

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

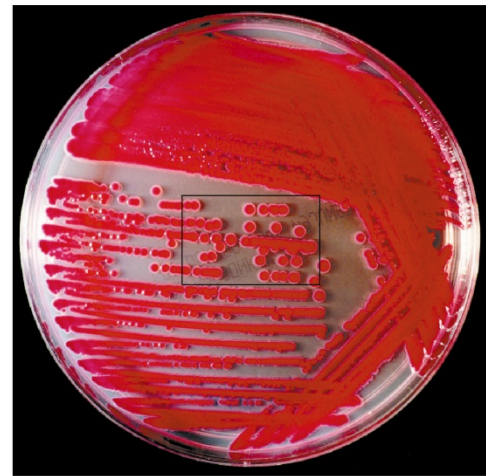
Γιώργος Τσιάμης

Αναπληρωτής Καθηγητής

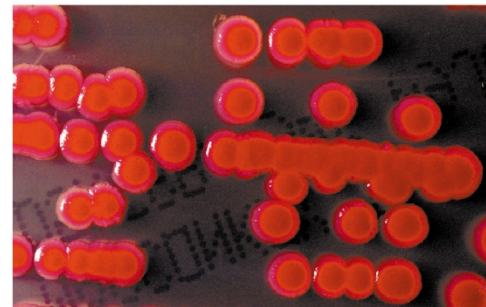
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας

Εικόνα 5.2

Παραδείγματα βακτηριακών αποικιών. Οι αποικίες είναι ορατές μάζες κυττάρων που σχηματίζονται από διαδοχικές διαιρέσεις ενός ή λίγων κυττάρων. Το μέγεθος, το σχήμα, η υφή, και το χρώμα μιας βακτηριακής αποικίας καθορίζονται από τον οργανισμό που τις σχηματίζει. Ανάλογα με το μέγεθος και την οργάνωση των κυττάρων στην αποικία, ο αριθμός κυττάρων από τα οποία αυτή αποτελείται μπορεί να ποικίλλει σημαντικά. Δεν είναι ασυνήθιστες αποικίες με πάνω από ένα δισεκατομμύριο μεμονωμένα κύτταρα. (α) *Serratia marcescens*, ανάπτυξη σε άγαρ MacConkey. (β) Απεικόνιση σε μεγαλύτερη μεγέθυνση των αποικιών που περιέχονται στο τετράγωνο της εικόνας (α). (γ) *Pseudomonas aeruginosa*, που αναπτύσσεται σε άγαρ τρυπτικής και σόγιας. (δ) *Shigella flexneri*, ανάπτυξη σε άγαρ MacConkey.



(α)



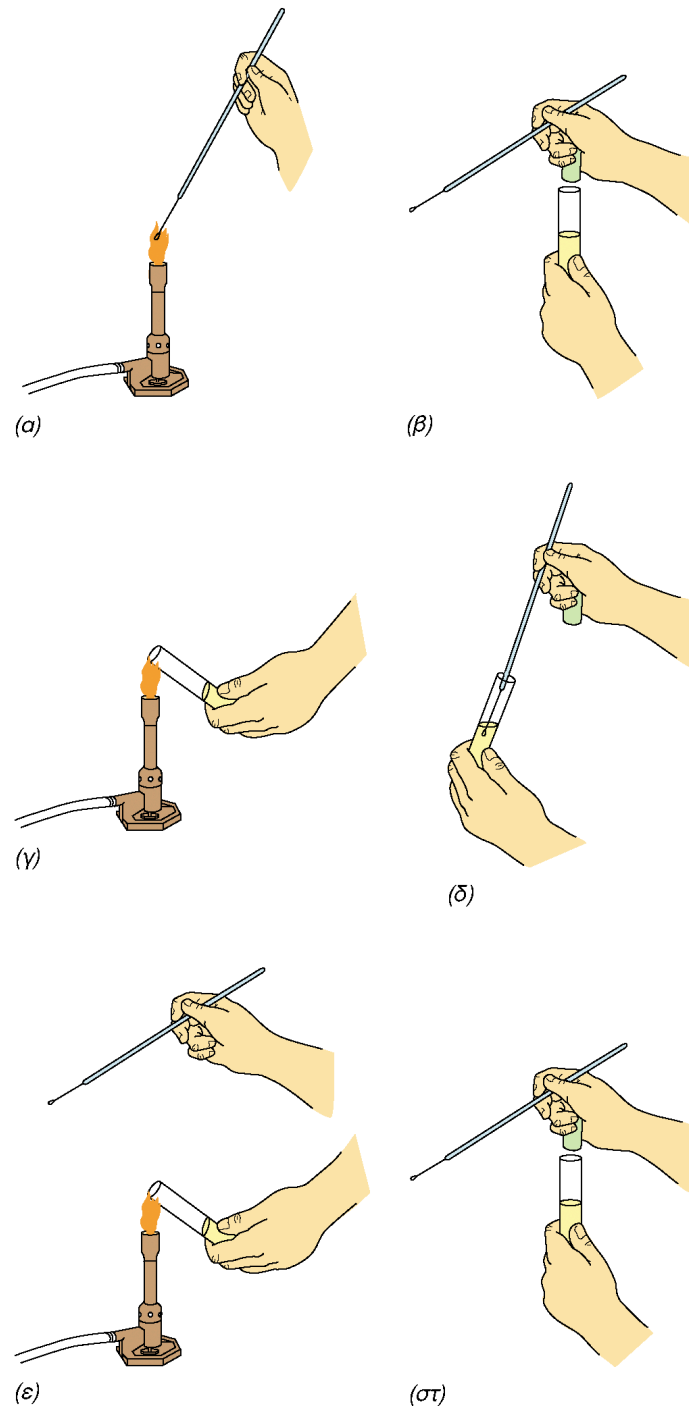
(β)



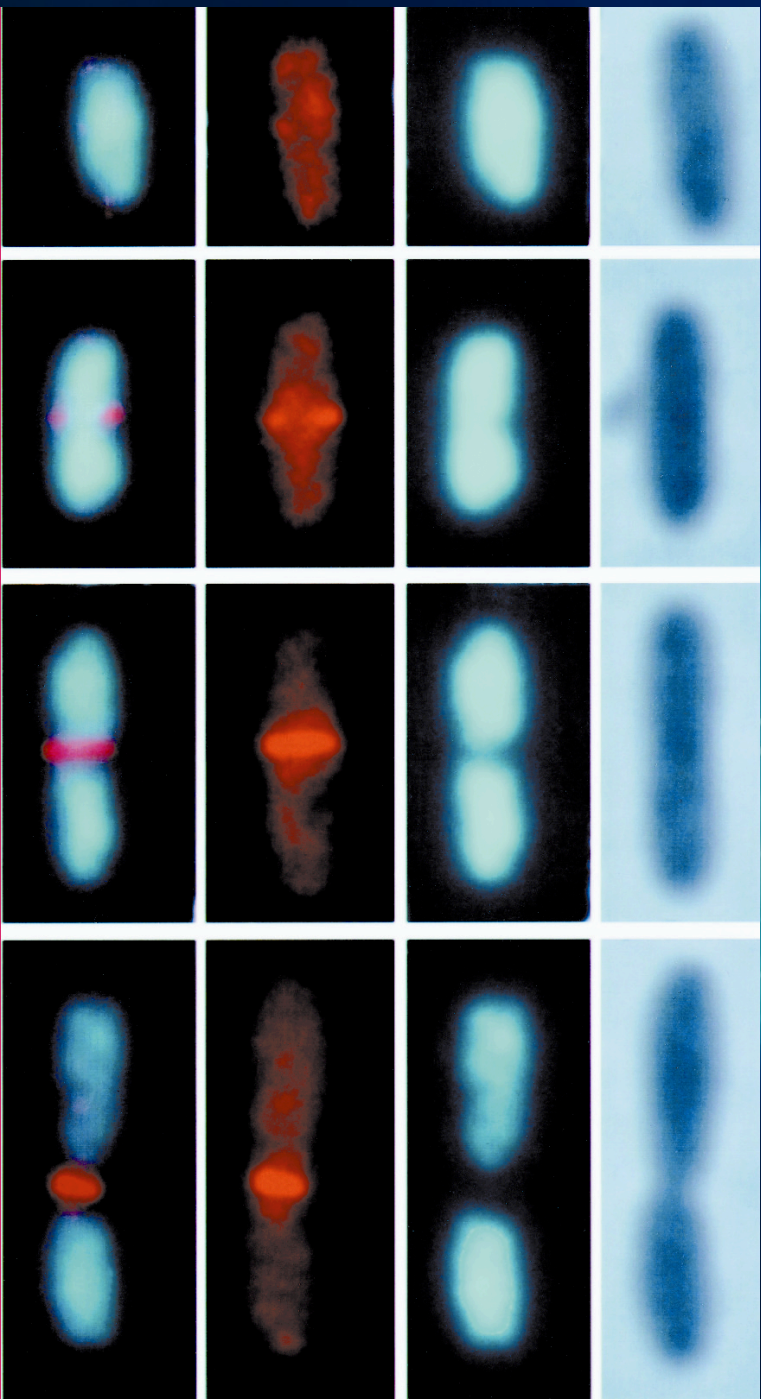
(γ)



