

Εργαστηριακή καλλιέργεια μικροοργανισμών

- Η μελέτη των μικροοργανισμών απαιτεί συνήθως την καλλιέργεια τους στο εργαστήριο
- Γίνεται χρήση στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων και τρυβλίων Petri
- Μεμονωμένα κύτταρα που επιστρώνονται στην επιφάνεια του τρυβλίου αυξάνονται και διαιρούνται σχηματίζοντας **αποικίες**

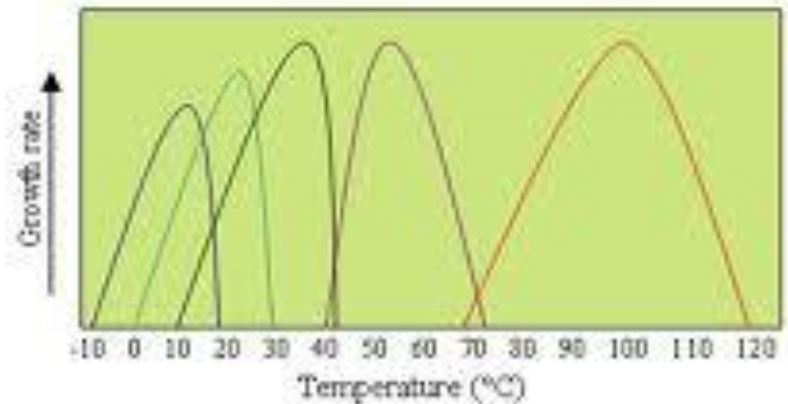
Βέλτιστη ανάπτυξη μικροοργανισμών

- Για μία βέλτιστη και ελεγχόμενη καλλιέργεια χρειάζεται να παρασχεθούν στους μικροοργανισμούς όλα οι απαραίτητες συνθήκες (θερμοκρασία, pH, ποσότητα οξυγόνου) και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τον πολλαπλασιασμό τους.

Εύρος θερμοκρασίας που αναπτύσσονται διάφοροι οργανισμοί

Temperature ranges for different bacteria.

Classification	Temperature Range (°C)	Optimum Growth Temperature (°C)
<u>Psychrophile</u>	-10 to 20	10
<u>Psychrotroph</u>	5 to 30	25
<u>Mesophile</u>	10 to 45	37
<u>Thermophile</u>	40 to 75	55
<u>Hyperthermophile</u>	65 to 120	90-100



Θρεπτικά υποστρώματα

(ή αλλιώς θρεπτικά υλικά, θρεπτικά μέσα, καλλιεργητικά μέσα)

- περιέχουν
 - Πρωτεΐνες
 - Σάκχαρα
 - Λιπίδια
 - Διάφορα στοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρο)
 - Ιχνοστοιχεία δηλ σε μικρές ποσότητες (μαγγάνιο, κοβάλτιο, χαλκό, μολυβδαίνιο, ψευδάργυρο)
- Μπορεί επίσης να περιέχουν:
- Βιταμίνες
 - Αυξητικούς παράγοντες

Θρεπτικά υποστρώματα

Στερεά

- Περιέχουν εκτός των άλλων ουσιών και άγαρ
- Άγαρ
 - φυσικός πολυσακχαρίτης
 - Εξάγεται από θαλάσσια φύκη
 - Στερεοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
 - Ρευστοποιείται σε θερμοκρασία $>40^{\circ}\text{C}$

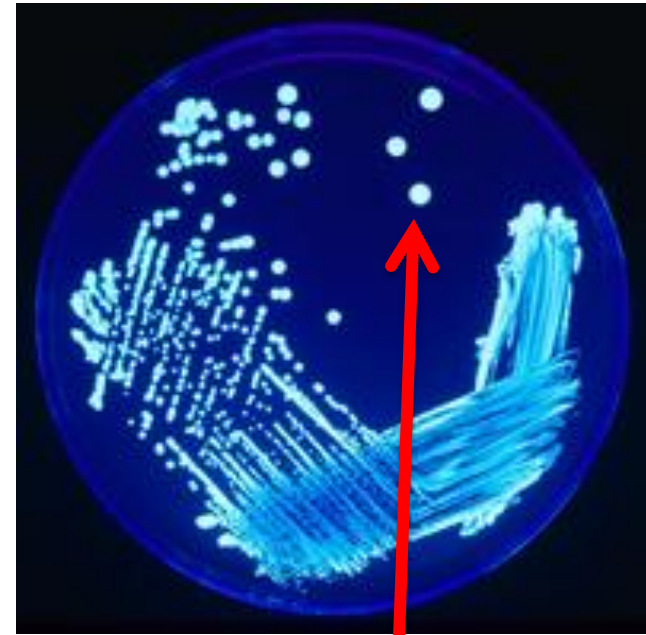
Υγρά

- Δεν περιέχουν άγαρ

Μικροβιακές αποικίες (microbial colonies)

σχηματίζονται στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα

- Οι αποικίες είναι ορατές μάζες κυττάρων που σχηματίζονται από διαδοχικές διαιρέσεις ενός ή λίγων κυττάρων.
- Το μέγεθος, το σχήμα, η υφή και το χρώμα μίας μικροβιακής 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 ποικίλει σημαντικά.



