

ΧΡΩΣΕΙΣ, ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ & ΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΣΥΝΟΠΤΙΚΕΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Συμπληρωματικό Υλικό Διδασκαλίας

ΧΡΩΣΕΙΣ, ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ & ΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

- ❖ **ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ – ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ:** Το μικροσκόπιο είναι το επιστημονικό εργαλείο που επιτρέπει την οπτική επισκόπηση του μικρόκοσμου. Άλλωστε μέσω του μικροσκοπίου άνοιξε ο δρόμος για την ανακάλυψη του κόσμου των μικροβίων.
- ❖ Τα μικροσκόπια έχουν συμβάλει σε εξαιρετικά μεγάλο βαθμό στην κατανόηση του μικροσκοπικού κόσμου του κυττάρου, διότι η ανθρώπινη φαντασία και επιστημονική εφευρετικότητα βοηθούνται πάρα πολύ από την εικόνα που αποτυπώνεται από τα μικροσκόπια.
- ❖ Δύο είναι οι βασικοί παράμετροι ενός μικροσκοπίου:
 1. **Μεγέθυνση (*magnification*):** Δείχνει το βαθμό μεγέθυνσης του υπό μικροσκόπηση δείγματος. Συνήθως εκφράζεται με ως «100x», «1500x».
 2. **Ευκρίνεια (*resolution*):** Δείχνει την ικανότητα ενός μικροσκοπίου να διακρίνει δύο γειτονικά σημεία ως ανεξάρτητα, δηλαδή να δίνει καθαρές εικόνες.
- ❖ Το ανώτερο επίπεδο μεγέθυνσης ενός οπτικού μικροσκοπίου με την μέγιστη ευκρίνεια είναι 1500x δηλαδή μπορούν να μεγεθύνουν ένα αντικείμενο μέχρι 1500 φορές. Η δε διακριτική του ικανότητά του είναι μέχρι 0,2μm.
- ❖ Τα μικροσκόπια – σε γενικές γραμμές – μπορούν να διακριθούν σε:
 - A. **Οπτικά μικροσκόπια (*light microscopy*):** Η λειτουργία τους βασίζεται στην χρήση φωτός, δηλαδή κατ' ουσία «φωτονίων» καθώς και την χρήση υλικών (ορυκτών) φακών καθώς και ακτινοβολίας. Τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται σε:
 - **Μικροσκόπια «αντίθετης φάσης» (*phase contrast*):** Αναπτύχθηκε για να ενισχυθεί η οπτική αντίθεση μεταξύ κυττάρου και περιβάλλοντος και να είναι διακριτές μικρές διαφορές στο εσωτερικό του κυττάρου, χωρίς να καταφεύγουμε στην χρώση των κυττάρων, η οποία τα θανατώνει.
 - **Μικροσκόπια «σκοτεινού πεδίου» (*dark field*):** Είναι μικροσκόπια εξαιρετικής ευκρίνειας και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό π.χ. μαστιγίων σε βακτήρια ή άλλων μικρολεπτομερειών του κυττάρου.
 - **Μικροσκόπια «φθορισμού» (*fluorescent microscopes*):** Χρησιμοποιούνται για να παρατηρηθούν δείγματα που φθορίζουν κάτω υπό την επίδραση κατάλληλων ακτινοβολιών. Συνήθως όμως χρησιμοποιούνται ειδικές ουσίες που φέρουν φθορίζοντα συστατικά και προσκολλώνται σε ειδικά τμήματα των βακτηρίων διευκολύνοντας πάρα πολύ την μελέτη των κυττάρων.
 - B. **Ηλεκτρονικά μικροσκόπια (*electron microscopes*):** Η λειτουργία τους βασίζεται στην χρήση ηλεκτρονίων (αντί φωτονίων) και μαγνητικών πεδίων που λειτουργούν ως φακοί (μαγνητικοί φακοί). Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια επιτυγχάνουν μεγεθύνσεις από 10.000 μέχρι 100.000 x (φορές).

