε χρώση αυτών, τεχνική στην οποία θα εκπαιδευτείτε σε επόμενη άσκηση.

V. ΑΣΚΗΣΗ 3: Απομόνωση καθαρών καλλιέργειών.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:40-41, 287-288.

V.1. Εισαγωγή

Καθαρή καλλιέργεια είναι το σύνολο των κυττάρων που προέρχονται από ένα και μοναδικό μικροβιακό κύτταρο. Καθαρές καλλιέργειες δεν υπάρχουν στη φύση. Παρά το γεγονός ότι σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα επικρατούν υπό ορισμένες συνθήκες εξειδικευμένα είδη ή (σπανιότερα) στελέχη μικροοργανισμών, ο κανόνας είναι ότι οι μικροοργανισμοί ζουν στη φύση σε μεικτούς πληθυσμούς.

Οι καθαρές καλλιέργειες είναι απαραίτητες για την επιστήμη της Μικροβιολογίας, αφού μόνο όταν υπάρχει ένα μικροβιακό στέλεχος σε καθαρή καλλιέργεια είναι δυνατόν να μελετηθεί στο εργαστήριο. Εξάλλου, οι καθαρές καλλιέργειες έχουν και πρακτικές εφαρμογές στη βιομηχανία (π.χ. φαρμάκων, τροφίμων καθώς και άλλων βιομηχανιών που χρησιμοποιούν ένα ορισμένο στέλεχος) και στη συσχέτιση ενός μικροοργανισμού με μια ασθένεια (φυτού ή ζώου) σύμφωνα με τις αρχές του Koch ή με μια αλλοίωση (τροφίμου ή άλλου προϊόντος) σύμφωνα με τις αρχές του Hansen.

Αν ένας μεικτός μικροβιακός πληθυσμός καλλιεργηθεί σε στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό θα αναπτυχθούν στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού αποικίες. Προφανώς δε θα αναπτυχθούν όλοι οι μικροοργανισμοί του πληθυσμού αφού κάθε θρεπτικό υλικό υποστηρίζει την ανάπτυξη ορισμένων μόνο μικροοργανισμών¹. Η κάθε αποικία που θα αναπτυχθεί θα προέρχεται από ένα και μοναδικό κύτταρο. Έτσι, αν λάβουμε κύτταρα από μια αποικία και τα μεταφέρουμε σε νέο θρεπτικό υλικό θα έχουμε θεωρητικά μια καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Στην πράξη η καλλιέργεια θεωρείται καθαρή αν δεν αναπτυχθούν άλλοι μικροοργανισμοί μετά από 2-3 ανανεώσεις της καλλιέργειας.

Σε μερικά περιβάλλοντα οι μικροβιακοί πληθυσμοί βρίσκονται σε υψηλές πυκνότητες. Στις περιπτώσεις αυτές είναι απαραίτητη η αραίωση των δειγμάτων έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη διακριτών αποικιών. Σε μερικά άλλα περιβάλλοντα (ολιγοτροφικά) οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε χαμηλές πυκνότητες. Στις περιπτώσεις αυτές είναι απαραίτητη η συμπύκνωση των δειγμάτων με τη βοήθεια ειδικών ηθμών.

V.2. Σκοπός της άσκησης

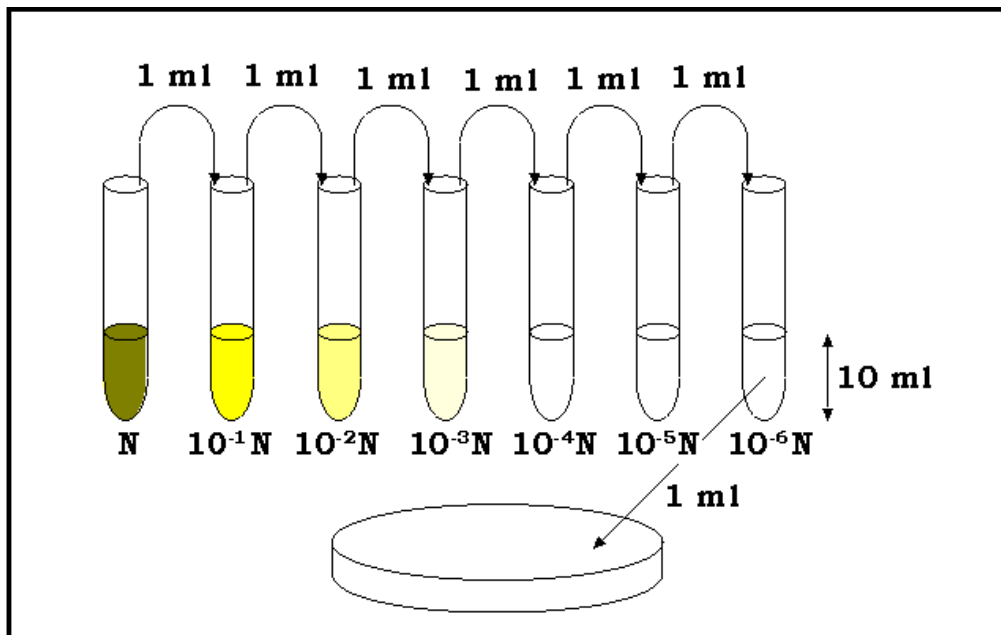
Η εξάσκηση των φοιτητών στην απομόνωση καθαρών καλλιέργειών από μεικτούς μικροβιακούς πληθυσμούς.

V.3. Εργασία

Στο εργαστήριο υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα εδάφους, γλεύκους σε ζύμωση, ρώσικης σαλάτας, γάλακτος και μαγιονέζας. Στα δείγματα αυτά οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε υψηλές πυκνότητες και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αραιωθούν πριν επιχειρηθεί η απομόνωση καθαρών

¹Δεν υπάρχουν θρεπτικά υλικά στα οποία να αναπτύσσονται όλοι οι μικροοργανισμοί. Έτσι, όταν επιδιώκουμε την απομόνωση κάποιου μικροοργανισμού από ένα φυσικό πληθυσμό θα πρέπει να χρησιμοποιούμε θρεπτικά υλικά στα οποία είναι ικανός να αναπτύσσεται ο προς απομόνωση μικροοργανισμός. Επίσης, εκτός από το θρεπτικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αποικιών παίζουν και οι συνθήκες επώασης (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση οξυγόνου κλπ).

καλλιιεργειών. Η μέθοδος που θα ακολουθήσετε ονομάζεται **μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων** (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1

Σχηματική παράσταση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων (N =πυκνότητα του μικροβιακού πληθυσμού, κύτταρα ml^{-1}).

Ζυγίζεται (στην περίπτωση των στερεών δειγμάτων) με ακρίβεια μια ποσότητα δείγματος (περίπου 1 g) ή λαμβάνεται με το αποστειρωμένο σιφώνιο (στην περίπτωση των υγρών δειγμάτων) 1 ml δείγματος. Και στις δύο περιπτώσεις το δείγμα μεταφέρεται ασηπτικά σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού (διάλυμα Ringer). Στην περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί στερεό δείγμα ο σωλήνας αναταράσσεται περιοδικά για τουλάχιστον 15 min σε αναδευτήρα Vortex προκειμένου να δημιουργηθεί ομοιογενές (κατά το δυνατό) εναιώρημα των μικροβιακών κυττάρων. Στην περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί υγρό δείγμα 2-3 αναταράξεις για 1-2 min είναι αρκετές.

Στο αιώρημα που παρασκευάστηκε κατά τα ανωτέρω (με τη μεταφορά 1 g ή 1 ml δείγματος σε 9 ml φυσιολογικού ορού) ο αρχικός πληθυσμός βρίσκεται αραιωμένος 10 φορές. Σημειώστε στο σωλήνα την ένδειξη 10^{-1} .

Μεταφέρετε 1 ml από το αιώρημα 10^{-1} (αφού το ανακινήσετε στον αναδευτήρα προκειμένου να ομογενοποιηθεί) σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Έτσι επιτυγχάνεται αραιώση του αρχικού πληθυσμού 100 φορές (ένδειξη σωλήνα 10^{-2}).

Συνεχίζουμε την ίδια διαδικασία μέχρι τη δημιουργία αραιώσεων 10^{-6} .

Από κάθε μια από τις αραιώσεις 10^{-5} και 10^{-6} λάβετε (με αποστειρωμένο σιφώνιο) 1 ml και μεταφέρετέ το ασηπτικά σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό PDA. Εξαπλώστε το υγρό δείγμα σε ολόκληρη την επιφάνεια των τρυβλίων με τη βοήθεια γυάλινης κυρτωμένης ράβδου ή βακτηριολογικού κρίκου. Ομοίως, από τις ίδιες αραιώσεις, λάβετε 1 ml (από την κάθε αραιώση) και μεταφέρετέ το σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό υλικό NA. Ακολουθώντας, εξαπλώστε το δείγμα, κατά τα ανωτέρω, σε ολόκληρη την επιφάνεια των τρυβλίων.

Τοποθετείστε τα τρυβλία σε επωαστικό θάλαμο ($T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Εικόνα 3.2) και κάνετε παρατηρήσεις μετά από 24 h, 48 h και 72 h

επώασης. Στα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό PDA αναμένουμε να αναπτυχθούν αποικίες κυρίως μυκήτων και ζυμών, ενώ στα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό NA αναμένουμε αποικίες κυρίως βακτηρίων².

Στα τρυβλία που επώασθηκαν σε $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$ αναμένουμε να αναπτυχθούν ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί (όπως αυτοί που μολύνουν τα τρόφιμα τα οποία συντηρούνται στο ψυγείο) ενώ σε $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ αναμένουμε αποικίες μεσόφιλων μικροοργανισμών. Στη θερμοκρασία $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ αναμένουμε να επικρατήσουν στο θρεπτικό υλικό NA βακτήρια της οικ. Enterobacteriaceae (εντεροβακτήρια), τουλάχιστον κατά τα πρώτα στάδια επώασης. Η παρουσία εντεροβακτηρίων στα τρόφιμα υποδηλώνει μόλυνση των τροφίμων σε κάποιο στάδιο της παραγωγής τους με λύματα, κόπρανα ζώων κλπ..