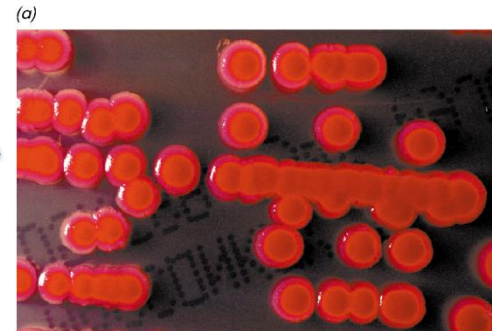
Οι μικροβιακές αποικίες μπορεί να αποτελούνται από $>10^9$ (δισεκατομμύριο) κύτταρα

Βακτηριακές αποικίες όπως σχηματίζονται σε άγαρ

Αποικίες *Serratia marcescens* σε άγαρ MacConkey



James A. Shapiro, University of Chicago



James A. Shapiro, University of Chicago

Αποικίες *Pseudomonas aeruginosa* σε άγαρ τρυπτικάσης και σόγιας



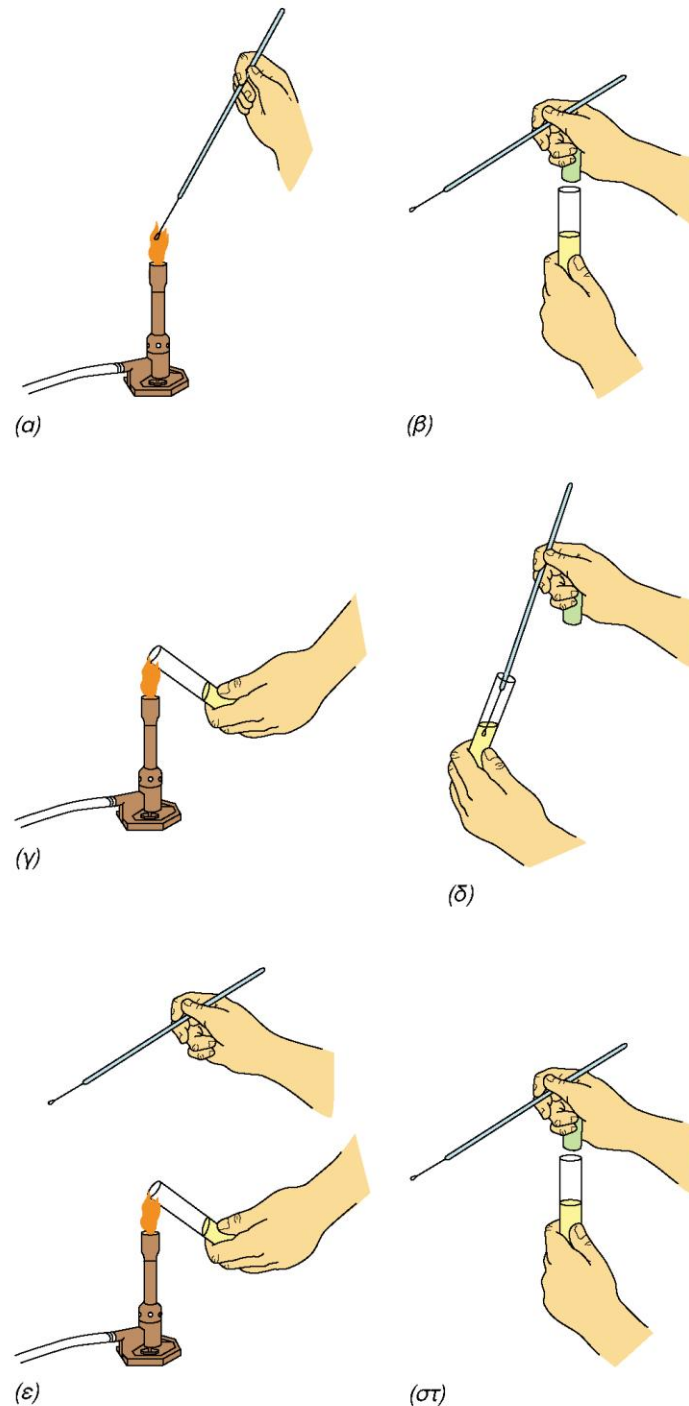
James A. Shapiro, University of Chicago

Αποικίες *Shigella flexneri* σε άγαρ MacConkey



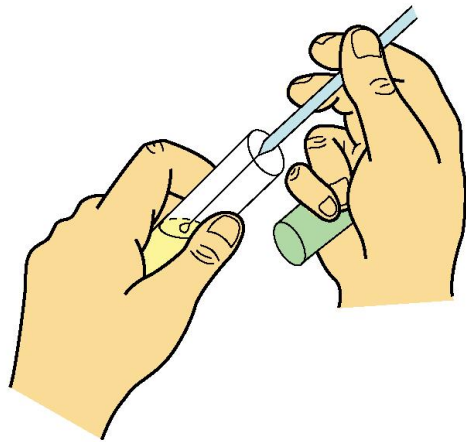
James A. Shapiro, University of Chicago

Ασηπτική μεταφορά δείγματος με βρόγχο ενοφθαλμισμού (κρίκος)



Εικόνα 5.3 Ασηπτική 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.