- **Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transmission Electron Microscope – TEM):** Επιτυγχάνουν μεν μεγάλες και ευκρινείς μεγεθύνσεις αλλά έχουν πολύ μικρή διεισδυτικότητα (ακόμη και το πάχος ενός κυττάρου είναι μεγάλο) με αποτέλεσμα να απαιτείται να κοπεί το κύτταρο σε πολλές φέτες πάχους 20-60 nm, προκειμένου να μικροσκοπηθεί. Πρακτικά φωτογραφίες μικροσκοπίου που δείχνουν το εσωτερικό των κυττάρων, σε «επίπεδη μορφή», σε «τομή» είναι φωτογραφίες TEM.
 - **Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM):** Δίνουν εικόνες με μεγάλο βάθος πεδίου, δηλαδή μπορούμε, κατά κάποιον τρόπο να έχουμε τρισδιάστατες εικόνες ενός δείγματος. Φωτογραφίες που δείχνουν βακτήρια σε μεγάλες μεγεθύνσεις αλλά μόνο την επιφάνειά τους, προέρχονται από φωτογραφίες SEM.
- Γ. Μικροσκόπια ακίδας (probe microscopes):** Πολύ πρόσφατη εξέλιξη στην μικροσκόπηση. Επιτυγχάνουν μεγεθύνσεις μέχρι 100.000.000 x, δηλαδή μπορούν να «δουν» μέχρι και μόρια.
- Δ. Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy – AFM):** Μια εξαιρετικά μικρή ακίδα τοποθετείται πολύ κοντά στο δείγμα ώστε να αναπτύσσονται ασθενείς ατομικές δυνάμεις άπωσης μεταξύ τους. Καθώς η ακίδα διατρέχει το δείγμα οι διαφορές των δυνάμεων αυτών καταγράφονται, οπτικοποιούνται και δίνουν την τελική εικόνα.
- ❖ Πέρα από τα παραπάνω μικροσκόπια, υπάρχει ακόμα μια σειρά μικροσκοπίων τα οποία δίνουν πολύ καλής ποιότητας τρισδιάστατη απεικόνιση του μικροβιακού κόσμου. Τα περισσότερο γνωστά από αυτά είναι:
 - Μικροσκοπία διαφορικής αντίθεσης συμβολής (*Differential Interference Contrast – DIC*)
 - Μικροσκοπία συνεστιακής σάρωσης με λέιζερ (*Confocal Scanning Laser Microscopy – CLSM*).
 - ❖ **ΧΡΩΣΕΙΣ – ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ:** Οι μικροοργανισμοί εκτός του ότι είναι πολύ μικρού μεγέθους είναι και διαφανείς, με αποτέλεσμα η μικροσκόπησή τους να είναι, συχνά, πολύ δύσκολη. Προς επίλυση του προηγούμενου προβλήματος οι μικροοργανισμοί, υφίστανται χρώση (*staining*), δηλαδή βάφονται με ειδικές χρωστικές. Επίσης με τη βοήθεια ειδικών χρώσεων και χρωστικών μπορούμε να διαφοροποιήσουμε μικροοργανισμούς μεταξύ τους (Gram θετικοί ή Gram αρνητικοί) ή να διαπιστώσουμε εάν είναι ζωντανοί ή όχι ή να βάψουμε σπόρια ή προσαρτήματα του κυττάρου όπως βλεφαρίδες ή γλοία.
 - ❖ Υπάρχουν χρώσεις **θετικές (positive)** και **αρνητικές (negative)**. Στις θετικές χρώσεις βάφεται το κύτταρο και παραμένει διαφανές το πεδίο. Στις αρνητικές χρώσεις συμβαίνει το αντίθετο.
 - ❖ Υπάρχουν χρώσεις **απλές** και **σύνθετες**. Στις απλές χρησιμοποιείται μόνο μια χρωστική. Στις σύνθετες περισσότερες από μια χρωστικές.
 - ❖ Οι χρώσεις διακρίνονται σε γενικές όπου βάφεται ολόκληρος ο μικροοργανισμός και σε ειδικές όπου βάφονται τμήματα του μικροοργανισμού. Ειδικές χρώσεις χρησιμοποιούνται στην βαφή σπορίων, βλεφαρίδων, πυρήνων και άλλων.
 - ❖ Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι η διαδικασία των μικροσκοπήσεων είναι αρκετά δύσκολη και εξειδικευμένη. Τα δείγματα προς μικροσκόπηση δεν μικροσκοπούνται πάντα ως έχουν αλλά συχνά έχει προηγηθεί η δύσκολη και τεχνικά απαιτητική διαδικασία της «στερεοποίησης» ή «μονιμοποίησης» (*fixation*). Εάν η τελευταία δεν είναι σωστή αυτό που τελικά θα παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο δεν θα είναι η πραγματική αλλά μια παραπλανητική εικόνα του δείγματος η οποία έχει προκληθεί από την