Εκφράστε τα αποτελέσματά σας ποσοτικά. Εκτιμήστε την πυκνότητα των πληθυσμών των βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων στα διάφορα δείγματα.



Εικόνα 3.2
Επώαστικός θάλαμος

²Προκειμένου να αποκλειστεί πλήρως η ανάπτυξη βακτηρίων στο θρεπτικό υλικό PDA είναι δυνατόν να προστεθεί στο θρεπτικό υλικό χλωραμφαινικόλη (αντιβιοτικό ευρέως φάσματος) σε συγκέντρωση $0,05\text{ mg l}^{-1}$. Κατά αντιστοιχία, η προσθήκη ακτιβόνης σε συγκέντρωση $0,5\text{ mg l}^{-1}$ στο θρεπτικό υλικό NA αποκλείει την ανάπτυξη μυκήτων και ζυμών.

VI. ΑΣΚΗΣΗ 4: Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και η χρώση Gram.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:60-68.

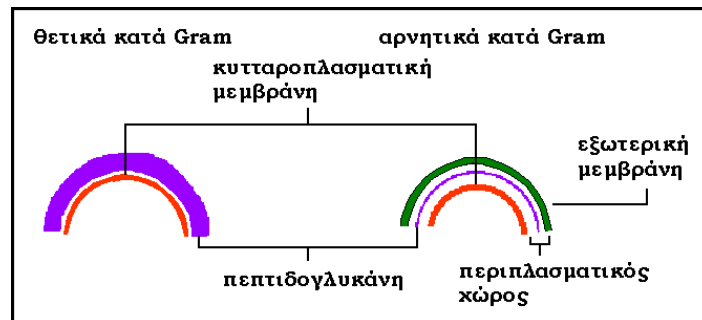
VI.1. Εισαγωγή

Για την οπτική παρατήρηση των μικροβιακών κυττάρων, πέρα από τη χρήση του μικροσκοπίου με τη βοήθεια του οποίου επιτυγχάνεται η κατάλληλη μεγέθυνση, είναι συχνά απαραίτητη η χρώση των παρασκευασμάτων.

Οι πιο συνηθισμένες χρώσεις που χρησιμοποιούνται στη Μικροβιολογία αποσκοπούν στην επίτευξη αντίθεσης μεταξύ των μικροβιακών κυττάρων και του περιβάλλοντος οπτικού πεδίου. Μερικές χρώσεις χρησιμοποιούνται για τη χρώση των κυττάρων (θετικές χρώσεις) ενώ άλλες για τη χρώση του περιβάλλοντος οπτικού πεδίου (αρνητικές χρώσεις).

Οι χρώσεις μπορεί να είναι καθολικές (να χρωματίζουν όλα ανεξαιρέτως τα μικροβιακά κύτταρα) ή διαφορικές (να χρωματίζουν ορισμένα μόνο εξ αυτών). Μερικές χρώσεις, τέλος, χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση ορισμένων μόνο οργανιδίων (όπως του μαστιγίου, των βλεφαρίδων, του βακτηριακού ενδοσπορίου) ή συστατικών (π.χ. λιπιδίων) των μικροβιακών κυττάρων.

Η χρώση Gram είναι η σημαντικότερη χρώση στη Μικροβιολογία. Χρησιμοποιείται για να διευκολύνει τη μικροσκοπική παρατήρηση των βακτηρίων, αλλά επίσης και για τη μελέτη και την ταξινόμησή τους. Ανήκει στις διαφορικές χρώσεις, δηλ. δε χρωματίζει με τον ίδιο τρόπο όλα τα βακτηριακά κύτταρα. Αν ένας μεικτός πληθυσμός βακτηριακών κυττάρων επεξεργαστεί με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους και στη συνέχεια με διάλυμα I_2/KI όλα τα κύτταρα του πληθυσμού λαμβάνουν κυανό χρώμα το οποίο οφείλεται σε σύμπλοκο-ένωση που σχηματίζει το κρυσταλλικό ιώδες με το I_2 εντός του βακτηριακού κυττάρου. Αν στη συνέχεια τα κύτταρα πλυθούν με αλκοόλη, ορισμένα βακτηριακά κύτταρα διατηρούν το βαθύ κυανό χρώμα, ενώ ορισμένα άλλα αποχρωματίζονται. Συγκεκριμένα, τα βακτηριακά κύτταρα που έχουν παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμά τους (θετικά κατά Gram – Εικόνα 4.1) συγκρατούν το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους/ I_2 μετά από έκπλυση με αλκοόλη, και επομένως διατηρούν το βαθύ κυανό χρώμα. Τα βακτηριακά κύτταρα, αντίθετα, που έχουν λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τους τοίχωμα (αρνητικά κατά Gram) δε συγκρατούν το σύμπλοκο της χρωστικής και αποχρωματίζονται.



Εικόνα 4.1

Σχηματική παράσταση του κυτταρικού τοιχώματος των θετικών και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

Αν τα κύτταρα του πληθυσμού επεξεργαστούν στη συνέχεια με σαφρανίνη, τα θετικά κατά Gram παραμένουν χρωματισμένα (βαθύ κυανό) ενώ τα αρνητικά κατά Gram (που σε αυτή τη φάση είναι αποχρωματισμένα), χρωματίζονται κόκκινα.

VI.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η εξάσκηση των φοιτητών στη διαφορική χρώση Gram.

VI.3. Εργασία

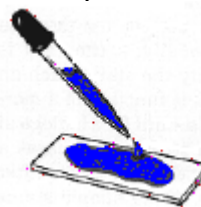
Δίνονται τρυβλία με αποικίες βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Azospirillum*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* και *Vibrio* καθώς και τρυβλία με μεικτούς πληθυσμούς.

Δίνονται επίσης: οι χρωστικές κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet), διάλυμα I₂/Ιωδιούχου καλίου και σαφρανίνη (safranin), αλκοόλη 95% και απιονισμένο νερό.

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήστε μια σταγόνα απιονισμένου νερού, μεταφέρετε ασηπτικά με βακτηριολογικό κρίκο κύτταρα βακτηρίων και δημιουργήστε κατά το δυνατόν ομοιογενές γαλάκτωμα. Το θόλωμα που θα δημιουργηθεί στην αντικειμενοφόρο θα πρέπει να είναι εμφανές, όχι όμως έντονο. Εξαπλώστε στη συνέχεια τη σταγόνα στην κεντρική περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου.

Προσηλώστε το παρασκεύασμα περνώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω από τη φλόγα λύχνου, χωρίς όμως να την υπερθερμάνετε. Θα πρέπει η πλάκα κατά τη διαδικασία της προσήλωσης να είναι ανεκτική όταν τοποθετείται στην εξωτερική όψη του χεριού (όχι στην παλάμη). Η προσήλωση ολοκληρώνεται όταν το παρασκεύασμα στεγνώσει.

Προσθέστε επί του παρασκευάσματος μερικές σταγόνες κρυσταλλικού ιώδους και αφήστε τη χρωστική να δράσει για 1 min. Το κρυσταλλικό ιώδες χρωματίζει βαθύ κυανό χρώμα όλα ανεξαιρέτως τα βακτηριακά κύτταρα.



Στη συνέχεια απομακρύνετε την περίσσεια της χρωστικής με νερό και επεξεργαστείτε το παρασκεύασμα για 3 min με διάλυμα I₂/KI. Ξεπλύνετε το παρασκεύασμα με αλκοόλη (σταγόνα-σταγόνα για 1-3 min) και στη συνέχεια με άφθονο νερό (επίσης σταγόνα-σταγόνα). Στο στάδιο αυτό μερικά μόνο κύτταρα (τα θετικά κατά Gram) διατηρούν το κυανό χρώμα, τα υπόλοιπα αποχρωματίζονται.

Καλύψτε το παρασκεύασμα με σαφρανίνη (για 1-2 min) και στη συνέχεια ξεπλύνετε την περίσσεια της χρωστικής με νερό.

Στεγνώστε την αντικειμενοφόρο πλάκα με απορροφητικό χαρτί, χωρίς να το σύρετε στην επιφάνεια της πλάκας. Προχωρήστε σε μικροσκοπική παρατήρηση σε μεγέθυνση X40 και στη συνέχεια X100 (με ελαιοκατάδυση) αφού πρώτα βεβαιωθείτε ότι η παρατήρηση γίνεται από την ορθή πλευρά της αντικειμενοφόρου.

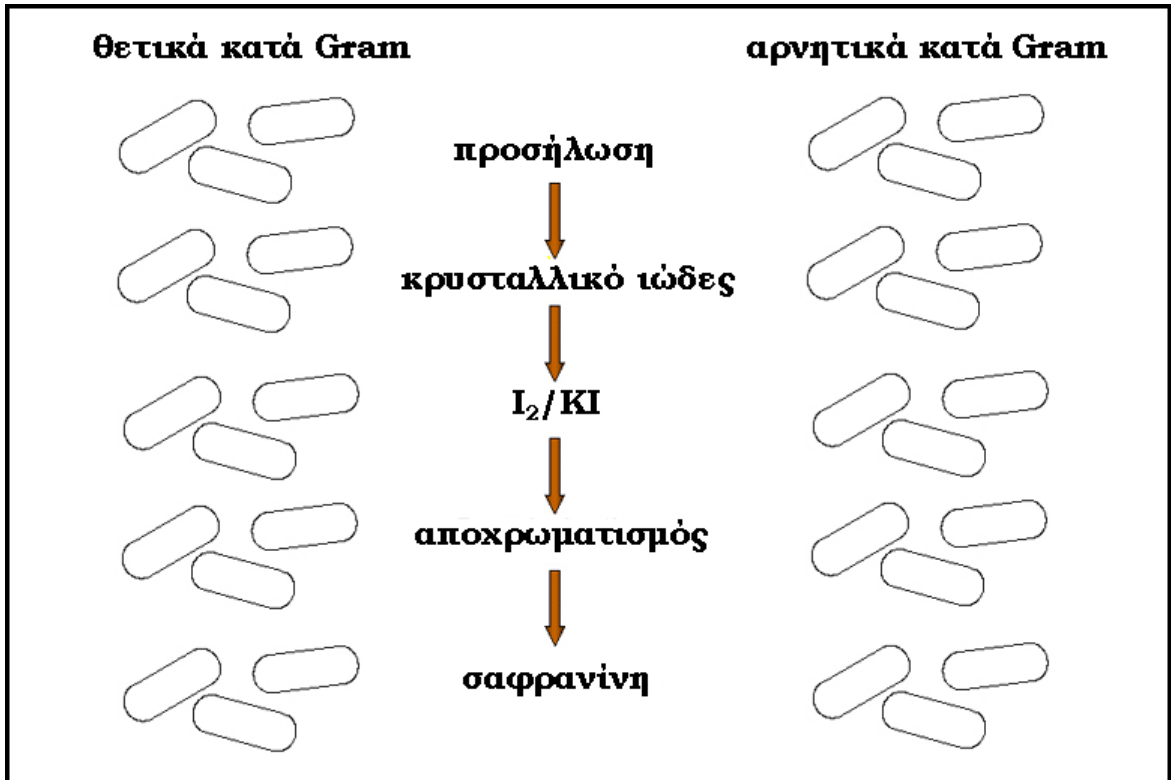
Τα θετικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζονται χρωματισμένα με βαθύ κυανό χρώμα ενώ τα αρνητικά κατά Gram εμφανίζονται χρωματισμένα με κόκκινο-ρόδινο χρώμα.