Μέθοδος επίστρωσης μικροοργανισμών σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα



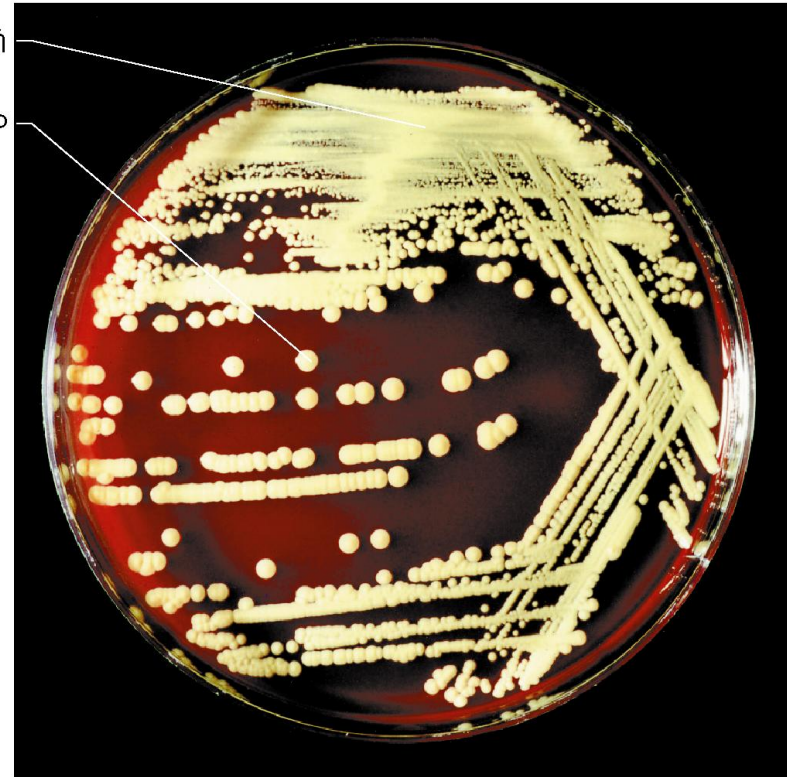
(α)

Πυκνή ανάπτυξη στην αρχή της επίστρωσης

Μεμονωμένες αποικίες στο τέλος της επίστρωσης



(β)



(γ)

James A. Shapiro, University of Chicago

Εικόνα 5.4 Μέθοδος επίστρωσης μικροοργανισμών σε στερεά θρεπτικά μέσα για τη δημιουργία αμιγών καλλιιεργειών. (α) Ο βρόχος ενοφθαλμισμού αποστειρώνεται και κατόπιν εμβαπτίζεται στο υλικό του δοκιμαστικού σωλήνα. (β) Το δείγμα επιστρώνεται σε παράλληλες γραμμές πάνω σε τρυβλία Petri με στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο, διασπείροντας τους μικροοργανισμούς ως εξής: Ακολουθώντας την αρχική επίστρωση σχηματίζουμε νέες παράλληλες γραμμές υπό γωνία, αποστειρώνοντας κάθε φορά τον βρόχο ενοφθαλμισμού. (γ) Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού μετά από επώαση. Οι αποικίες του βακτηρίου *Micrococcus luteus* σε τρυβλία που περιέχουν άγαρ αίματος είναι τόσο ευδιάκριτες και καλά απομονωμένες, ώστε είναι δυνατή η δημιουργία αμιγών καλλιιεργειών.