(δ)



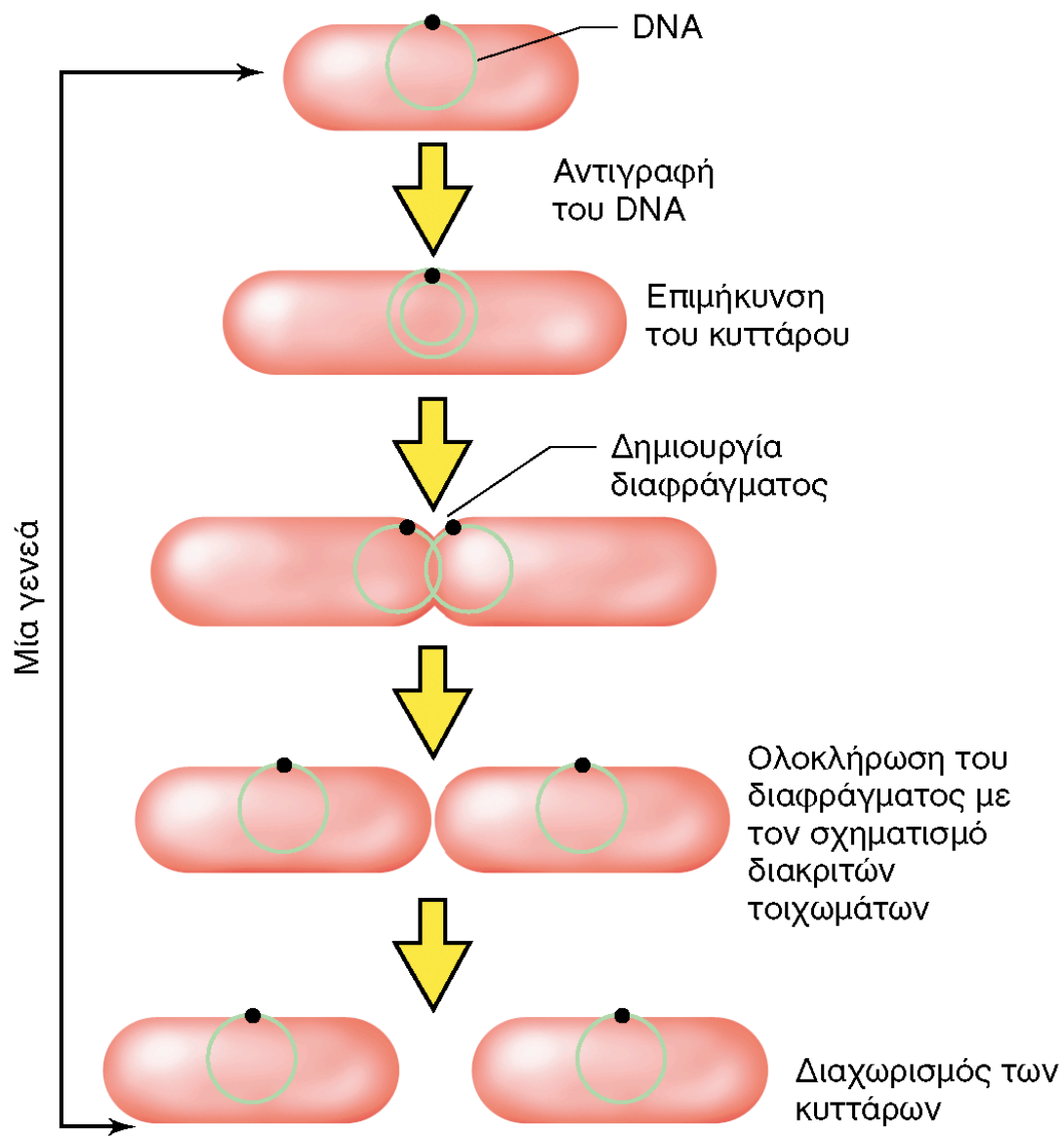
Εικόνα 5.3 Ασπτική μεταφορά. (α) Ο βρόχος ενοφθαλμισμού θερμαίνεται μέχρι να ερυθροπυρωθεί και ψύχεται για λίγο στον αέρα. (β) Αφαιρούμε το πώμα του δοκιμαστικού σωλήνα. (γ) Περνάμε το άκρο του σωλήνα μέσα από τη φλόγα. (δ) Το δείγμα μεταφέρεται στον αποστειρωμένο βρόχο ενοφθαλμισμού. (ε) Μετά τη λήψη του δείγματος με τον βρόχο ενοφθαλμισμού, περνάμε πάλι τον σωλήνα μέσα από τη φλόγα και μεταφέρουμε το δείγμα σε νέο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. (στ) Επανατοποθετούμε το πώμα στον σωλήνα. Ο βρόχος ενοφθαλμισμού πυρακτώνεται πάλι πριν την περάτωση της εργασίας.



ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ

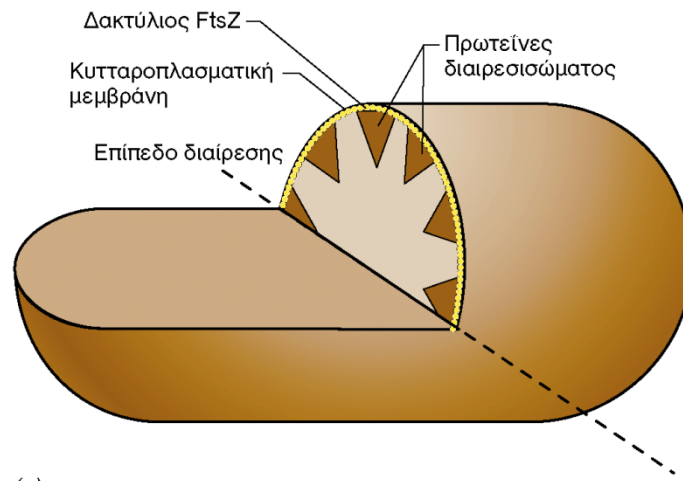
6

Κυτταρική διαίρεση ονομάζεται η διαδικασία της δημιουργίας δύο κυττάρων από ένα. Στα ραβδόμορφα βακτήρια η διαδικασία τυπικά πραγματοποιείται μέσω *διχοτόμησης*, δηλ. με τη σταδιακή μεγέθυνση του κυττάρου την οποία ακολουθεί ο ισομερής διαχωρισμός του σε δύο κύτταρα. Την κυτταρική διαίρεση υποβοηθούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη διαίρεσης *FtsZ*, που εμφανίζεται με χρώση στα κύτταρα της παρακάτω εικόνας. Μόρια πρωτεΐνης *FtsZ* σχηματίζουν δακτύλιο στο μέσο του κυττάρου, υποδεικνύοντας το σημείο διαίρεσής του. Όταν συμβεί αυτό, ενεργοποιούνται άλλες πρωτεΐνες κυτταρικής διαίρεσης, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν μια σειρά συμβάντων που καταλήγουν στη διαίρεση του κυττάρου.

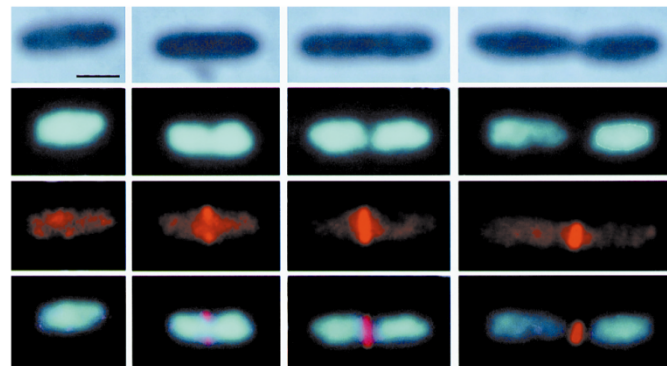


Εικόνα 6.1

Η όλη διαδικασία διχοτόμησης ενός ραβδόμορφου προκαρυωτικού οργανισμού. Για λόγους απλότητας, το πυρηνοειδές απεικονίζεται ως ένας απλός πράσινος κύκλος.