Παρατηρήστε όλα τα παρασκευάσματα των καλλιιεργειών και σημειώστε στο τετράδιό σας τις παρατηρήσεις σας σχετικά με το μέγεθος και το σχήμα

των διαφόρων βακτηρίων, την ικανότητά τους να σχηματίζουν αλυσίδες ή συσσωματώματα κλπ.

Άσκηση

Σύμφωνα με όσα έχετε διαβάσει και την εμπειρία που αποκτήσατε στο εργαστήριο χρωματίστε τα κύτταρα στην εικόνα που ακολουθεί με τα χρώματα που πιστεύετε ότι αυτά λαμβάνουν κατά τα διάφορα στάδια της χρώσης Gram.



VII. ΑΣΚΗΣΗ 5: Το βακτηριακό ενδοσπόριο. Απομόνωση σποριογόνων βακτηρίων από το περιβάλλον.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:85-87.

VII.1. Εισαγωγή

Η αντοχή των μικροοργανισμών στις υψηλές θερμοκρασίες έχει προφανές τεχνολογικό ενδιαφέρον για τη βιομηχανία που χρησιμοποιεί τη θερμότητα ως μέσο συντήρησης των τροφίμων ή άλλων υλικών. Στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται ευρύτατα τόσο η αποστείρωση όσο και η παστερίωση. Η **αποστείρωση** αποσκοπεί στην αδρανοποίηση όλων των μικροβιακών κυττάρων και των σπορίων των μικροοργανισμών, όπως επίσης και στην αδρανοποίηση των ισοωματιών. Ένα αποστειρωμένο υλικό μπορεί να διατηρηθεί μικροβιακά αναλλοίωτο για πάντα³. Η έννοια της αποστείρωσης είναι απόλυτος, δεν υφίσταται δηλ. η έννοια «μερική αποστείρωση». Η **παστερίωση**, αντίθετα, είναι όρος σχετικός. Αυτή αποσκοπεί στην αδρανοποίηση των παθογόνων για τον άνθρωπο μικροοργανισμών και του μεγαλύτερου μέρους του πληθυσμού των υπολοίπων. Προφανώς, ένα παστεριωμένο τρόφιμο δεν είναι απαλλαγμένο μικροοργανισμών και επομένως έχει περιορισμένη διάρκεια ζωής (όπως π.χ. το φρέσκο παστεριωμένο γάλα).

Η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών δημιουργεί προβλήματα στα εργαστήρια Μικροβιολογίας, ιδίως όταν επιδιώκεται η αποστείρωση μεγάλων σκευών ή οργάνων (βιοαντιδραστήρων). Σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται παραμονή των προς αποστείρωση υλικών στο αυτόκλειστο (T=121 °C) για 45 min ή και περισσότερο, προκειμένου να φονευθούν όλοι οι μικροοργανισμοί (βλαστικές μορφές και σπόρια).

Γενικά, τα βλαστικά μικροβιακά κύτταρα (βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων) είναι ευαίσθητα στη θέρμανση. Τα σπόρια των μυκήτων και των ζυμών, αν και ανθίσταται ισχυρά σε αντίξοες συνθήκες (αφυδάτωση, ακτινοβολίες κλπ), παρουσιάζουν μέτρια θερμοανθεκτικότητα. Τα σπόρια των βακτηρίων (ενδοσπόρια), αντίθετα, είναι εξαιρετικά θερμοάντοχα.

Τα σπόρια του *Bacillus stearothermophilus* είναι οι πλέον ανθεκτικές μορφές ζωής. Είναι ικανά να επιβιώνουν σε T=134 °C μέχρι και για 10 min. Τα σπόρια αυτά χρησιμοποιούνται στα ερευνητικά εργαστήρια και στη βιομηχανία για έλεγχο της αποτελεσματικότητας των αυτόκλειστων.

Η ιδιότητα των σποριογόνων βακτηρίων να ανθίστανται στις υψηλές θερμοκρασίες δημιουργεί μεν προβλήματα, κάνει όμως εύκολη την απομόνωση των βακτηρίων αυτών στο εργαστήριο. Αν θερμάνουμε, για παράδειγμα, ένα μεικτό μικροβιακό πληθυσμό σε T=100 °C για χρονικό διάστημα 5-10 min⁴, οι μόνες μορφές ζωής που αναμένεται να επιζήσουν είναι τα βακτηριακά ενδοσπόρια.

³Ακόμα και τα αποστειρωμένα υλικά (τρόφιμα κ.ά.) έχουν ημερομηνία λήξης. Αυτή είναι διαφορετική για κάθε υλικό και έχει να κάνει με την ταχύτητα των χημικών, και όχι των μικροβιακών, αλλοιώσεων. Τα αποστειρωμένα υλικά παραμένουν μικροβιακά αναλλοίωτα για πάντα.

⁴Η ανθεκτικότητα των ενδοσπορίων στις διάφορες θερμοκρασίες εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως το pH του μέσου, την παρουσία σε αυτό πρωτεϊνών, λιπιδίων κ.ά. ουσιών, και την προΐστορία του ενδοσπορίου.

VII.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της σημερινής άσκησης είναι:

- 1)** Η εκτίμηση της θερμοανθεκτικότητας μεικτών μικροβιακών πληθυσμών και η απομόνωση από αυτούς σποριογόνων βακτηρίων.
- 2)** Η μικροσκοπική παρατήρηση σπορίων του *Bacillus subtilis* μετά από χρώση σύμφωνα με τη μέθοδο Schaeffer-Fulton.

VII.3. Εργασία

Δίνονται δείγματα εδάφους και καλλιέργειες του βακτηρίου *Bacillus subtilis* διαφόρων ηλικιών.

α) Απομόνωση σποριογόνων βακτηρίων

Ζυγίστε δείγμα εδάφους (1 g) και μεταφέρετε το δείγμα ασηπτικά σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 ml φυσιολογικού ορού. Αναδεύσετε στον αναδευτήρα Vortex για 15 min και πραγματοποιήστε διαδοχικές αραιώσεις μέχρι την αραιώση 10^{-3} . Τοποθετείτε τους σωλήνες σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100 °C για 2 min, 5 min και 10 min. Αφήστε τους σωλήνες να κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Από κάθε διαφορετικά επεξεργασμένο δείγμα λάβετε 1 ml με αποστειρωμένο σιφώνιο και μεταφέρετε σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό NA.

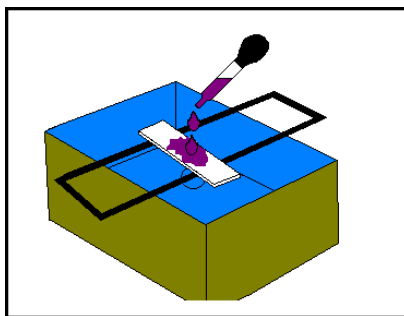
Τοποθετείτε τα τρυβλία σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 28 °C. Παρατηρήστε τις αποικίες που θα σχηματιστούν μετά από 24 h, 48 h και 72 h. Σημειώστε τις παρατηρήσεις στο τετράδιό σας. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο το οποίο είχε εμβολιαστεί με κύτταρα επεξεργασμένα στους 100 °C για 10 min είναι σποριογόνα βακτήρια (πιθανότητα των γενών *Bacillus* ή *Clostridium*).

Εκφράστε τα αποτελέσματά σας (σχετικά με την πυκνότητα των θερμοανθεκτικών πληθυσμών στο δείγμα) ποσοτικά.

β) Χρώση και μικροσκοπική παρατήρηση των ενδοσπορίων

Τα βακτηριακά ενδοσπόρια είναι ανθεκτικές δομές και δε διαπερνώνται εύκολα από τις διάφορες χρωστικές. Για το λόγο αυτό η χρώση γίνεται εν θερμώ.

Τοποθετείτε αιώρημα κυττάρων του *Bacillus subtilis* επί αντικειμενοφόρου πλάκας, εξαπλώστε το με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου και προσηλώστε το παρασκεύασμα με ήπια θέρμανση. Καλύψτε την αντικειμενοφόρο πλάκα με απορροφητικό χαρτί και τοποθετήστε τη σε σχάρα πάνω από υδατόλουτρο (T=100 °C) (Εικόνα 5.1). Διαποτίστε το απορροφητικό χαρτί με πράσινο του μαλαχίτη και αφήστε το πάνω από το υδατόλουτρο για t=5 min. Στη φάση αυτή, τόσο τα κύτταρα όσο και τα σπόρια είναι χρωματισμένα πράσινα.



Εικόνα 5.1

Διάταξη που χρησιμοποιείται για τη χρώση των ενδοσπορίων.