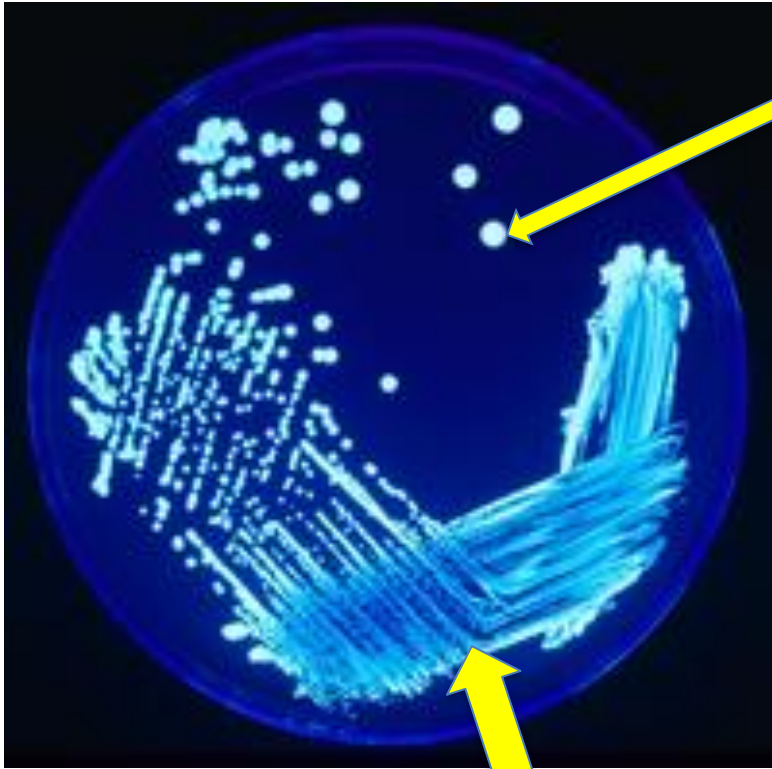
Μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμού (mixed culture)

- Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται στο φυσικό τους περιβάλλον σε μικτές καλλιέργειες
- Οι μικτές καλλιέργειες αποτελούνται από πολλά είδη μικροοργανισμών, τα οποία συμβιώνουν σε μία δυναμική ισορροπία πληθυσμών

Καθαρή καλλιέργεια μικροοργανισμού (pure culture)

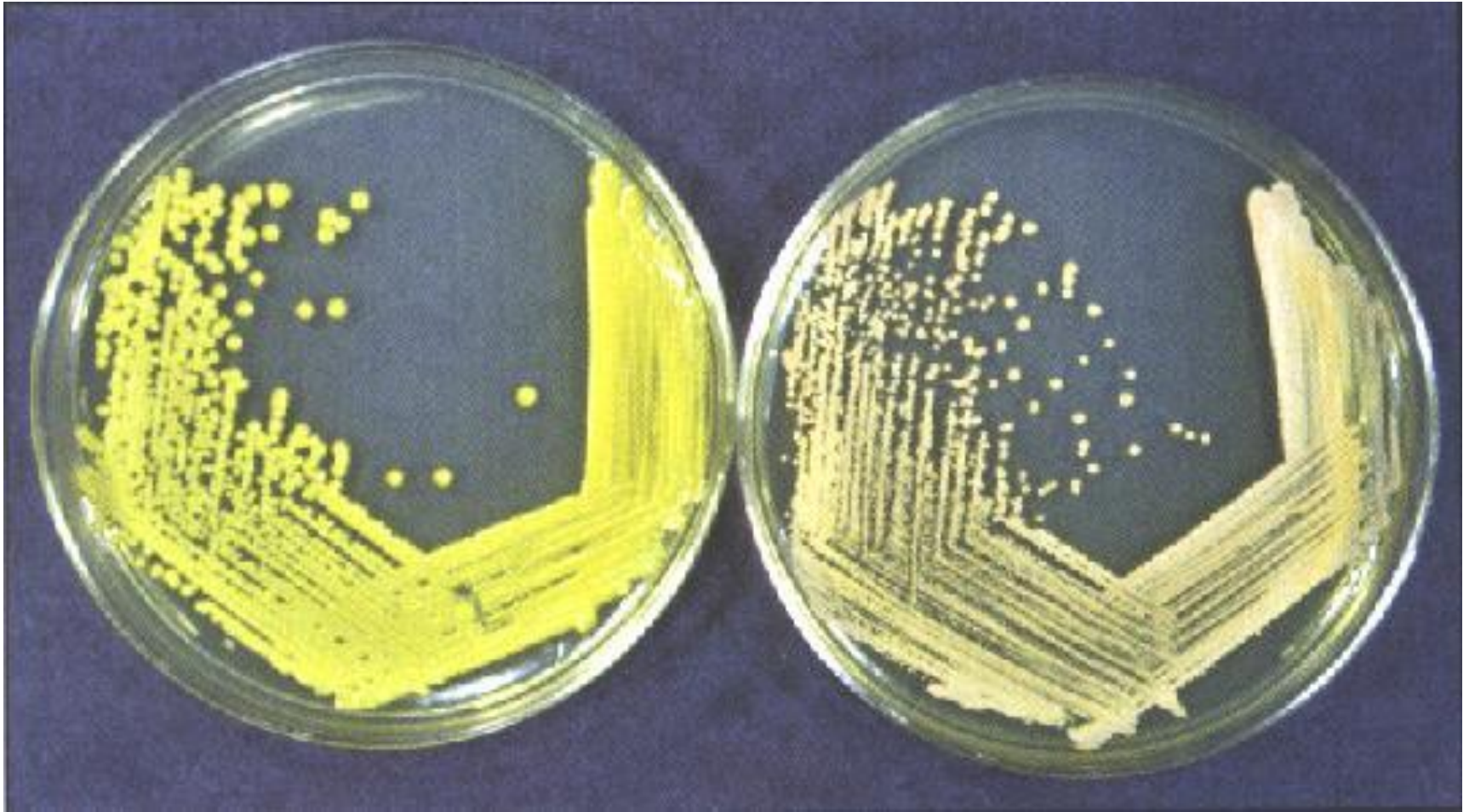
- Για την μελέτη όμως των μικροοργανισμών απαιτούνται καθαρές (ή αμιγείς) καλλιέργειες
- Καθαρή είναι η καλλιέργεια η οποία περιέχει **ένα είδος** μικροοργανισμού και συγκεκριμένα τον πληθυσμό από ένα **στέλεχος**
- Οι καθαρές καλλιέργειες δίνουν την δυνατότητα να μελετηθούν οι μικροοργανισμοί ενός είδους (η ενός στελέχους) ως προς την φυσιολογία τους, τον μεταβολισμό τους και την γενετική τους.