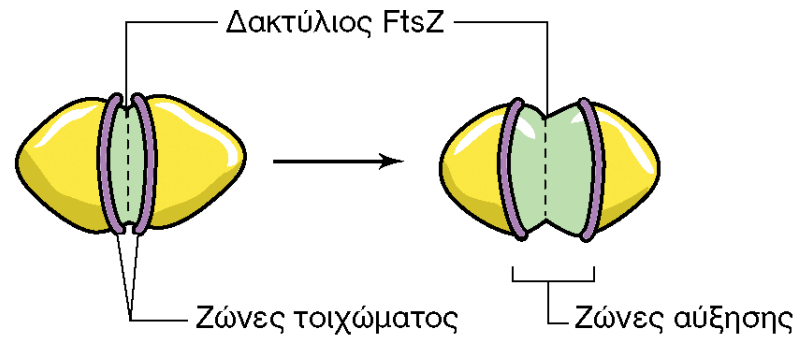
(a)



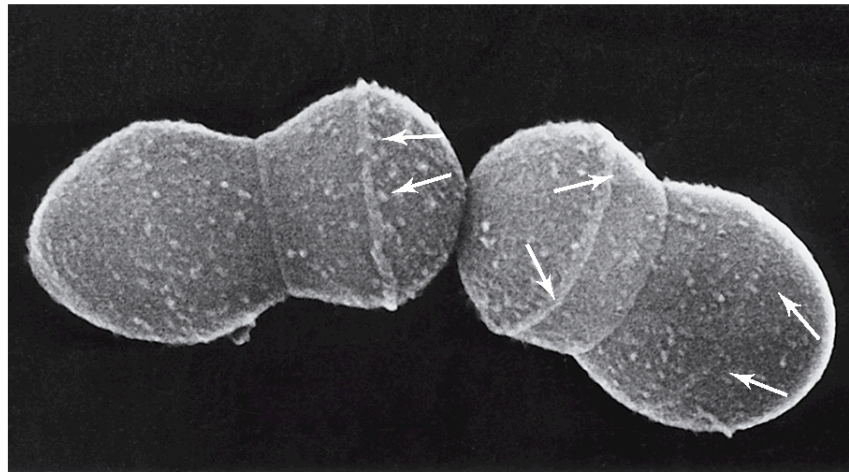
T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

(β)

Εικόνα 6.2 Ο δακτύλιος FtsZ και η κυτταρική διαίρεση. (α) Εγκάρσια τομή ραβδόμορφου κυττάρου, όπου φαίνονται τα μόρια του δακτυλίου FtsZ γύρω από το επίπεδο της διαίρεσης. (β) Σχηματισμός και αποδόμηση του δακτυλίου FtsZ κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στο βακτήριο *Escherichia coli*. Μικροσκοπία: άνω σειρά, αντίθεση φάσεων· δεύτερη σειρά, χρώση του πυρηνοειδούς· τρίτη σειρά, χρώση των κυττάρων με αντιδραστήριο ειδικό για τον δακτύλιο FtsZ· τέταρτη σειρά, συνδυασμένη χρώση πυρηνοειδούς και δακτυλίου FtsZ. Στάδια κυτταρικής διαίρεσης: πρώτη στήλη, ο δακτύλιος FtsZ δεν έχει ακόμη σχηματιστεί· δεύτερη στήλη, ο δακτύλιος FtsZ εμφανίζεται με την έναρξη διαχωρισμού των πυρηνοειδών· τρίτη στήλη, πλήρης σχηματισμός του δακτυλίου FtsZ με την επιμήκυνση του κυττάρου· τέταρτη στήλη, αποδόμηση του δακτυλίου FtsZ και κυτταρική διαίρεση. Δείκτης κλίμακας στη φωτογραφία πάνω αριστερά, 1 μm.



(a)



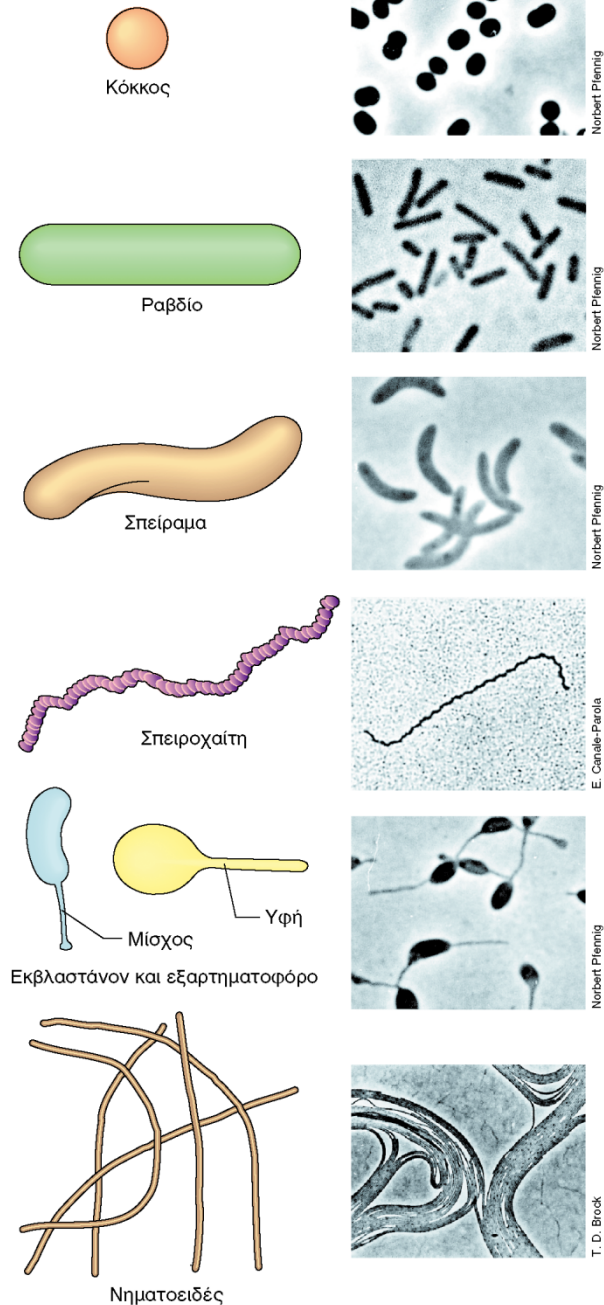
A. Umeda and K. Amako

(β)

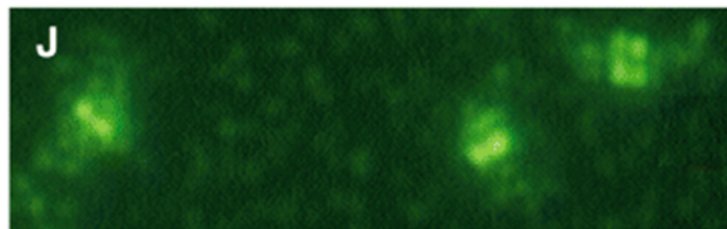
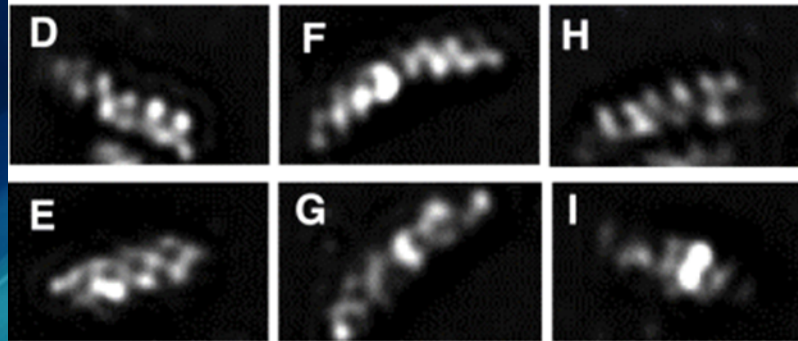
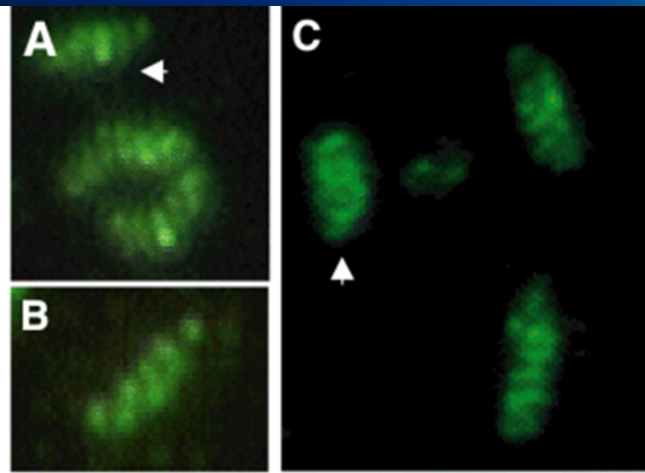
Εικόνα 6.3