Στη συνέχεια απομακρύνετε την αντικειμενοφόρο πλάκα από το υδατόλουτρο και το απορροφητικό χαρτί από την πλάκα. Αφήστε την πλάκα να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ξεπλύνετε την περίσσεια της χρωστικής με απιονισμένο νερό. Το πλύσιμο με νερό απομακρύνει τη χρωστική από τα βακτηριακά κύτταρα, όχι όμως και από τα σπόρια. Καλύψτε το παρασκεύασμα με σαφρανίνη (για $t=2$ min). Στη φάση αυτή τα κύτταρα χρωματίζονται ερυθρά ενώ τα σπόρια παραμένουν πράσινα.

Ξεπλύνετε την περίσσεια της σαφρανίνης με απιονισμένο νερό και προχωρήστε σε μικροσκοπική παρατήρηση στη μεγέθυνση X40 και X100 (με τον ελαιοκαταδυτικό φακό).

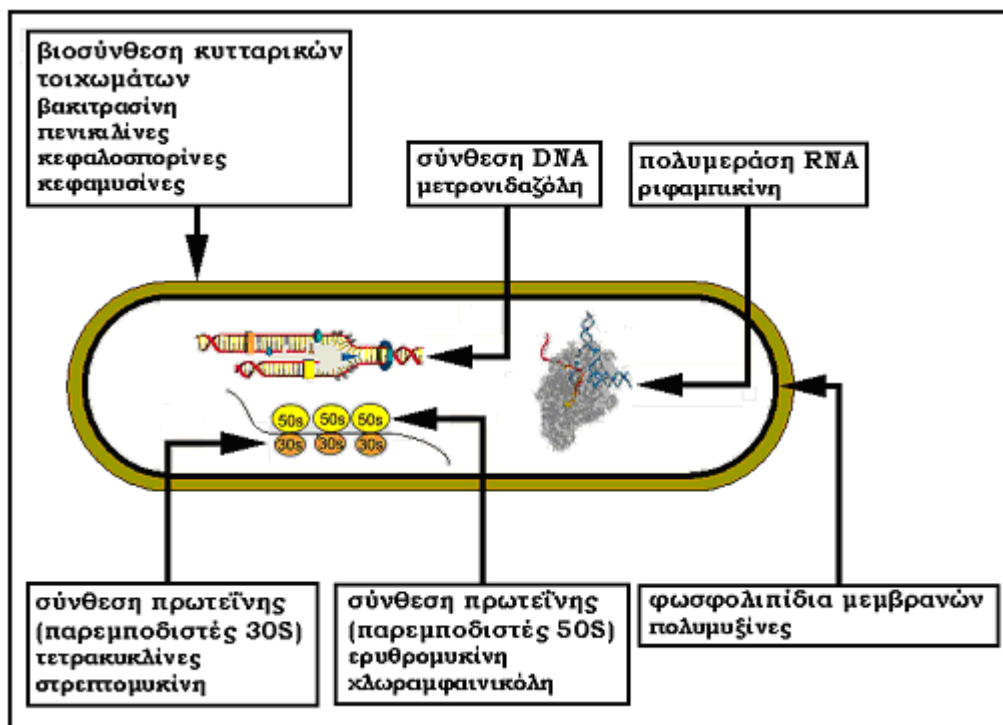
Σημειώστε τις παρατηρήσεις στο τετράδιό σας. Σε ποιες καλλιέργειες παρατηρούνται περισσότερα σπόρια ; στις μικρής ή στις μεγάλης ηλικίας ; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.

VIII. ΑΣΚΗΣΗ 6: Ευαισθησία των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:42, 68-70, 621-625.

VIII.1. Εισαγωγή

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην καταπολέμηση των ασθενειών του ανθρώπου, των ζώων και, σε μικρότερη κλίμακα, των φυτών. Κάθε αντιβιοτικό (ή ομάδα αντιβιοτικών) στοχεύει στην παρεμπόδιση μίας ή περισσότερων διεργασιών του μικροβιακού κυττάρου (Εικόνα 6.1).



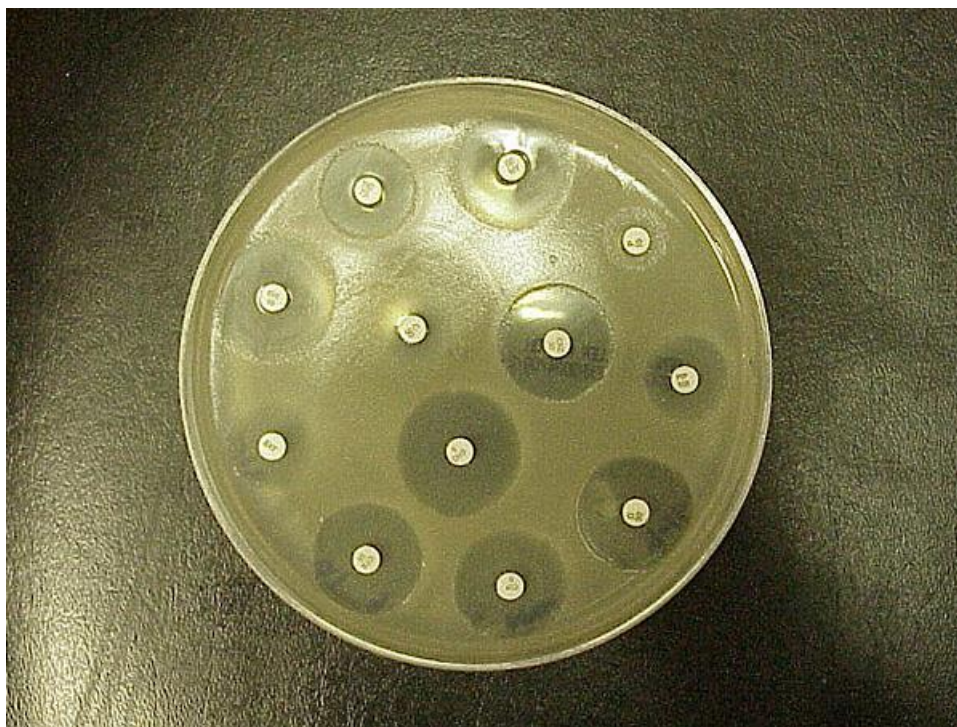
Εικόνα 6.1

Διεργασίες – στόχοι μερικών αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται κατά των βακτηρίων.

Η ευαισθησία ενός στελέχους παθογόνου μικροοργανισμού στα διάφορα αντιβιοτικά καθορίζει το ποιο αντιβιοτικό και σε ποια δόση πρέπει να χρησιμοποιηθεί, προκειμένου να κατασταλεί η αύξηση του συγκεκριμένου στελέχους. Μια συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του κατάλληλου αντιβιοτικού είναι η **μέθοδος παρεμπόδισης σε τρυβλία**. Κατά τη μέθοδο αυτή το μικροβιακό στέλεχος εμβολιάζεται σε τρυβλίο Petri. Ο εμβολιασμός μπορεί να γίνει είτε με τη μέθοδο της εξάπλωσης του εμβολίου με βακτηριολογικό κρίκο στην επιφάνεια στερεοποιημένου θρεπτικού υλικού είτε με τη μέθοδο της μετασποράς, μεταφέροντας 1 ml εμβολίου στο τρυβλίο, προσθέτοντας στη συνέχεια θρεπτικό υλικό θερμοκρασίας 40-45 °C και αναμιγνύοντας ήπια το μίγμα εμβολίου – θρεπτικού υλικού.

Το θρεπτικό υλικό μετά τον εμβολιασμό αφήνεται να στερεοποιηθεί και στη συνέχεια μεταφέρονται στην επιφάνειά του κυκλικά δισκία από ειδικό απορροφητικό χαρτί τα οποία έχουν προηγουμένως εμβαπτιστεί σε διαλύματα αντιβιοτικών. Το τρυβλίο οδηγείται στη συνέχεια στον επωαστικό θάλαμο προς επώαση. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα αντιβιοτικά, με τα οποία είναι εμποτισμένα τα χάρτινα δισκία, διαχέονται περιμετρικά των

δισκίων στο στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό και δημιουργούν ζώνες παρεμπόδισης της μικροβιακής αύξησης. Στις ζώνες αυτές δε θα αναπτυχθεί το υπό έλεγχο βακτηριακό στέλεχος, αν αυτό είναι ευαίσθητο στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Έτσι οι ζώνες παραμένουν διαυγείς (clearing zone) μετά την επώαση των τρυβλίων, σε αντίθεση με τις άλλες περιοχές του τρυβλίου στις οποίες ο μικροοργανισμός θα αναπτυχθεί και θα προσδώσει θόλωμα (Εικόνα 6.2).



Εικόνα 6.2

Ανάπτυξη ζωνών παρεμπόδισης (clearing zone) σε τρυβλίο.

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η ευαισθησία των βακτηρίων στα διάφορα αντιβιοτικά. Μάλιστα, μερικοί Μικροβιολόγοι θεωρούν ότι η διάμετρος των διαυγών ζωνών, για δεδομένο μικροβιακό στέλεχος, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αντιβιοτικών και επομένως προτείνουν τη χρήση της μεθόδου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στην οποία λαμβάνεται η επιθυμητή παρεμπόδιση. Παρόλα αυτά, αξ σημειωθεί ότι, η διάμετρος των διαυγών ζωνών εξαρτάται και από το μοριακό βάρος του μορίου του αντιβιοτικού, παράμετρος που επηρεάζει σημαντικά τη διάχυση του αντιβιοτικού στο στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό, και επομένως προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό τη διάμετρο της ζώνης παρεμπόδισης. Είναι δηλαδή δυνατόν ουσίες με ισχυρή αντιβιοτική δράση να εμφανίζουν μικρή ή μηδαμινή ζώνη παρεμπόδισης, αν το μόριό τους είναι μεγάλου μοριακού βάρους.

VIII.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της σημερινής άσκησης είναι η εκτίμηση της ευαισθησίας θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε διάφορα αντιβιοτικά.

VIII.3. Εργασία

Δίνονται καλλιέργειες βακτηρίων των γενών *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* και *Vibrio*, θρεπτικά υλικά και χάρτινα δισκία που έχουν προηγουμένως εμποτιστεί σε διάφορα αντιβιοτικά.