Σχηματισμός αποικιών σε τρυβλίο

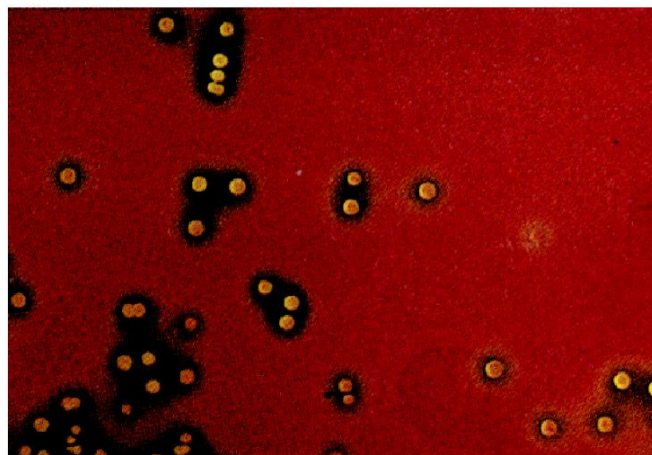


Πολύ πυκνές αποικίες που δεν μπορούν να καταμετρηθούν

- Μεμονωμένες (διακριτές) αποικίες που μπορούν να καταμετρηθούν.
- Οι μικροοργανισμοί από αυτές τις αποικίες μπορούν να απομονωθούν με ευχέρεια.
- Μία τέτοια αποικία μπορεί να ξαναεμβολιαστεί σε νέο θρεπτικό μέσο (στερεό ή υγρό) για την δημιουργία μίας καθαρής καλλιέργειας

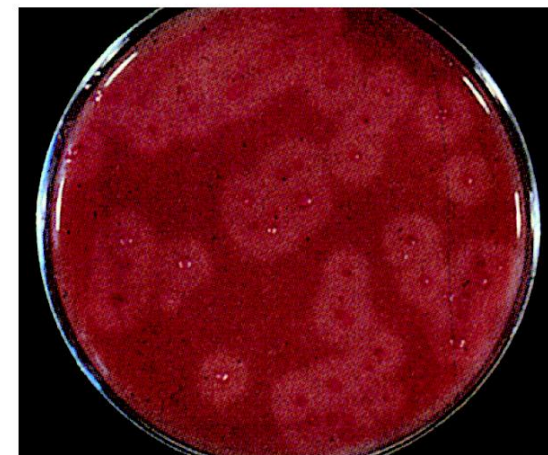


Εικόνα 21.17 (α) Ζώνες αιμόλυσης γύρω από αποικίες *Streptococcus pyogenes*, που αναπτύσσονται σε τρυβλίο άγαρ-αίματος. (β) Δράση της λεκιθινάσης, μιας φωσφολιπάσης, γύρω από αποικίες *Clostridium perfringens*, που αναπτύσσονται σε καλλιεργητικό μέσο αгарόζης εμπλουτισμένο με κρόκο αυγού (πηγή λεκιθίνης). Η λεκιθινάση διασπά τις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων, δημιουργώντας τις διαυγείς ζώνες που φαίνονται στη φωτογραφία.