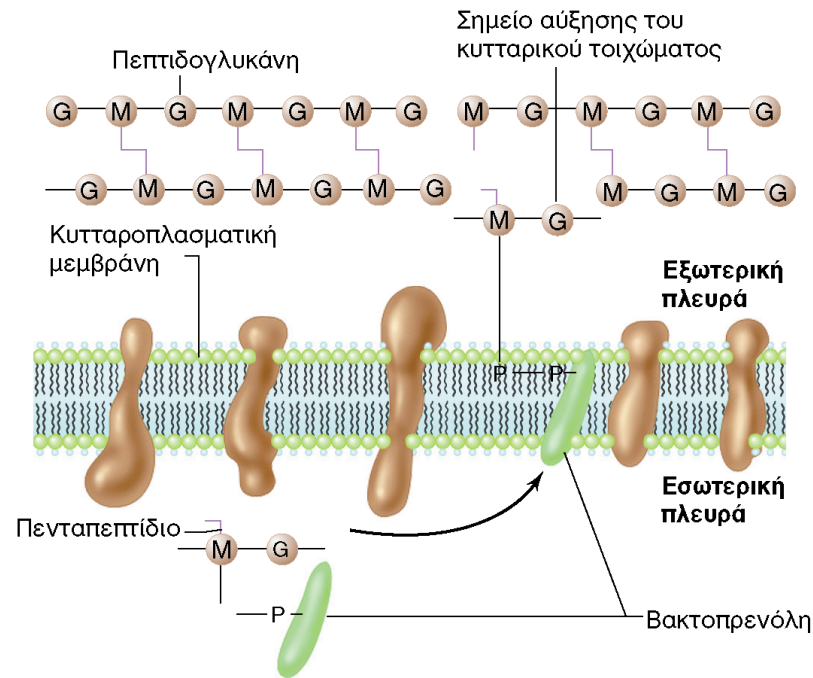
Η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στα θετικά κατά Gram βακτήρια. (α) Τοπολογία της σύνθεσης νέου κυτταρικού τοιχώματος κατά την κυτταρική διαίρεση. Στους κόκκους, η σύνθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος (απεικονίζεται με πράσινο χρώμα) εντοπίζεται σε ένα μόνο σημείο. Ο δακτύλιος FtsZ (βλ. Εικόνα 6.2) ορίζει το επίπεδο διαίρεσης του κυττάρου. (β) Ηλεκτρονικό μικρογράφημα σάρωσης σε κύτταρα *Streptococcus hemolyticus*. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ζώνες του τοιχώματος. Η διάμετρος κάθε κυττάρου είναι 1μm περίπου.

Καθορισμός κυτταρικού σχήματος MreB.

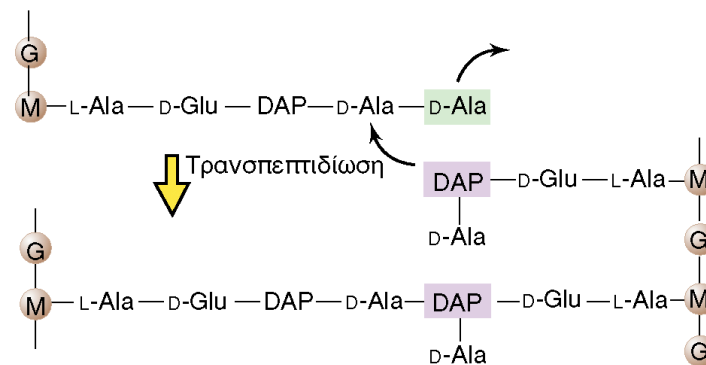


Εικόνα 4.11 Αντιπροσωπευτικά κυτταρικά σχήματα (μορφολογίες) προκαρυωτικών οργανισμών. Παρατίθενται διαγράμματα (αριστερά) και χαρακτηριστικές μικροφωτογραφίες (δεξιά). Οι οργανισμοί είναι: κόκκος, *Thiocapsa roseopersicina* (διάμετρος κυττάρου: 1,5 μm); ραβδίο, *Desulfuromonas acetoxidans* (διάμετρος: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





(α)

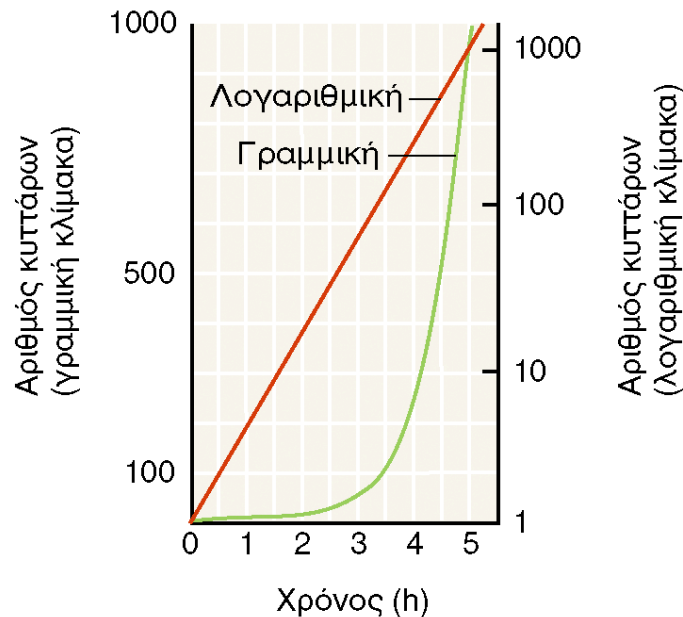


(β)

Εικόνα 6.5 Σύνθεση πεπτιδογλυκάνης. (α) Μεταφορά προδρόμων της πεπτιδογλυκάνης διά μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο σημείο αύξησης του κυτταρικού τοιχώματος. (β) Η αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης οδηγεί στην τελική διασύνδεση δύο αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης. Η πενικιλίνη αναστέλλει αυτή την αντίδραση.

Χρόνος (h)	Συνολικός αριθμός κυττάρων	Χρόνος (h)	Συνολικός αριθμός κυττάρων
0	1	4	256
0,5	2	4,5	512
1	4	5	1.024
1,5	8	5,5	2.048
2	16	6	4.096
2,5	32	.	.
3	64	.	.
3,5	128	10	1.048.576

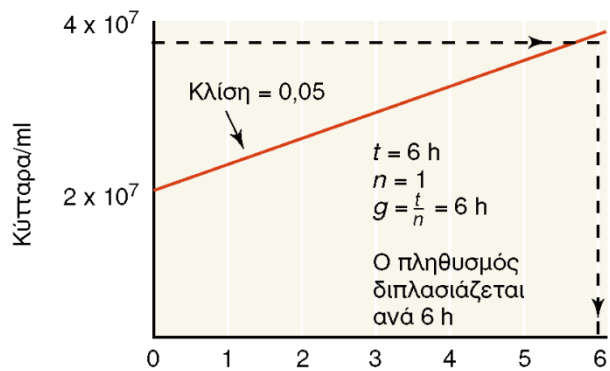
(α)



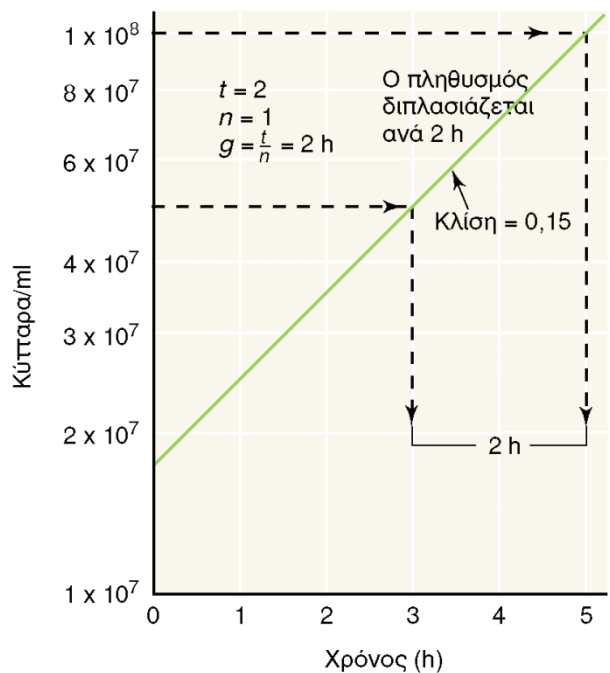
(β)

Εικόνα 6.6 Ρυθμός αύξησης μιας μικροβιακής καλλιέργειας. (α) Δεδομένα πληθυσμού που διπλασιάζεται ανά 30 min. (β) Δεδομένα σε γραμμική κλίμακα (αριστερός άξονας) και σε λογαριθμική (δεξιός άξονας).