διαδικασία της «στερεοποίησης». Οι στερεοποίηση μπορεί να είναι είτε με θέρμανση (*heat fixation*) είτε με χημικά μέσα (*chemical fixation*).

- ❖ Υπάρχουν διάφορες χρώσεις ανάλογα με το τι θέλουμε να μελετήσουμε κάθε φορά. Η περισσότερο, ίσως, χρησιμοποιείται χρώση είναι η **χρώση Gram** που πήρε το όνομά της από αυτόν που την εισήγαγε πρώτος το 1884, τον Δανό Christian Gram.
- ❖ Σε μια σύνθετη χρώση απαιτούνται:
 - **Χρωστικές (dyes)**: Πρόκειται περί ουσιών, συνήθως φυτικής προελεύσεως, που έχουν την δυνατότητα να συνδέονται , και άρα να βάφουν, μέρη του κυττάρου. Οι χρωστικές διακρίνονται σε όξινες (*acidic dyes*) και αλκαλικές-βασικές (*basic dyes*). Συνήθως στην μικροβιολογία χρησιμοποιούνται οι αλκαλικές-βασικές χρωστικές διότι το βακτηριακό κύτταρο έχει αρνητικό φορτίο.
 - **Πρόστυμμα ή πρόστυψη (mordant)**: Πρόστυμμα ή πρόστυψη είναι ουσίες ή διαδικασίες, αντίστοιχα που ενισχύουν την δράση της χρωστικής, χωρίς, όμως οι ίδιες να είναι χρωστικές. Χαρακτηριστική περίπτωση προστύμματος είναι το Lugol ή Ιωδίνη (iodine), ενώ η χρήση θέρμανσης για την ενίσχυση μιας χρώσης είναι πρόστυψη. Φυσικά προστύμματα είναι το ξύδι που χρησιμοποιείται π.χ. στην βαφή των αυγών ή το αλάτι σε συνδυασμό με βρασμό για την βαφή των ρούχων, κατά το παρελθόν, με φυτικά χρώματα.
 - **Παράγοντας αποχρωματισμού ή διαφοροποίησης (decolorizing agent)**: Παράγοντας αποχρωματισμού είναι, οργανικά διαλύματα (π.χ. αλκοόλη-κετόνη, όξινη αλκοόλη) τα οποία χρησιμοποιούνται σε σύνθετες χρώσεις με στόχο να απομακρύνουν την χρωστική εκείνη η οποία δεν έβαψε πραγματικά το κύτταρο. Ανάλογα με το είδος της χρωστικής που απομακρύνει (ή δεν απομακρύνει) από ένα κύτταρο το διαφοροποιεί από άλλα κύτταρα. Παράδειγμα, στην χρώση Gram η αλκοόλη-κετόνη μπορεί να απομακρύνει το ιώδες της γενθιανής μόνο από τα Gram αρνητικά βακτήρια ενώ δεν μπορεί να κάνει το ίδιο από τα Gram θετικά, άρα διαφοροποιεί τα μεν από τα δε.
- ❖ Μία από τις περισσότερο γνωστές και περισσότερο χρησιμοποιούμενες, στην Βακτηριολογία, χρώσεις είναι η χρώση Gram:
 - **Χρώση Gram (Gram staining)**: Είναι μία σύνθετη χρώση που απαιτεί την χρήση δύο χρωστικών (ιώδες της γενθιανής και φουξίνη), ενός προστύμματος (Lugol) και ενός παράγοντα αποχρωματισμού (αλκοόλη – ακετόνη). Διαχωρίζει τα βακτηριακά κύτταρα σε δύο μεγάλες ομάδες: τα Gram αρνητικά και τα Gram αρνητικά (βλέπε κεφάλαιο 3). Τα Gram θετικά βακτήρια βάφονται με το ιώδες της γενθιανής και έχουν «ιώδες/μπλε» χρώμα ενώ τα Gram αρνητικά έχουν χρώμα «φούξια/κόκκινο» διότι βάφονται με την φουξίνη. Προϋπόθεση για σωστή χρώση είναι το κυτταρικό τοίχωμα και η κυτταρική μεμβράνη να είναι σε καλή κατάσταση, δηλαδή η κυτταρική καλλιέργεια να είναι νεαρή (επώαση 18-48h) ανάλογα με το είδος του βακτηρίου.
- ❖ **ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ (culture media)**: Είναι τα υλικά εκείνα τα οποία παρέχουν όλα τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Υπάρχει πολύ μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων που επιτρέπουν την ανάπτυξη πληθούς ειδών μικροοργανισμών. Ωστόσο αναφέρεται ότι μόλις το 99% των μικροοργανισμών στην βιόσφαιρα μπορούν να αναπτυχθούν σε υποστρώματα, διότι οι διατροφικές απαιτήσεις τους καθώς και γενικότερα οι συνθήκες που απαιτούνται για την ανάπτυξή τους δεν είναι δυνατόν να αναπαραχθούν στο εργαστήριο.
- ❖ **Άγαρ**: Τα υποστρώματα μπορεί να είναι είτε στερεά είτε υγρά. Το μέσο στερεοποίησης ενός υποστρώματος είναι το άγαρ (*agar*), το οποίο προστιθέμενο σε ένα υδατικό διάλυμα δεσμεύει μόρια