(α)

T. D. Brock



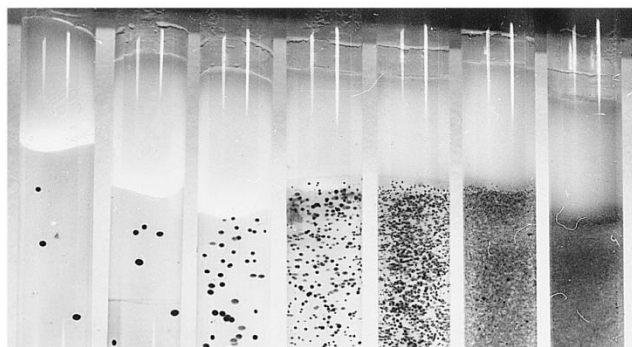
(β)

Leon J. LeBeau



James Shapiro

(α)

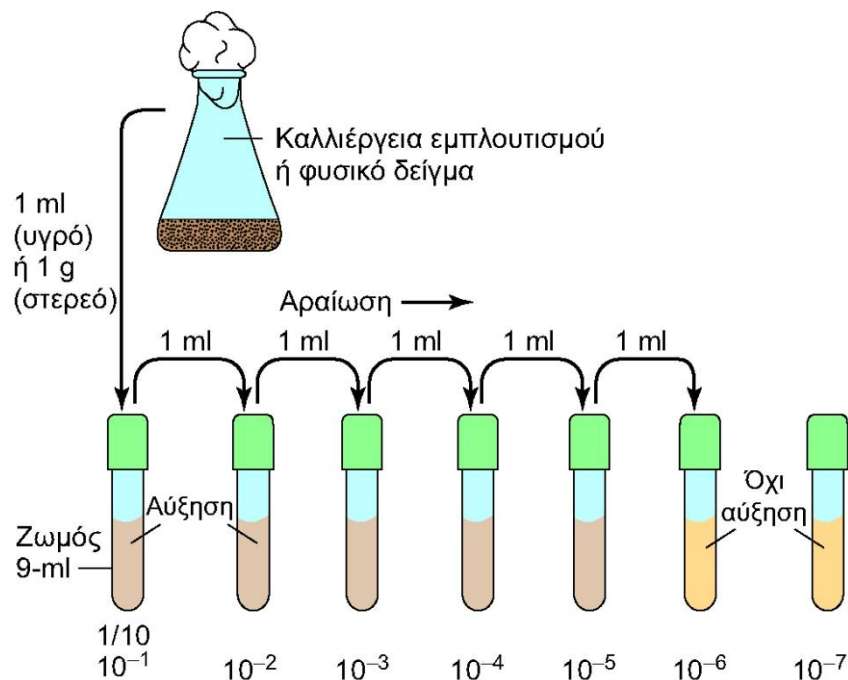


Norbert Pfennig

(β)

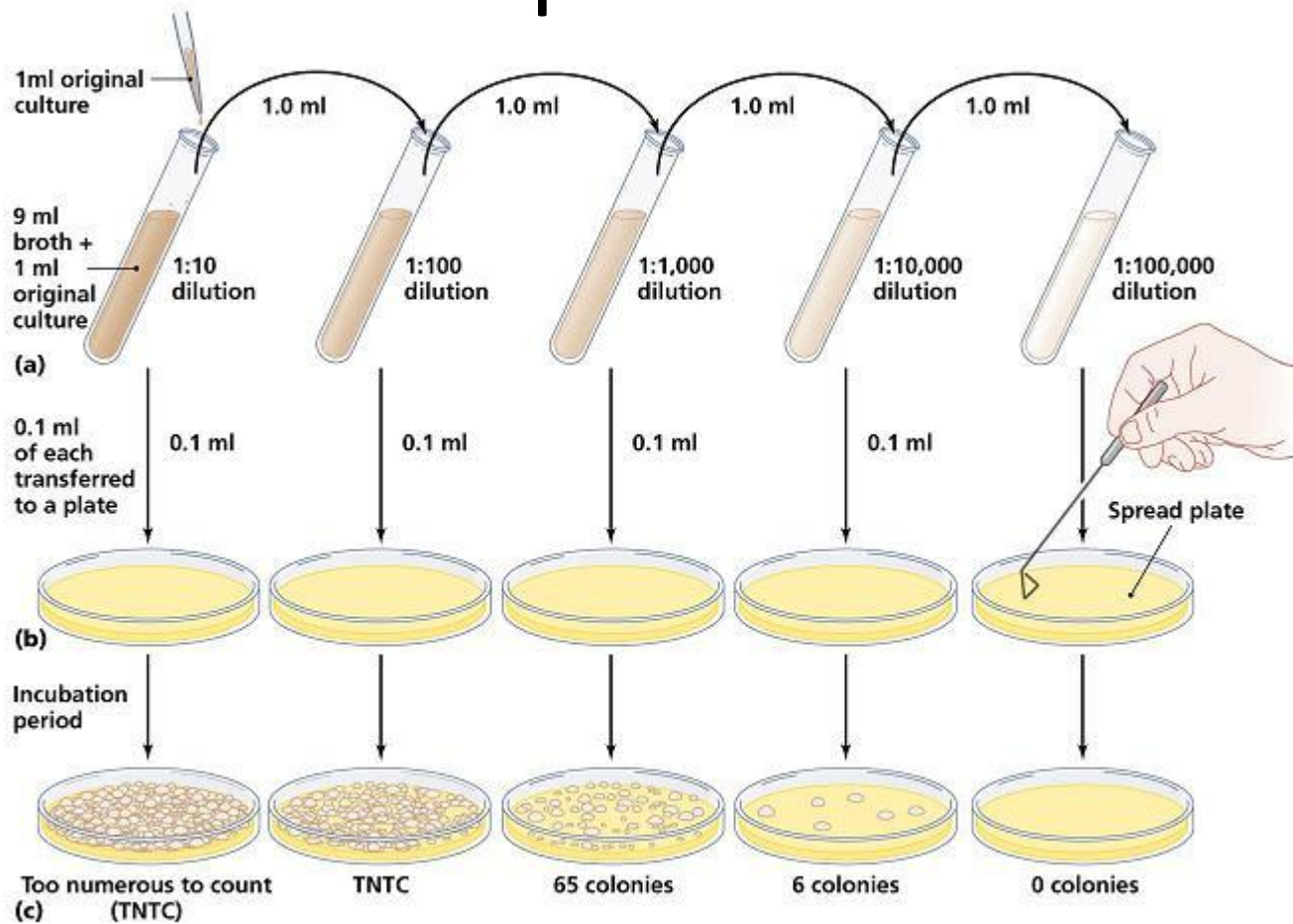
Εικόνα 18.3 Μέθοδοι αμιγούς καλλιέργειας. (α) Οργανισμοί που σχηματίζουν διακριτές αποικίες σε τρυβλία, όπως οι εικονιζόμενοι, μπορούν συνήθως να απομονωθούν με ευχέρεια. Όσον αφορά αναερόβιους οργανισμούς ανθεκτικούς στο οξυγόνο, η απομόνωση σε τρυβλία λειτουργεί επίσης ικανοποιητικά εφόσον τα τρυβλία τοποθετηθούν σε ανοξικές συνθήκες αμέσως μετά τη γραμμική επίστρωση. (β) Αποικίες αναερόβιων οργανισμών ευαίσθητων στο οξυγόνο, που λαμβάνονται με ανάδευση σε τηγμένο άγαρ. Εφαρμόζονται διαδοχικές αραιώσεις, εδώ από τα δεξιά προς τα αριστερά, που τελικά οδηγούν σε μεμονωμένες αποικίες. Για τη διατήρηση των αναερόβιων συνθηκών, οι δοκιμαστικοί σωλήνες σφραγίζονται με στείρο μείγμα παραφίνης και ορυκτελαίου.