- Ρυθμός αύξησης είναι η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων ή της κυτταρικής μάζας ανά μονάδα χρόνου
- Το διάστημα κατά το οποίο σχηματίζονται 2 κύτταρα από ένα προϋπάρχον ονομάζεται γενεά.
- Ο χρόνος που απαιτείται για τον διπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων ονομάζεται χρόνος γενεάς.
- Χρόνος γενεάς = χρόνος διπλασιασμού

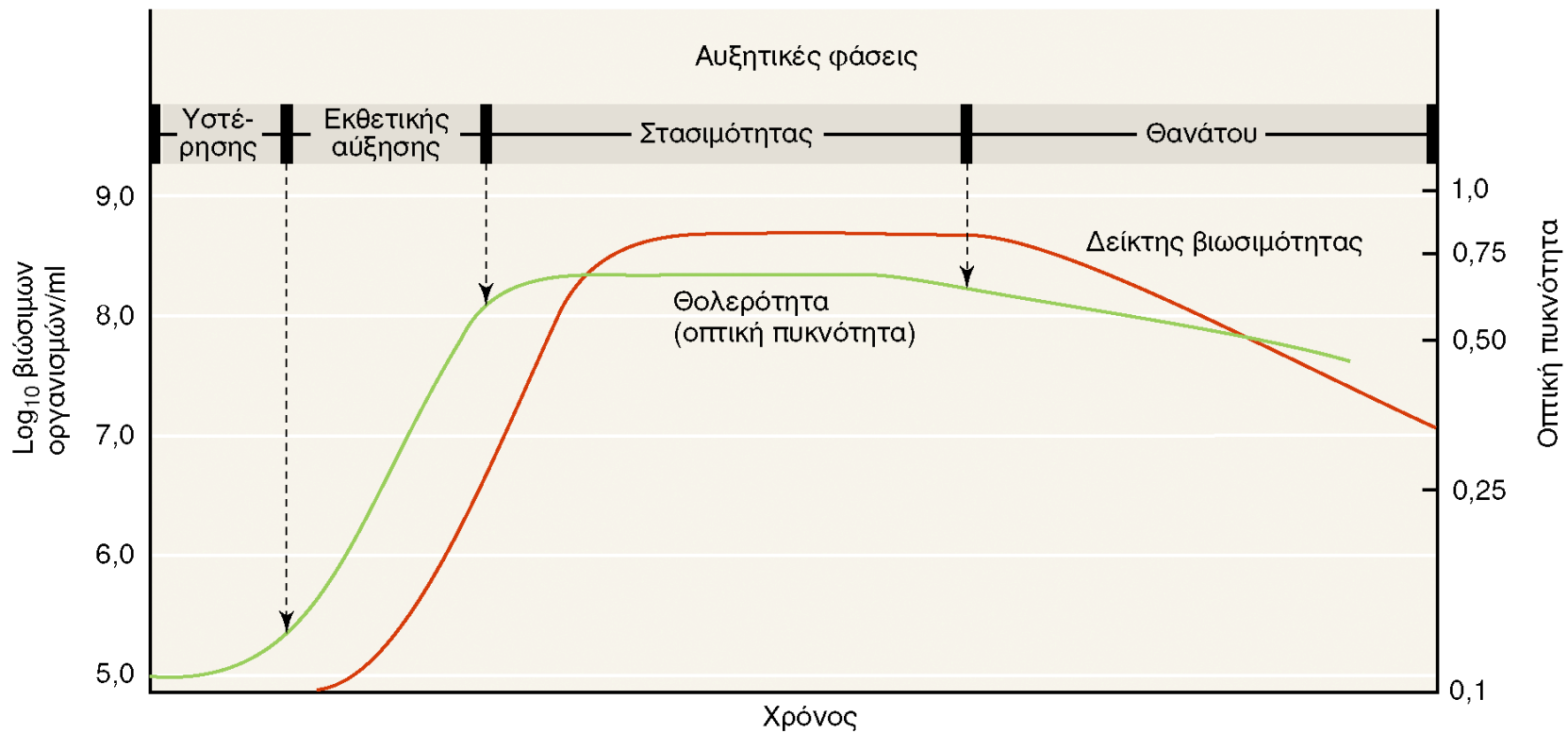


(α)

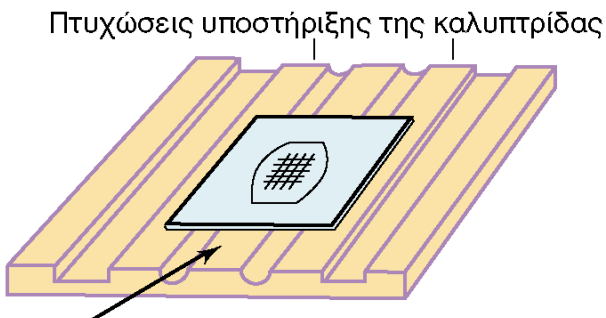


(β)

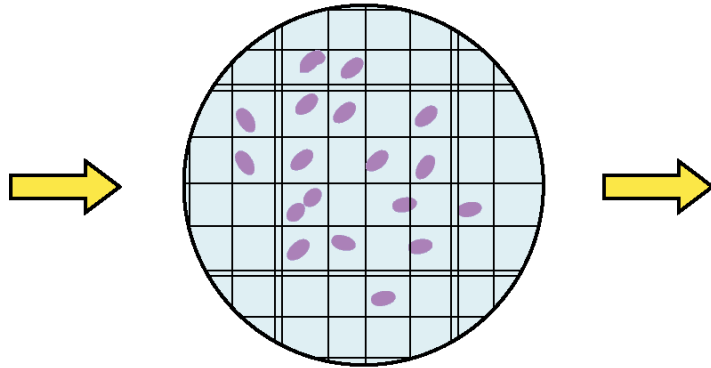
Εικόνα 6.7 Μέθοδος υπολογισμού του χρόνου γενεάς (g) εκθετικά αυξανόμενων πληθυσμών με χρόνους γενεάς (α) 6 h, και (β) 2 h, από τα δεδομένα ημιλογαριθμικών γραφικών παραστάσεων. Η κλίση κάθε ευθείας ισούται με $0,301/g$ και το n ισούται με τον αριθμό των γενεών που αντιστοιχούν σε χρόνο t . Όλοι οι αριθμοί έχουν εκφραστεί σε επιστημονικό συμβολισμό, δηλαδή το 10.000.000 ως 1×10^7 , το 60.000.000 ως 6×10^7 κ.ο.κ.



Εικόνα 6.8 Τυπική καμπύλη αύξησης ενός βακτηριακού πληθυσμού. Δείτε τα Τμήματα 6.5 και 6.6 για μια περιγραφή των μεθόδων μέτρησης του βακτηριακού πληθυσμού.

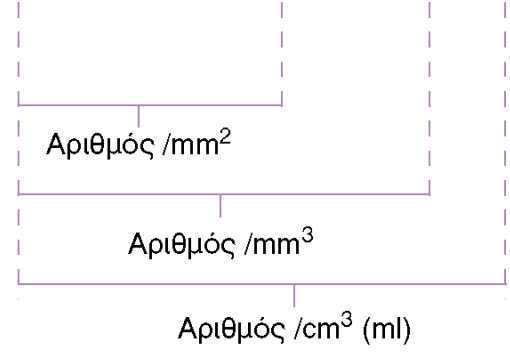


Το δείγμα προστίθεται εδώ· χρειάζεται προσοχή για να αποφευχθεί η υπερχειλίση· το διάστημα μεταξύ καλυπτρίδας και επιπέδου είναι $0,02 \text{ mm}$ ($\frac{1}{50} \text{ mm}$). Η συνολική επιφάνεια του πλέγματος είναι 1 mm^2 , περιλαμβάνει 25 μεγάλα τετράγωνα και έχει ολικό όγκο $0,02 \text{ mm}^3$.



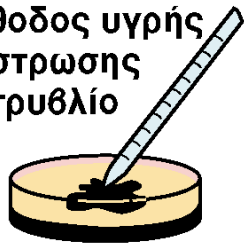
Μικροσκοπική παρατήρηση· μετρούνται όλα τα κύτταρα στα μεγάλα τετράγωνα: 12 κύτταρα (στην πράξη, η μέτρηση γίνεται σε αρκετά τετράγωνα και λαμβάνεται ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων).