Θερμάνετε σε υδατόλουτρο $T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$ τα στερεοποιημένα θρεπτικά υλικά μέχρις ότου διαυγάσουν πλήρως. Αφήστε τα στη συνέχεια να ψυχθούν σε υδατόλουτρο $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Χωρίστε ένα τρυβλίο Petri σε 4 τεταρτημόρια με τη βοήθεια χάρακα και υαλογραφικού μαρκαδόρου. Μεταφέρετε στο τρυβλίο ασηπτικά 1 ml καλλιέργειας βακτηρίου που θα σας δοθεί. Στο ίδιο τρυβλίο προσθέστε ασηπτικά 9 ml θρεπτικού υλικού (ευρισκομένου σε $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$) και αναμίξτε το μίγμα εμβολίου – θρεπτικού υλικού. Η ανάμιξη θα πρέπει να γίνει αμέσως μετά την προσθήκη του θρεπτικού υλικού, πριν αυτό στερεοποιηθεί. Επίσης θα πρέπει να γίνει ήπια ώστε να μη χυθεί το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο.

Μετά την στερεοποίηση του θρεπτικού υλικού τοποθετείστε στην επιφάνειά του τέσσερα χάρτινα δισκία (ένα σε κάθε τεταρτημόριο) εμποτισμένα σε διαφορετικό αντιβιοτικό το κάθε ένα.

Οδηγείστε τα τρυβλία προς επώαση στον επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Λάβετε παρατηρήσεις μετά από 48 h ή 72 h. Μετρήστε τη διάμετρο των ζωνών παρεμπόδισης. Γράψτε στο τετράδιό σας τα συμπεράσματά σας σχετικά με την ευαισθησία του στελέχους του βακτηρίου που σας δόθηκε στα διάφορα αντιβιοτικά και εξηγήστε σύντομα που οφείλεται η δράση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήσατε.

ΙΧ. ΑΣΚΗΣΗ 7: Φύλο Zygomycota: μορφολογία μυκήλιου, βιολογικός κύκλος.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:393-397, 405-416.

ΙΧ.1. Εισαγωγή

Οι μύκητες που ανήκουν στο φύλο Zygomycota (περιλαμβάνει τις κλάσεις Zygomycetes και Trichomycetes) παράγουν συνήθως άφθονο μυκήλιο χωρίς σέπτα.

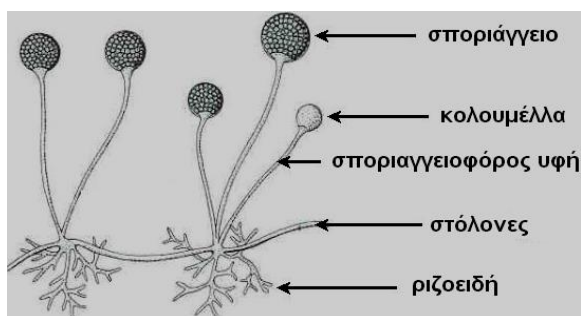
Οι μύκητες Zygomycetes πολλαπλασιάζονται **αγενώς** κατά κανόνα με **σποριαγγειοσπόρια**, σπόρια που δε διαθέτουν αυτόνομη κίνηση και παράγονται εντός χαρακτηριστικών, συνήθως σφαιρικών, πολυπύρηνων κυττάρων, των σποριαγγείων. Τα σποριάγγεια φέρονται επί εξειδικευμένων υφών, των σποριαγγειοφόρων (Εικόνα 7.1).



Εικόνα 7.1
Σποριάγγειο του *Rhizopus* sp.

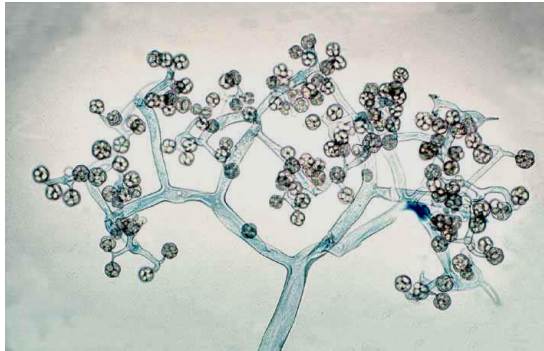
Κάθε σποριάγγειο περιέχει συνήθως 100 έως 100.000 σποριαγγειοσπόρια τα οποία στερούμενα μαστιγίων δε δύνανται να κινούνται αυτόνομα και διασπείρονται συνήθως με τον άνεμο. Για το λόγο αυτό αναφέρονται συχνά ως απλανοσπόρια.

Τα είδη του γένους *Rhizopus* καλλιεργούμενα σε εργαστηριακά θρεπτικά υλικά παράγουν άφθονο εναέριο μυκήλιο με διακλαδώσεις. Κατά διαστήματα εκφύονται συστήματα ριζοειδών που εισέρχονται στο υπόστρωμα και στηρίζουν το μυκήλιο του μύκητα (Εικόνα 7.2). Σε μερικά είδη (π.χ. *Rhizopus stolonifer*) τα ριζοειδή ενώνονται μεταξύ τους με εναέριες υφές, τους στόλους (stolons). Επάνω ακριβώς από κάθε σύστημα ριζοειδών παράγονται, συνήθως κατά δέσμες των 3-4, οι σποριαγγειοφόρες υφές. Η κάθε σποριαγγειοφόρος υφή φέρει επάκρια ένα σφαιρικό σποριάγγειο το οποίο στηρίζεται στο στυλίσκο ή κολουμέλλα που είναι μια σφαιρική ή ωσειδής διόγκωση της σποριαγγειοφόρου υφής.



Εικόνα 7.2
Καρποφορίες, ριζοειδή και στόλους του *Rhizopus stolonifer*.

Μερικά γένη παράγουν μικρά σποριαγγεία, που ονομάζονται σποριαγγείδια, τα οποία περιέχουν λίγα σπόρια (έως 30) (Εικόνα 7.3).

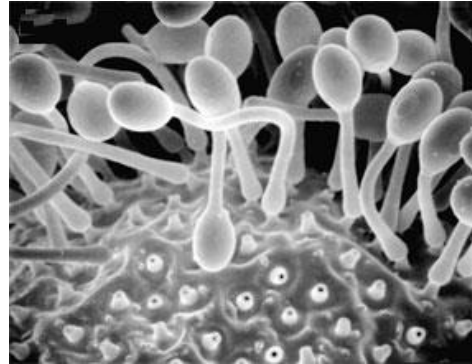


Εικόνα 7.3
Σποριαγγείδια του
Thamnidium sp.

Τα σποριαγγείδια του γένους *Cunninghamella* (και μερικών άλλων γενών) περιέχουν ένα μόνο σπόριο (Εικόνα 7.4).



(α)



(β)

Εικόνα 7.4
Μονόσπορο σποριαγγείδιο του μύκητα *Cunninghamella* sp. (α) σε κοινό μικροσκόπιο (β) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Εγγενώς οι μύκητες της κλάσης Zygomycetes πολλαπλασιάζονται με **ζυγοσπόρια** (Εικόνα 7.5). Τα ζυγοσπόρια έχουν παχιά τοιχώματα, και είναι χαρακτηριστικά της κλάσης, μολονότι παράγονται από ορισμένα μόνο γένη. Η εξειδικευμένη καρποφορία στην οποία δημιουργείται το ζυγοσπόριο (ένα ανά καρποφορία) καλείται ζυγοσποριάγγειο και είναι προϊόν γαμεταγγειακής σύζευξης.



Εικόνα 7.5
Τα ζυγοσποριάγγεια είναι συνήθως σκουρόχρωμα και έχουν παχιά τοιχώματα και τραχιά επιφάνεια. Όταν αποκόπτονται από τις υφές (ζυγοφόρες υφές) συμπαρασύρουν και τους δύο αναρτήρες.

Τα γαμετάγγεια παράγονται όταν δύο γενετικά συμβατές υφές, που καλούνται ζυγοφόρες υφές, έλθουν σε επαφή. Στις ζυγοφόρες υφές

δημιουργούνται μικρές πλευρικές διακλαδώσεις που καλούνται αναρτήρες, στις άκρες των οποίων παράγονται τα γαμετάγγεια. Το προϊόν σύζευξης (πλασμογαμίας των δύο γαμεταγγείων και στη συνέχεια καρυογαμίας των δύο συμβατών πυρήνων) είναι το ζυγοσποριάγγειο το οποίο έχει παχιά τοιχώματα και περιέχει ένα διπλοειδές ζυγοσπόριο. Όταν το ζυγοσποριάγγειο ωριμάσει αποκόπτεται από τις υφές συμπαρασύροντας και τους αναρτήρες. Στη συνέχεια διαρρηγνύεται και το περιεχόμενο ζυγοσπόριο βλαστάνει και παράγει είτε απ' ευθείας μυκήλιο, είτε σποριαγγειοφόρες υφές επί των οποίων παράγονται σποριάγγεια με σποριαγγειοσπόρια.

ΙΧ.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η εμπέδωση του βιολογικού κύκλου των Zygomycetes.

ΙΧ.3. Εργασία

Δίδονται καλλιέργειες σε τρυβλία μυκήτων των γενών *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Thamnidium* και *Zygorhynchus*.

Τοποθετείστε σε αντικειμενοφόρο πλάκα μια σταγόνα απιονισμένου νερού. Μεταφέρετε, με τη βοήθεια μικροβιολογικού γάντζου, λίγο μυκήλιο στη σταγόνα και προσπαθήστε να το διανοίξετε όσο το δυνατόν καλύτερα (με τη βοήθεια γάντζου και κρίκου). Τοποθετείστε στην επιφάνεια του παρασκευάσματος καλυπτρίδα και προχωρήστε σε μικροσκοπική παρατήρηση (αρχικά στη μεγέθυνση X10 και στη συνέχεια X40).

Παρατηρήστε ότι το μυκήλιο των Zygomycota δεν έχει εγκάρσια χωρίσματα (σέπτα). Παρατηρήστε στην καλλιέργεια του *Rhizopus* sp. σποριαγγειοφόρες υφές με σποριάγγεια που στηρίζονται στο στυλίσκο (ή κολουμέλλα). Εντοπίστε τα σποριαγγείδια των μυκήτων *Cunninghamella* sp. και *Thamnidium* sp.. Οι μύκητες αυτοί είναι ετερόθαλλοι και επομένως οι καθαρές καλλιέργειες συγκεκριμένων στελεχών δεν παράγουν ζυγοσπόρια. Ο μύκητας *Zygorhynchus* sp. είναι ομόθαλλος και έτσι καλλιεργούμενος σε καθαρή καλλιέργεια παράγει ζυγοσπόρια. Παρατηρήστε τα ζυγοσποριάγγεια και τους αναρτήρες του *Zygorhynchus* sp..