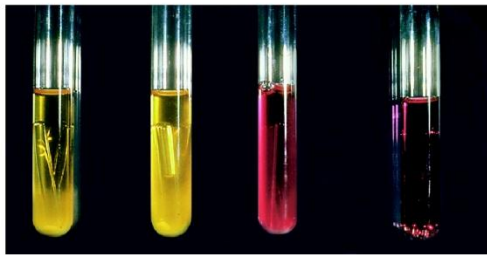
Μέθοδος της
ανάλυσης του
πιθανότερου
αριθμού
(MPN=most
probable number)



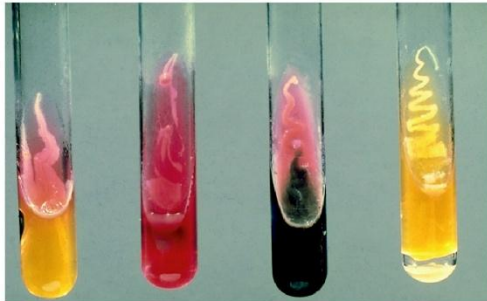
Εικόνα 18.4 Διαδικασία εμπλουτισμού «εξαντλητικών αραιώσεων» ή ανάλυση του πιθανότερου αριθμού (MPN). Σε ένα επιλεκτικό μέσο καλλιέργειας προστίθεται μια υπάρχουσα καλλιέργεια εμπλουτισμού, ή ένα φυσικό δείγμα νερού, εδάφους κ.ο.κ., και υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις. Ο τελευταίος δοκιμαστικός σωλήνας στον οποίο εμφανίζεται κυτταρική αύξηση (εδώ, ο δοκιμαστικός σωλήνας με αραιώση 10^{-5}) θα πρέπει να περιέχει έως 10 κύτταρα. Για τη λήψη αμιγούς καλλιέργειας, δείγμα αυτού ακριβώς του δοκιμαστικού σωλήνα χρησιμοποιείται ως υλικό ενοφθαλμισμού και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται. Για την εκτίμηση του αριθμού ενός συγκεκριμένου τύπου βακτηρίων σε ένα δείγμα, χρησιμοποιείται ο αριθμός MPN, δηλ. της υψηλότερης δυνατής αραιώσης που στηρίζει κυτταρική αύξηση. Αν π.χ. το θρεπτικό μέσο που αναφέρεται στην εικόνα είναι επιλεκτικό για θειοαναγωγικά βακτήρια, προκύπτει ότι θα υπάρχουν 10^5 με 10^6 ανακτήσιμα κύτταρα θειοαναγωγικών βακτηρίων ανά g δείγματος. Η ακρίβεια του υπολογισμού του MPN μπορεί να αυξηθεί σημαντικά αν χρησιμοποιήσουμε πολλαπλούς σωλήνες για κάθε αραιώση.