Για τον υπολογισμό του αριθμού κυττάρων ανά ml δείγματος:
 $12 \text{ κύτταρα} \times 25 \text{ μεγάλα τετράγωνα} \times 50 \times 10^3 = 1,5 \times 10^7$

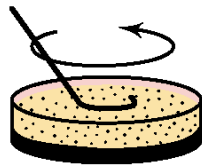


Εικόνα 6.9 Διαδικασία άμεσης μικροσκοπικής καταμέτρησης με τη χρήση της αντικειμενοφόρου καταμέτρησης (αιμοσφαιριόμετρου) Petroff-Hausser.

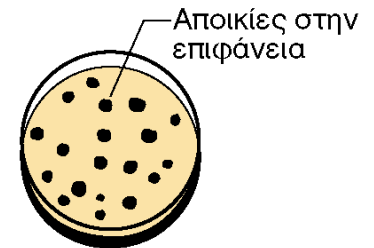
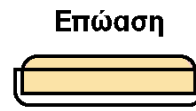
Μέθοδος υγρής επίστρωσης σε τρυβλίο



Το δείγμα (0,1 ml ή λιγότερο) ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια τρυβλίου με άγαρ

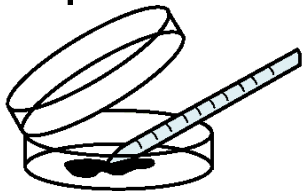


Ομοιόμορφη διασπορά του δείγματος στην επιφάνεια του άγαρ με τη βοήθεια αποστειρωμένου διανομέα



Τυπικό αποτέλεσμα της χρήσης της μεθόδου

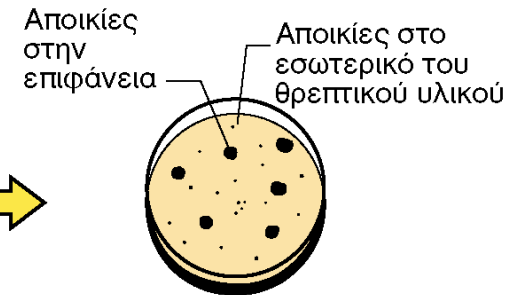
Μέθοδος αραιώσης του εμβολίου



Το δείγμα τοποθετείται σε αποστειρωμένο τρυβλίο



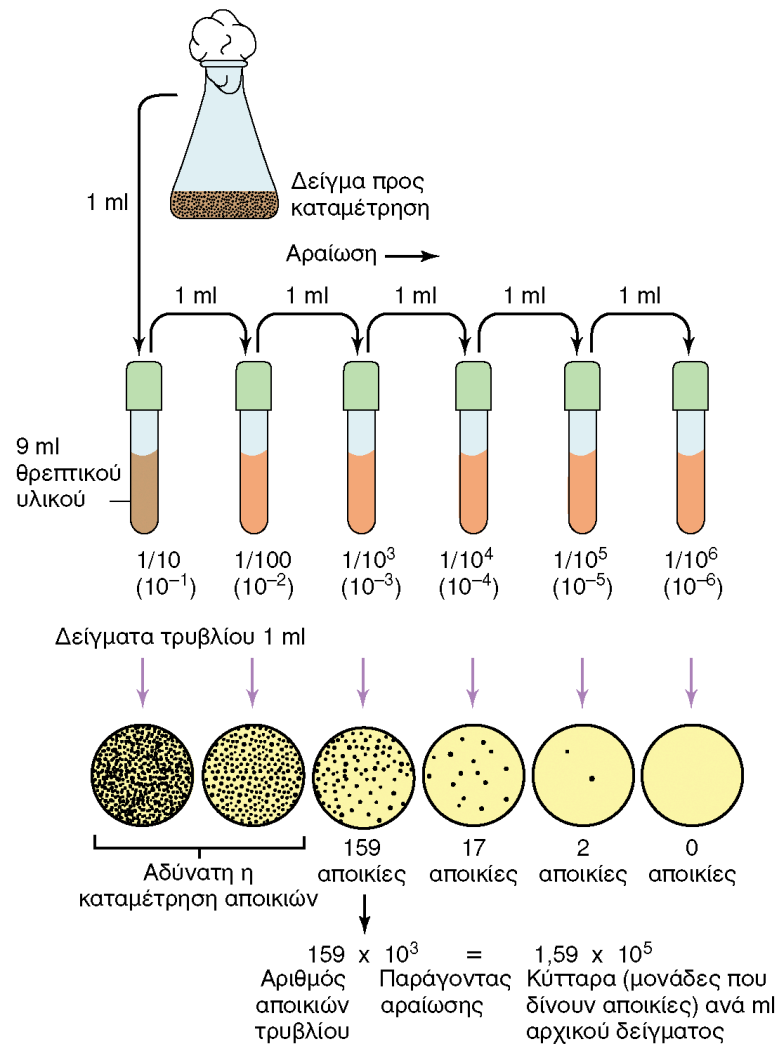
Προσθήκη αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού και καλή ανάμιξη με το εμβόλιο



Τυπικό αποτέλεσμα της χρήσης της μεθόδου

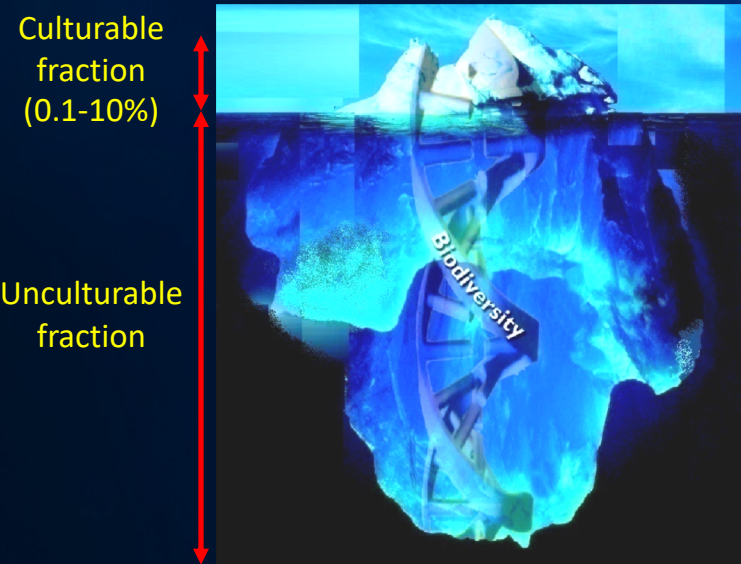
Εικόνα 6.10

Δύο μέθοδοι μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας (καταμέτρησης επί τρυβλίου). Σε κάθε περίπτωση, συνήθως απαιτείται αραιώση του δείγματος πριν την επίστρωση.



Εικόνα 6.11 Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος και χρήση της μεθόδου αραιώσης του εμβολίου με θρεπτικό υλικό. Το αποστειρωμένο υγρό για τις διαδοχικές αραιώσεις μπορεί να είναι απλώς νερό, αλλά ένα ισοοσμωτικό διάλυμα ή ένα υγρό θρεπτικό υλικό μπορεί να προσφέρουν υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης. Ο παράγοντας αραιώσης είναι το αντίστροφο της αραιώσης. Για την υγρή επίστρωση σε τρυβλίο (Εικόνα 6.10), μπορεί να χρειαστεί επιπλέον αραιώση για τη διασπορά δειγμάτων όγκου 0,1 ml.