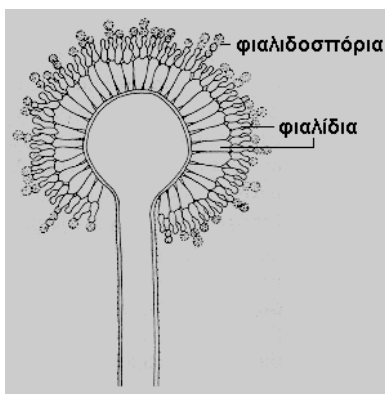
Γράψτε στο τετράδιό σας της παρατηρήσεις σας σχετικά με το βιολογικό κύκλο των Zygomycota. Σχεδιάστε τις καρποφορίες των ανωτέρω μυκήτων.

Χ. ΑΣΚΗΣΗ 8: Φύλο Ascomycota: μορφολογία μυκηλίου, βιολογικός κύκλος.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:393-400, 423-428, 435-438.

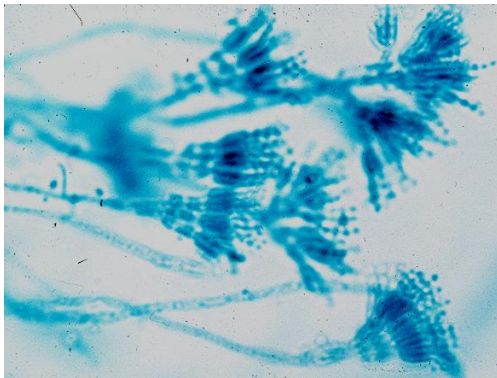
Χ.1. Εισαγωγή

Το μυκήλιο των νηματοειδών μυκήτων του φύλου Ascomycota φέρει εγκάρσια χωρίσματα (σέπτα). Οι μύκητες αυτοί πολλαπλασιάζονται **αγενώς** με θραύσματα του μυκηλίου ή συνηθέστερα με σπόρια (χλαμυδοσπόρια ή κονίδια). Τα κονίδια παράγονται επί κονιδιοφόρων υφών με εκβλάστηση (και ονομάζονται βλαστοσπόρια), με κατάτμηση των υφών (αρθροσπόρια) ή από εξειδικευμένα σποριοφόρα κύτταρα, τα φιαλίδια (φιαλιδιοσπόρια – Εικόνες 8.1 και 8.2).



Εικόνα 8.1

Σκαρίφημα κονιδιοφόρου του *Aspergillus flavus*.



Εικόνα 8.2

Κονιδιοφόροι του *Penicillium* sp..

Εγγενώς πολλαπλασιάζονται με ασκοσπόρια, σπόρια χαρακτηριστικά των Ascomycota που παράγονται σε εξειδικευμένα κύτταρα, τους ασκούς (Εικόνα 8.3).



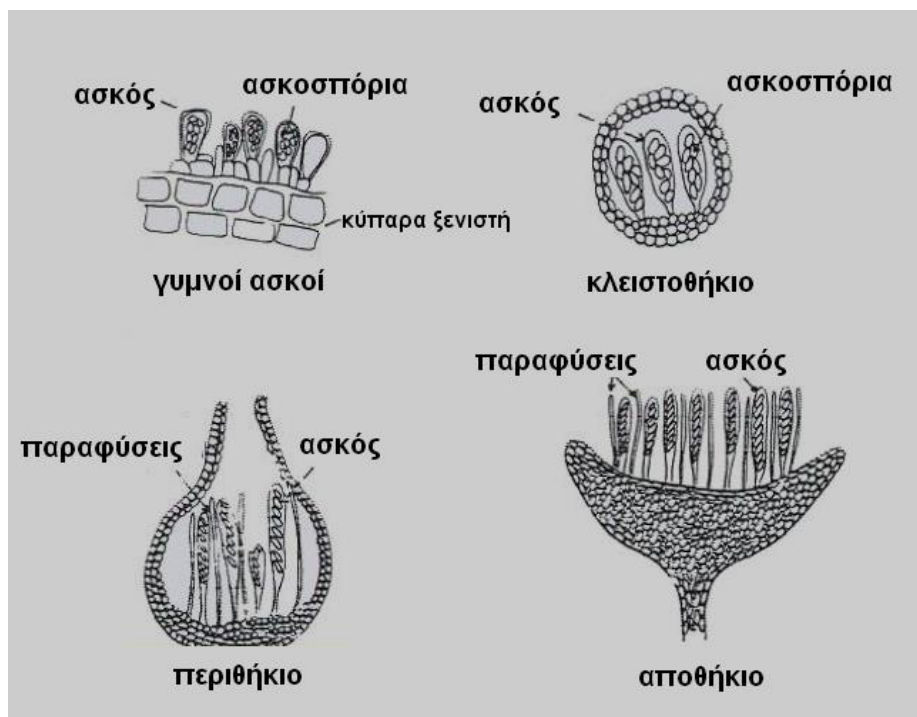
Εικόνα 8.3

Ασκοί και ασκοσπόρια.

Για να πραγματοποιηθεί εγγενής αναπαραγωγή απαραίτητη συνθήκη είναι η παρουσία σε ένα κύτταρο δύο απλοειδών πυρήνων αντιθέτου συζευκτικού τύπου οι οποίοι μετά από ένωση (καρυογαμία), σχηματίζουν ένα διπλοειδή πυρήνα. Στα Ascomycota η συνθήκη αυτή εξασφαλίζεται με διαφόρους τρόπους (γαμεταγγειακή σύζευξη, γαμεταγγειακή επαφή, σπερματογαμία και σωματογαμία ή πλασμογαμία).

Κατά τη **γαμεταγγειακή επαφή** δύο ανόμοια μορφολογικά γαμετάγγεια, το «θήλυ» ασκογόνιο και το «άρρεν» ανθηρίδιο έρχονται σε επαφή και οι πυρήνες του ανθηριδίου μεταφέρονται στο ασκογόνιο μέσω μιας εξειδικευμένης υφής του ασκογονίου, του καλούμενου τριχόγυνου. Οι ασκοί παράγονται στο ακραίο τμήμα εξειδικευμένων υφών (των ασκογόνων υφών) που εκφύονται στην επιφάνεια του ασκογονίου. Μετά την καρυογαμία το διπλοειδές ζυγωτό υφίσταται μείωση από την οποία προκύπτουν τέσσερις απλοειδείς πυρήνες. Αυτοί, μετά από μια μιτωτική διαίρεση που συνήθως ακολουθεί, θα δώσουν γένεση σε οκτώ απλοειδείς πυρήνες. Γύρω από κάθε πυρήνα συγκεντρώνεται κυτταρόπλασμα το οποίο στη συνέχεια περιβάλλεται από τοιχώματα. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται οκτώ ασκοσπόρια σε κάθε ασκό. Κατ' εξαίρεση σε μερικά είδη πραγματοποιούνται εντός του ασκού περισσότερες μιτωτικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα να παράγονται περισσότερα από οκτώ ασκοσπόρια, ενώ σε άλλα οι ασκοί περιέχουν λιγότερα από οκτώ ασκοσπόρια (1 έως 4).

Συχνά από τη βάση του ασκογονίου εκφύονται απλοειδείς υφές οι οποίες σχηματίζουν ψευδοϊστό. Ο ψευδοϊστός αυτός διαφοροποιείται προς καρποφορία (ασκοκάρπιο) που προστατεύει, στον ένα ή τον άλλο βαθμό τους ασκούς (Εικόνα 8.4).



Εικόνα 8.4
Καρποφορίες εγγενούς αναπαραγωγής των Ascomycota.

Οι συνηθέστεροι τύποι ασκοκαρπίων είναι τα **κλειστοθήκια**, που είναι κλειστές σφαιρικές καρποφορίες οι οποίες όταν ωριμάσουν διαρρηγνύονται και ελευθερώνουν τα ασκοσπόρια, τα **περιθήκια**, που είναι φιαλοειδείς

καρποφορίες με πόρο (που καλείται **οστιόλη**), από το οποίο εξέρχονται τα ασκοσπόρια, και τα **αποθήκια**, που είναι ανοιχτές καρποφορίες μορφής δίσκου. Στα περιθήκια και στα κλειστοθήκια μεταξύ των ασκών εκφύονται στείρες αποφύσεις που καλούνται **παραφύσεις** και φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην απελευθέρωση των ασκοσπορίων. Μερικά είδη δεν παράγουν ασκοκάρπια. Σε αυτά οι ασκοί είναι γυμνοί.

X.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η εμπέδωση του βιολογικού κύκλου των Ascomycota.

X.3. Εργασία

Δίνονται καλλιέργειες σε τρυβλία των μυκήτων *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. (Plectomycetes) και *Morchella* sp. (Discomycetes) καθώς και καρποσώματα του μύκητα *Morchella* sp.. Δίνονται επίσης μόνιμα παρασκευάσματα καρποφοριών των Ascomycota.

Προετοιμάστε παρασκευάσματα από τις καλλιέργειες των μυκήτων κατά τα γνωστά και προχωρήστε σε μικροσκοπικές παρατηρήσεις (αρχικά στη μεγέθυνση X10 και στη συνέχεια X40).

Παρατηρήστε ότι το μυκήλιο των Ascomycota έχει εγκάρσια χωρίσματα (σέπτα).

Παρατηρήστε στις καλλιέργειες των *Aspergillus* sp. και *Penicillium* sp. τους κονιδιοφόρους και τα κονίδια.

Πραγματοποιήστε με τη βοήθεια λεπίδας λεπτές (κατά το δυνατόν) τομές του καρποσώματος του μύκητα *Morchella* sp.. Τοποθετήστε το δείγμα σε αντικειμενοφόρο πλάκα και προσθέστε μια σταγόνα απιονισμένου νερού. Επικαλύψτε το παρασκεύασμα με καλυπτρίδα και πιέστε τη προκειμένου να περιορίσετε το βάθος πεδίου κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. Προχωρήστε σε μικροσκοπική παρατήρηση ασκών και ασκοσπορίων.