Μέθοδος διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων

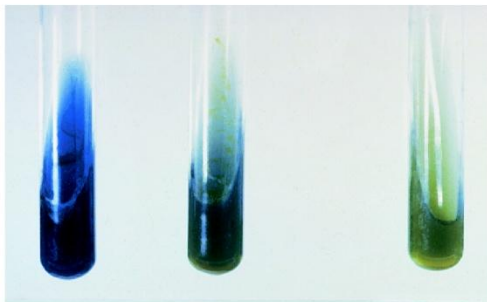




(α)



(β)



(γ)



(δ)



(ε)

Εικόνα 24.7 Διαγνωστικές μέθοδοι βασισμένες στην ανάπτυξη μικροοργανισμών και στις χρωματικές αλλαγές σε διάφορα θρεπτικά μέσα, που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση οργανισμών από κλινικά δείγματα. (α) Χρήση διαφορετικού θρεπτικού μέσου για τον προσδιορισμό της ζύμωσης σακχάρων. Η παραγωγή οξέων υποδηλώνεται από τη χρωματική μεταβολή pH-μετρικών δεικτών που έχουν προστεθεί στο υγρό θρεπτικό υλικό. Η παραγωγή αερίου υποδηλώνεται με την εμφάνιση φυσαλίδας στο ανεστραμμένο φιαλίδιο που βρίσκεται μέσα στον δοκιμαστικό σωλήνα. Από αριστερά προς τα δεξιά: Δείγμα με οξύ, με οξύ και αέριο, αρνητικό δείγμα, μη ενοφθαλμισμένο. (β) Συμβατικός διαγνωστικός έλεγχος για την παρουσία εντεροβακτηρίων σε θρεπτικό μέσο που ονομάζεται άγαρ τριών σακχάρων-σιδήρου (TSI). Ο ενοφθαλμισμός γίνεται τόσο στην επιφάνεια της κορυφής του θρεπτικού μέσου όσο και με βύθιση του υλικού ενοφθαλμισμού στον πυθμένα του στερεού άγαρ. Το θρεπτικό μέσο περιέχει μικρή μόνο ποσότητα γλυκόζης, αλλά μεγάλες ποσότητες λακτόζης και σακχαρόζης. Οι οργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν μόνο τη γλυκόζη σχηματίζουν οξέα αποκλειστικά στον πυθμένα, ενώ εκείνοι που ζυμώνουν λακτόζη και σακχαρόζη παράγουν οξέα και στην κορυφή του θρεπτικού μέσου. Ο σχηματισμός αερίου υποδηλώνεται με τη ριπή του άγαρ στον πυθμένα. Ο σχηματισμός υδροθειού (είτε από αποικοδόμηση πρωτεϊνών είτε από την αναγωγή θειοθειικών στο θρεπτικό μέσο) υποδηλώνεται από την εμφάνιση μαύρης χροιάς, λόγω της αντίδρασης του υδροθειού με τα ιόντα δισθενούς σιδήρου του θρεπτικού μέσου. Από αριστερά προς τα δεξιά: ζύμωση μόνο γλυκόζης, αρνητική αντίδραση, σχηματισμός υδροθειού, ζύμωση γλυκόζης και άλλου σακχάρου. (γ) Μέτρηση της κατανάλωσης κητρικού οξέος από *Salmonella* σε άγαρ κητρικού οξέος Simmons. Η αλλαγή του pH μεταβάλλει το χρώμα κατάλληλου δείκτη. Από αριστερά προς τα δεξιά: θετικό, αρνητικό, μη ενοφθαλμισμένο. (δ) Κιττα (kits) με διάφορα θρεπτικά μέσα για την ταυτοποίηση οργανισμών σε κλινικά δείγματα. Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με την περίπτωση (α), αλλά υλικά και σκεύη βρίσκονται σε μικρότερη κλίμακα μεγέθους, ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη διεξαγωγή πολλών διαφορετικών δοκιμασιών. Στην εικόνα φαίνονται τέσσερις σειρές, με διαφορετικές καλλιέργειες η κάθε μία. (ε) Άλλο κιτ για καλλιεργητικές δοκιμασίες. Στη συγκεκριμένη προσδιορίζεται η χρήση σακχάρων σε μη ζυμωτικούς οργανισμούς.

➤ Βιοχημικά τεστ που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή σε κιτ (σύστημα API)

➤ Οι μικροοργανισμοί επωάζονται σε διάφορα υποστρώματα και προκύπτουν χρωματικές αλλαγές