Η γνώση που έχουμε για την ποικιλότητα των μικροοργανισμών αντιστοιχεί μόνο το ορατό μέρος του παγόβουνου

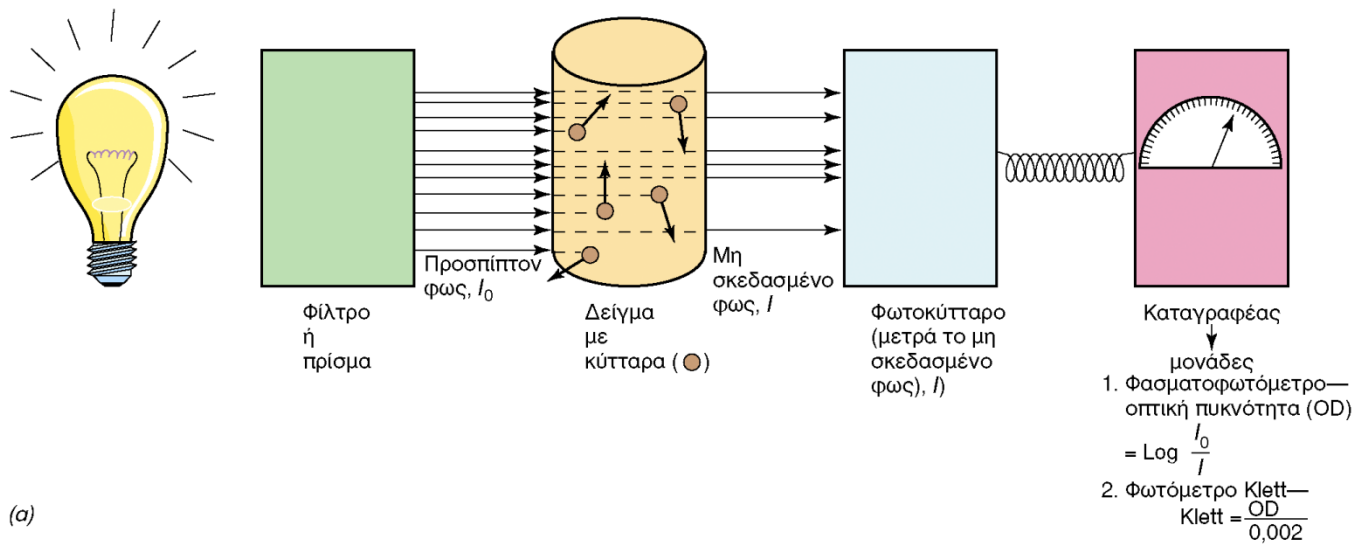


Most of what we know about prokaryote biology comes from the study of **microbial « weeds »**

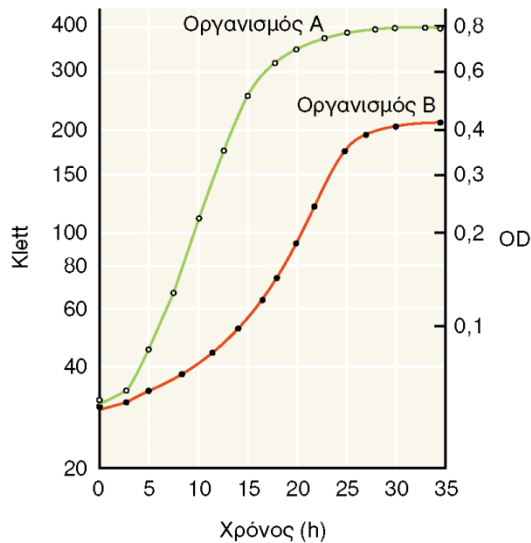
↓
microorganisms isolated in pure cultures using standard cultivation techniques (high-nutrient artificial media, aerobic conditions, moderate temperatures...).

They usually do **not** represent the numerically dominant and/or functionally significant species in that environment (they are estimated to constitute less than 1% of all microbial species!).

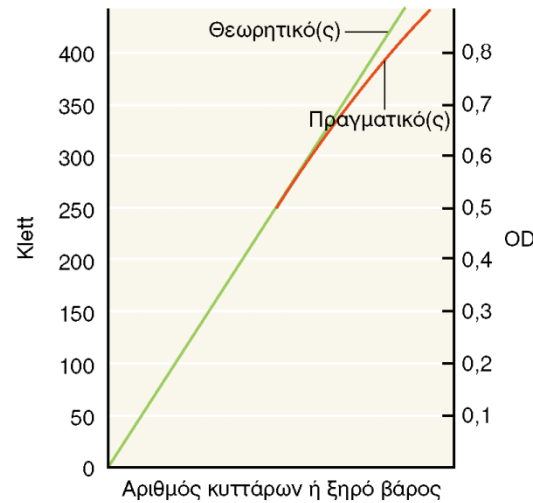
Over the past few decades, **molecular approaches** to detect and relate microorganisms in natural environments have enormously improved our perspective on bacterial diversity and distribution in nature.



(α)

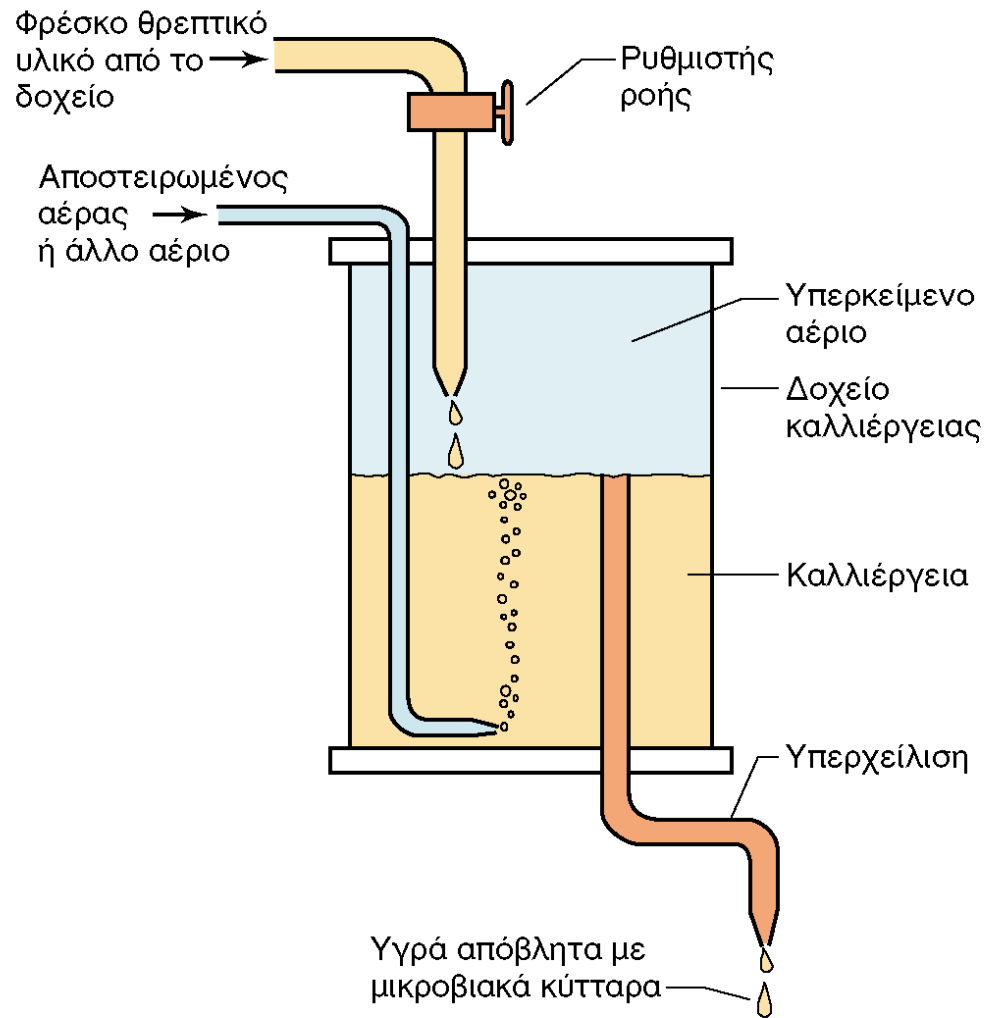


(β)