Δείτε τα μόνιμα παρασκευάσματα των καρποφοριών των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* και της τάξης Erysiphales που θα σας δοθούν.

Γράψτε στο τετράδιό σας της παρατηρήσεις σας σχετικά με το βιολογικό κύκλο των Ascomycota. Σχεδιάστε τις καρποφορίες των ανωτέρω μυκήτων.

XI. ΑΣΚΗΣΗ 9: Φύλο Basidiomycota: μορφολογία μυκήλιου, βιολογικός κύκλος.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:393-400, 469-474, 486-489.

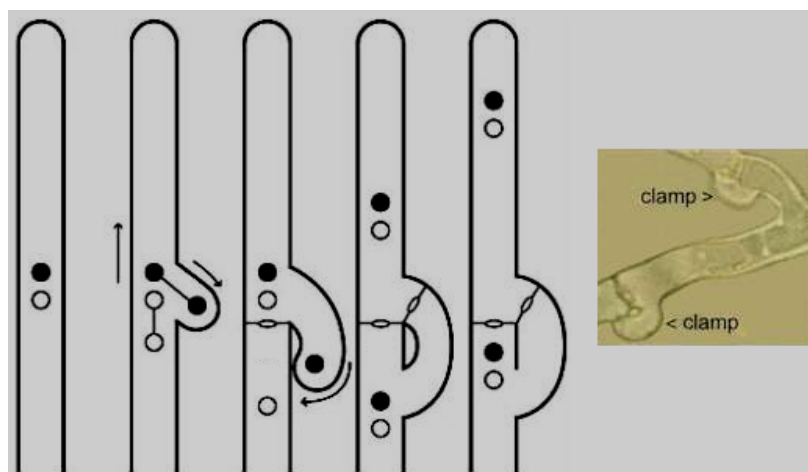
XI.1. Εισαγωγή

Οι περισσότεροι μύκητες του φύλου παράγουν άφθονο, λευκό ή ανοιχτόχρωμο μυκήλιο που φέρει δολίπορα σέπτα.

Το μυκήλιο των ετεροθαλλικών ειδών του φύλου Basidiomycota διέρχεται κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου από δύο διακριτά στάδια, κατά τα οποία ονομάζεται πρωτοταγές και δευτεροταγές μυκήλιο, αντίστοιχα. Το **πρωτοταγές μυκήλιο** προέρχεται από τη βλάστηση σποριών εγγενούς αναπαραγωγής (βασιδιοσποριών) ή αγενούς αναπαραγωγής (κονιδίων ή μικροκονιδίων) και είναι μονοκάρυο και ομοκάρυο.

Το **δευτεροταγές μυκήλιο** είναι το προϊόν σύζευξης (αναστόμωσης) δύο πρωτοταγών αντιθέτου συζευκτικού τύπου υφών (ή μιας υφής και ενός σπερματίου). Το δευτεροταγές μυκήλιο είναι δικάρυο και ετεροκάρυο.

Η δικαρυωτική κατάσταση του αυξανόμενου δευτεροταγούς μυκηλίου εξασφαλίζεται σε πολλά Basidiomycota με τη βοήθεια εξειδικευμένων δομών που ονομάζονται **κρίκοι** (Εικόνα 9.1).



Εικόνα 9.1

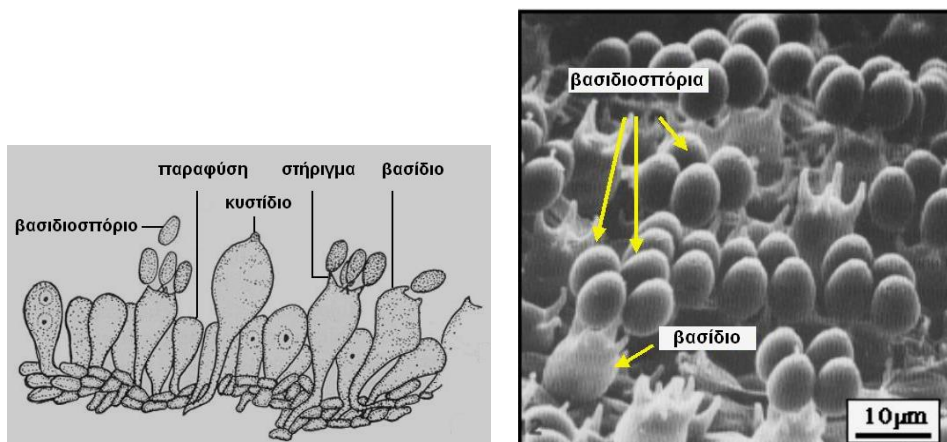
Σχηματισμός κρίκου στο μυκήλιο των Basidiomycota.

Με τη βοήθεια των κρίκων, δημιουργούνται νέα δικάρυα μυκηλιακά διαμερίσματα χωρίς να διαταραχθεί η δικαρυωτική φύση του υπο-επάκριου διαμερίσματος. Μολονότι η παρουσία κρίκων σε μυκήλιο υποδηλώνει γενικά ότι αυτό είναι δικάρυο, αξίζει να σημειωθεί ότι μερικά είδη σχηματίζουν κρίκους και στο ομοκάρυο, ενώ άλλα δεν σχηματίζουν κρίκους στο δικάρυο μυκήλιο.

Τα Basidiomycota πολλαπλασιάζονται **αγενώς** με εκβλάστηση ή με τη βοήθεια σποριών όπως κονιδίων, αρθροσποριών ή ωιδίων.

Εγγενώς πολλαπλασιάζονται με εξειδικευμένα σπόρια, τα βασιδιοσπόρια που είναι άχρωμα ή ελαφρά χρωματισμένα, μονοκύτταρα και απλοειδή. Δύναται να βλαστήσουν και να παράγουν απευθείας πρωτοταγές μυκήλιο (direct germination), ή να παράγουν αγενώς σπόρια (κονίδια, μικροκονίδια) τα οποία βλαστάνουν και παράγουν πρωτοταγές

μυκήλιο (indirect germination). Τα βασιδιοσπόρια παράγονται σε εξειδικευμένα όργανα, τα βασίδια (Εικόνα 9.2), που δύναται να είναι μονοκύτταρα (ολοβασίδια) ή πολυκύτταρα (φραγμοβασίδια ή ετεροβασίδια).



Εικόνα 9.2

Καρποφορίες (βασίδια) και σπόρια (βασιδιοσπόρια) εγγενούς αναπαραγωγής των Basidiomycota.

Στα αυτά λαμβάνει χώρα καρυογαμία και μείωση από την οποία προκύπτουν τέσσερις απλοειδείς πυρήνες που μεταναστεύουν στις άκρες τεσσάρων επιφανειακών ακίδων ή στηριγμάτων, εξωτερικά των βασιδίων. Εκεί σχηματίζονται ισάριθμα βασιδιοσπόρια.

Σε μερικά είδη, όπως το *Agaricus brunnescens (bisporus)*, το κάθε βασίδιο παράγει δύο μόνο βασιδιοσπόρια που περιέχουν το κάθε ένα δύο πυρήνες αντιθέτου συζευκτικού τύπου. Σε άλλα, τη μείωση ακολουθεί μιτωτική διαίρεση με αποτέλεσμα να παράγονται οκτώ απλοειδείς πυρήνες και ισάριθμα βασιδιοσπόρια (όπως για παράδειγμα σε είδη του φυτοπαθογόνου γένους *Puccinia* της τάξης Uredinales).

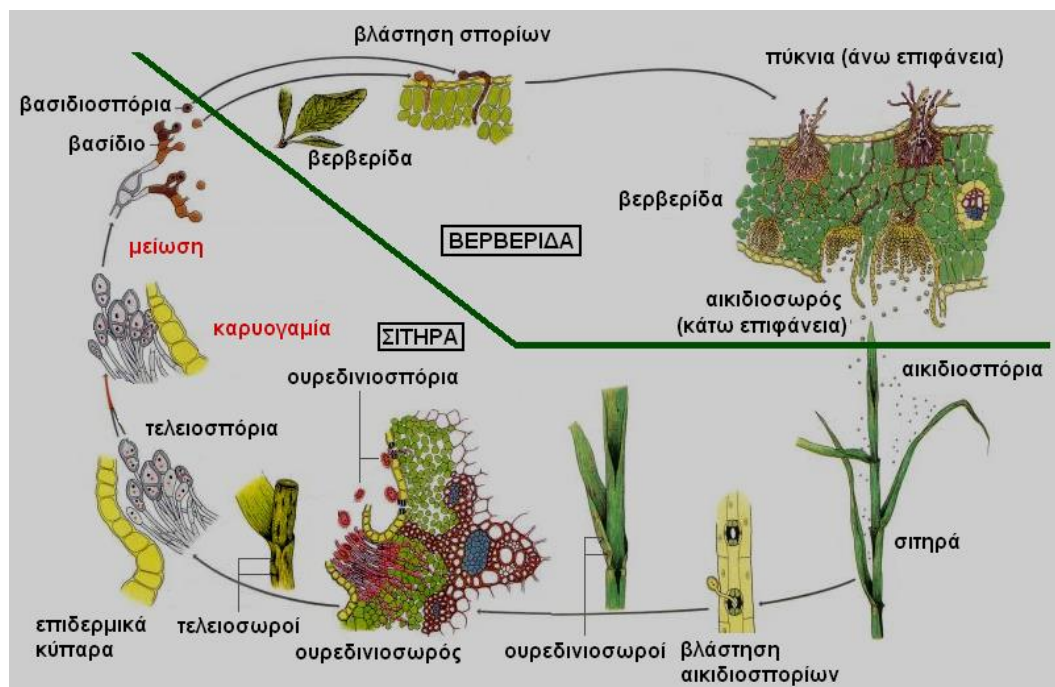
Τα βασίδια παράγονται είτε μεμονωμένα είτε πολλά μαζί επί γόνιμου στρώματος που επενδύει επιφάνειες του θαλλού και δίνουν γένεση στο υμένιο. Το υμένιο αποτελείται επίσης και από στείρα όργανα, τις παραφύσεις και τα κυστίδια, των οποίων ο ρόλος δεν είναι γνωστός.