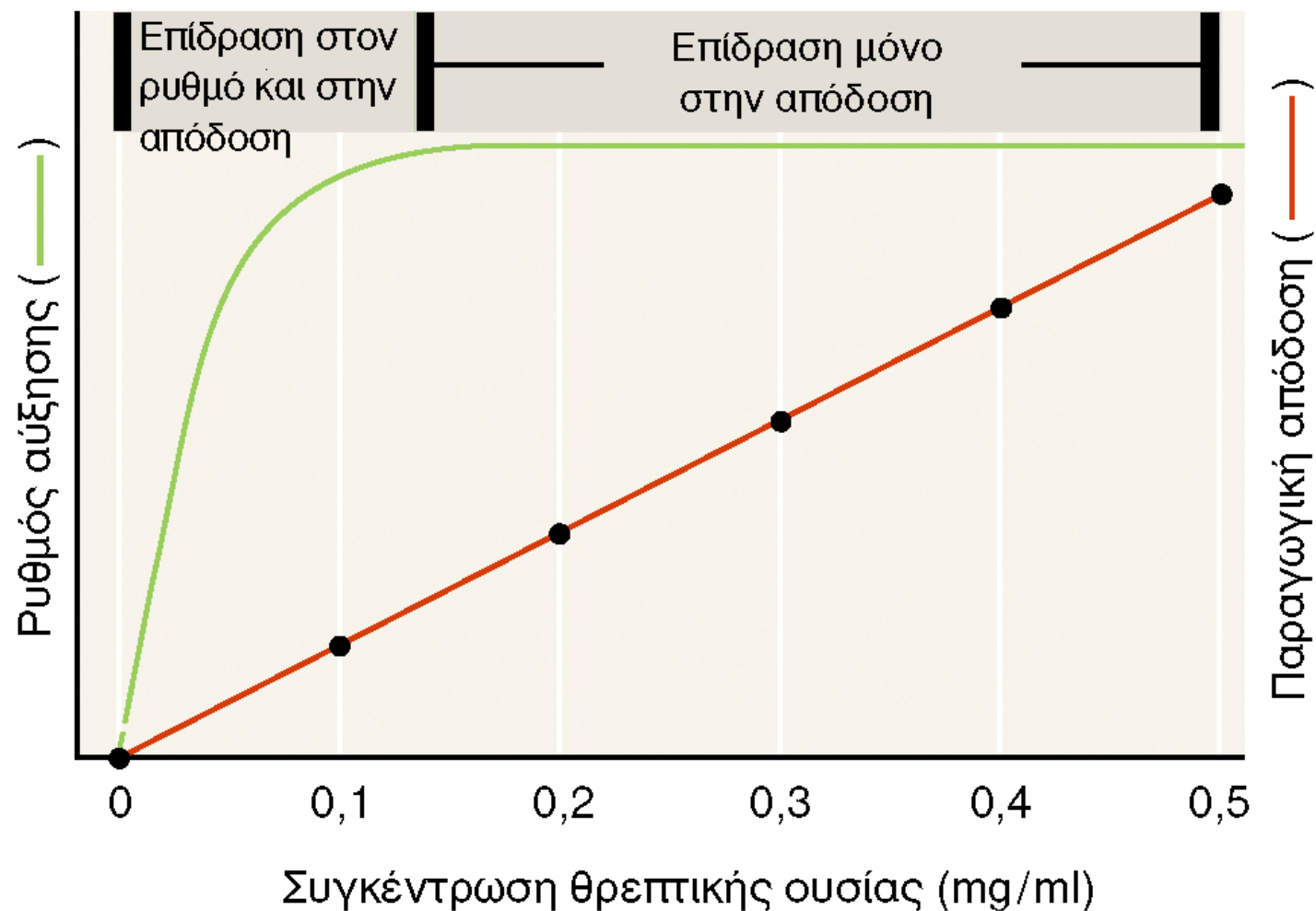


(γ)

Εικόνα 6.12 Μετρήσεις θολρότητας στη μικροβιακή αύξηση. (α) Οι μετρήσεις της θολρότητας έγιναν με φασματοφωτόμετρο ή με φωτόμετρο. Το φωτοκύτταρο μετρά την ποσότητα του προσπίπτοντος φωτός που δεν σκεδάστηκε από τα κύτταρα του εναιωρήματος. Οι μετρήσεις του φωτοκυττάρου δίνονται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας ή φωτομετρικές μονάδες. (β) Τυπική καμπύλη αύξησης με δεδομένα εκφρασμένα σε Klett ή σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD) δύο οργανισμών με διαφορετικούς ρυθμούς αύξησης. Για εξάσκηση, υπολογίστε τον χρόνο γενεάς (g) των δύο καλλιιεργειών χρησιμοποιώντας τη σχέση $n = 3,3 (\log N - \log N_0)$, όπου N και N_0 δύο διαφορετικές τιμές σε Klett που ελήφθησαν σε χρονικό διάστημα t . Ποιος οργανισμός αναπτύσσεται ταχύτερα, ο Α ή ο Β; (γ) Η σχέση μεταξύ αριθμού κυττάρων ή ξηρού βάρους και τιμών θολρότητας. Προσέξτε ότι η μονοσήμαντη αντιστοιχία ανάμεσα σε αυτές τις δύο σχέσεις δεν υφίσταται σε υψηλές τιμές θολρότητας.

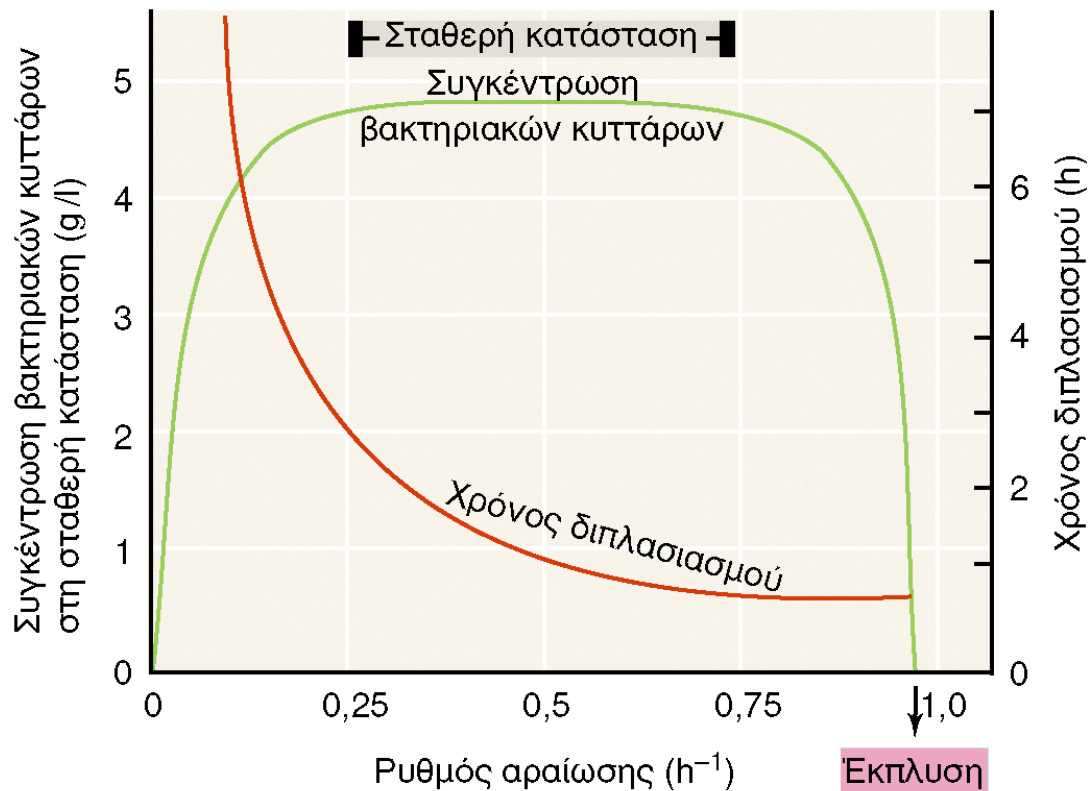


Εικόνα 6.13 Σχηματική απεικόνιση βιοαντιδραστήρα συνεχούς καλλιέργειας (χημειοστάτη). Σε μια τέτοια διάταξη, η πυκνότητα του πληθυσμού ελέγχεται από τη συγκέντρωση της περιοριστικής θρεπτικής ουσίας (περιοριστικού παράγοντα) στο δοχείο καλλιέργειας, και ο ρυθμός αύξησης ελέγχεται από τον ρυθμό ροής (βλ. Εικόνα 6.15). Και οι δύο παράμετροι είναι δυνατόν να καθοριστούν από τον ερευνητή.



Εικόνα 6.14

Σχέση μεταξύ συγκέντρωσης θρεπτικής ουσίας, ρυθμού αύξησης (πράσινη καμπύλη), και παραγωγικής απόδοσης (κόκκινη γραμμή) σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις της θρεπτικής ουσίας, επηρεάζονται τόσο ο ρυθμός αύξησης όσο και η παραγωγική απόδοση.



Εικόνα 6.15 Σχέσεις σταθερής κατάστασης στον χημειοστάτη. Ο ρυθμός αραίωσης καθορίζεται από την ταχύτητα ροής και τον όγκο του δοχείου καλλιέργειας. Έτσι, με ένα δοχείο καλλιέργειας όγκου 1000 ml και ταχύτητα ροής ίση με 500 ml/h, ο ρυθμός αραίωσης θα είναι $0,5 h^{-1}$. Σημειώστε ότι σε υψηλούς ρυθμούς αραίωσης η αύξηση δεν μπορεί να αντισταθμίσει την αραίωση, με αποτέλεσμα την έκπλυση της καλλιέργειας. Σημειώστε επίσης ότι, αν και η πυκνότητα του πληθυσμού παραμένει σταθερή στη σταθερή κατάσταση, ο ρυθμός αύξησης (χρόνος διπλασιασμού) μπορεί να ποικίλλει σημαντικά. Κατά συνέπεια, ο ερευνητής μπορεί να αποκτήσει πληθυσμούς με την ίδια πυκνότητα, αλλά με διαφορετικούς ρυθμούς αύξησης.