Τα είδη που ανήκουν στην τάξη Uredinales είναι οι μόνοι μύκητες του φύλου Basidiomycota που δεν φέρουν δολίπορα αλλά απλά σέπτα, ούτε παράγουν βασιδιοκάρπια. Επίσης το δευτεροταγές μυκήλιο δε φέρει κρίκους. Το γένος *Puccinia* είναι το μεγαλύτερο της τάξης Uredinales. Το είδος *Puccinia graminis* είναι το παθογόνο αίτιο της μαύρης σκωρίασης των σιτηρών. Ο μύκητας αυτός ολοκληρώνει το βιολογικό του κύκλο σε δύο ξενιστές, το σιτάρι (κύριος ξενιστής) και τη βερβερίδα (εναλλακτικός ξενιστής) (Εικόνα 9.3).

Τα βασιδιοσπόρια του μύκητα μολύνουν τα φύλλα της βερβερίδας, βλαστάνουν, και εισέρχονται στους ιστούς των φύλλων του ξενιστή όπου σχηματίζουν φιαλοειδείς καρποφορίες, τα πύκνια, το στόμιο των οποίων προεξέχει της επιφάνειας των φύλλων.

Στα πύκνια σχηματίζεται δικάρυο μυκήλιο που αναπτύσσεται στους ιστούς των φύλλων της βερβερίδας και σχηματίζει, στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, χαρακτηριστική κυπελλοειδή καρποφορία, τον αικιδιοσωρό. Σε αυτόν παράγονται δικάρυα σπόρια, τα αικιδιοσπόρια, τα οποία διασπείρονται και μολύνουν στελέχη σιτηρών. Εκεί βλαστάνουν και

σχηματίζουν κάτω από την επιδερμίδα ουρεδινιοσωρούς, καρποφορίες στις οποίες παράγονται τα ουρεδινιοσπόρια. Αυτά ελευθερώνονται μετά από διάρρηξη της επιδερμίδας και σχηματισμό φλύκταινας και μολύνουν νέα φυτά, διαδικασία η οποία επαναλαμβάνεται μέχρι την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των φυτών.



Εικόνα 9.3
Βιολογικός κύκλος του *Puccinia graminis*.

Προς το τέλος της βλαστικής περιόδου οι ουρεδινιοσωροί μεταπίπτουν σε τελειοσωρούς. Οι καρποφορίες αυτές, που έχουν μαύρο χρώμα, παράγουν παχύτοικα δικάρυα σπόρια, τα τελειοσπόρια. Σε αυτά λαμβάνει χώρα καρυογαμία και μείωση, ακολουθούμενη από την παραγωγή προμυκηλίου και τεσσάρων βασιδιοσπορίων. Αυτά είναι ικανά να μολύνουν φύλλα βερβερίδας.

XI.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η εμπέδωση του βιολογικού κύκλου των Basidiomycota.

XI.3. Εργασία

Δίνονται καλλιέργειες σε τρυβλία του μύκητα *Pleurotus ostreatus* και καρποσώματα των μυκήτων *Agaricus brunnescens (bisporus)* και *Pleurotus ostreatus*. Δίνονται επίσης μόνιμα παρασκευάσματα καρποφοριών των Basidiomycota.

Προετοιμάστε παρασκευάσματα από τις καλλιέργειες των μυκήτων κατά τα γνωστά και προχωρήστε σε μικροσκοπικές παρατηρήσεις (αρχικά στη μεγέθυνση X10 και στη συνέχεια X40).

Παρατηρήστε ότι το μυκήλιο του *Pleurotus ostreatus* έχει εγκάρσια χωρίσματα (σέπτα) και κρίκους.

Πραγματοποιήστε με τη βοήθεια λεπίδας λεπτές (κατά το δυνατόν) τομές των καρποσωμάτων των μυκήτων *Agaricus brunnescens (bisporus)* και

Pleurotus ostreatus και προχωρήστε σε μικροσκοπική παρατήρηση βασιδίων και βασιδιοσπορίων κατά τα γνωστά.

Πραγματοποιείστε μικροσκοπικές παρατηρήσεις των μονίμων παρασκευασμάτων των καρποφοριών των μυκήτων της τάξης Agaricales (*Agaricus* sp), Uredinales (*Puccinia graminis*) και Ustilaginales (*Ustilago* sp.) που θα σας δοθούν.

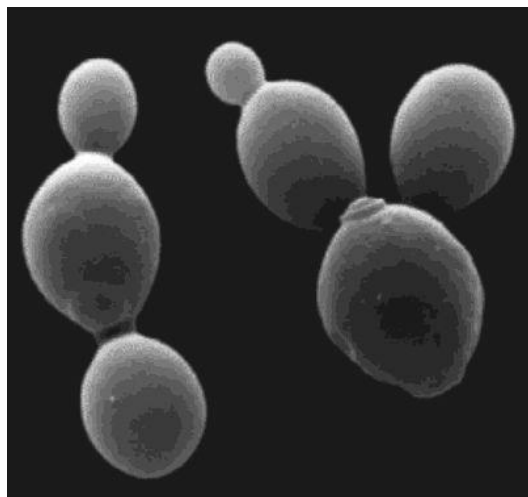
Γράψτε στο τετράδιό σας της παρατηρήσεις σας σχετικά με το βιολογικό κύκλο των Basidiomycota. Σχεδιάστε τις καρποφορίες των ανωτέρω μυκήτων.

XII. ΑΣΚΗΣΗ 10. Ζύμες και ζυμοειδή.

Οι φοιτητές θα πρέπει να έχουν διαβάσει την ακόλουθη ύλη του βιβλίου: Σελ.:399, 464-468.

XII.1. Εισαγωγή

Στην τάξη Saccharomycetales (Ascomycota) περιλαμβάνονται οι ζύμες, μικροοργανισμοί μεγάλης σπουδαιότητας για τη βασική βιολογική έρευνα και τη βιομηχανία. Οι ζύμες δεν παράγουν ασκογόνες υφές και ασκοκάρπια και έτσι διαφοροποιούνται από τους νηματοειδείς μύκητες. Πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλάστηση των κυττάρων (Εικόνα 10.1), με κονίδια ή με αρθροσπόρια. Εγγενώς πολλαπλασιάζονται με ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια όταν απελευθερωθούν βλαστάνουν και δίνουν γένεση σε βλαστικά απλοειδή κύτταρα, ικανά να αναπαράγονται αγενώς με εκβλαστήσεις.



Εικόνα 10.1
Κύτταρα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* με εκβλαστήσεις.

Μερικές ζύμες της τάξης Saccharomycetales παράγουν υπό ορισμένες συνθήκες ψευδομυκήλιο ή ακόμα και αληθές μυκήλιο. Για παράδειγμα, είδη του γένους *Candida* (με μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογία, την τεχνολογία τροφίμων και την ιατρική) σχηματίζουν ψευδομυκήλιο ή αληθές μυκήλιο και πολλαπλασιάζονται μόνον αγενώς (Εικόνα 10.2). Ψευδομυκήλιο ή αληθές μυκήλιο παράγει επίσης και το είδος *Yarrowia lipolytica* (το οποίο παλαιότερα είχε τοποθετηθεί στο γένος *Candida*).



Εικόνα 10.2
Ψευδομυκήλιο της ζύμης
Candida albicans

Ζύμες συναντούμε και στο φύλο Basidiomycota (τάξη Sporidiales). Πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλαστήσεις και εγγενώς με βασιδιοσπόρια. Αυτές είναι τοποθετημένες στα γένη *Rhodospiridium* (*Rhodotorula*), *Leucospiridium*, *Aessosporon* και *Sporidiobolus*.

XII.2. Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η μικροσκόπηση ζυμών των φύλων Ascomycota και Basidiomycota καθώς επίσης και η καλλιέργεια ζυμών για παραγωγή ψευδομυκηλίου.

XII.3. Εργασία

Δίνονται καλλιέργειες σε τρυβλία των ζυμών *Yarrowia lipolytica*, *Candida robusta*, *Candida boidinii*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae* και μόνιμα παρασκευάσματα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*.

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήστε μια σταγόνα νερού και σε αυτή μεταφέρεται ασηπτικά με το βακτηριολογικό κρίκο κύτταρα των ζυμών. Τοποθετείστε καλυπτρίδα και προχωρήστε σε μικροσκοπικές παρατηρήσεις (αρχικά στη μεγέθυνση X10, και στη συνέχεια X40).

Δείτε τα μόνιμα παρασκευάσματα που θα σας επιδειχθούν από τους διδάσκοντες.

Παρατηρήστε τη μορφολογία των κυττάρων (σχήμα, μέγεθος), τα αρθροσπόρια και τις εκβλαστήσεις. Σημειώστε τις παρατηρήσεις σας στο τετράδιό σας.

Σε τρυβλία Petri τοποθετείστε δύο αποστειρωμένες γυάλινες ράβδους σε παράλληλη διάταξη. Τοποθετείστε ασηπτικά επί των ράβδων μια αποστειρωμένη αντικειμενοφόρο πλάκα και προσθέστε λεπτό στρώμα ρευστοποιημένου θρεπτικού υλικού Malt Extract Agar. Κλείστε το τρυβλίο και αφήστε το θρεπτικό υλικό να στερεοποιηθεί. Εμβολιάστε στη συνέχεια με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου την αντικειμενοφόρο πλάκα με κύτταρα ζύμης, σύροντας τον κρίκο κατά μήκος της μεγάλης διάστασης της πλάκας. Τοποθετείστε μια αποστειρωμένη καλυπτρίδα στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας καλύπτοντας μέρος της παραγής που δημιούργησε ο κρίκος, προσθέστε 2-3 ml αποστειρωμένου διαλύματος γλυκερόλης (20%) στον πυθμένα του τρυβλίου και οδηγείτε το τρυβλίο στον επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία T=28 °C.

Πραγματοποιείτε μικροσκοπικές παρατηρήσεις μετά από 48 h ή 72 h στη μεγέθυνση X40.

Σχεδιάστε στο τετράδιό σας το ψευδομυκήλιο και γράψτε τις παρατηρήσεις σας σχετικά με την ικανότητα παραγωγής ψευδομυκηλίου από τα διάφορα γένη των ζυμών που θα σας δοθούν.