νερού και το σταθεροποιεί. Πρόκειται για όξινο πολυσακχαρίτη που προέρχεται από ειδικές καλλιέργειες φυκών (άλγες). Τα πλεονεκτήματα του συστατικού αυτού (άγαρ) που το κάνουν αναντικατάστατο στην μικροβιολογία είναι:

- ότι δεν έχει υπάρξει μέχρι σήμερα μικροοργανισμός που να συνθέτει ένζυμο που να το διασπά, και συνεπώς να το ρευστοποιεί. Συνεπώς το καθαρό άγαρ (συνήθως αναφέρεται ως άγαρ-άγαρ) δεν έχει θρεπτικές ιδιότητες.
- μπορεί και παραμένει στερεό σε θερμοκρασίες επώασης των τρυβλίων στους κλιβάνους επώασης σε αντίθεση με άλλα μέσα στερεοποίησης τα οποία ρευστοποιούνται

❖ Υπάρχουν διάφοροι τύποι υποστρωμάτων με βάση:

A. Την «φυσική» τους κατάσταση: Διακρίνονται σε υγρά και στερεά υποστρώματα.

- **Υγρά υποστρώματα (*broth media*):** Είναι υδατικά διαλύματα που περιέχουν όλες τις θρεπτικές ουσίες που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης τα υγρά υποστρώματα περιέχουν κατάλληλους συνδυασμούς αλάτων τα οποία παρέχουν ρυθμιστικές ιδιότητες σε αυτά – δηλαδή διατηρούν - κατά το δυνατόν περισσότερο - σταθερή την τιμή pH πλησίον της ιδανικής για την ανάπτυξη του βακτηρίου παρόλο που η καλλιέργεια παράγει μεταβολίτες π.χ. οξέα και τείνει να την μεταβάλει. Τα κύτταρα των μικροοργανισμών στις υγρές καλλιέργειες βρίσκονται σε πλακτονική μορφή (*Planktonic Cells*).
- **Στερεά υποστρώματα (*solid media*):** Είναι στερεά υποστρώματα που περιέχουν άγαρ σε ποσοστά 12-14% κ.β. Στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των υποστρωμάτων αναπτύσσονται τα βακτήρια υπό την μορφή αποικιών. Αν προσθέσουμε λιγότερο από 12% κ.β. άγαρ το υπόστρωμα δεν θα στερεοποιηθεί. Αντίθετα, αν το ποσοστό του άγαρ είναι σημαντικά μεγαλύτερο από το 14% κ.β. τότε το υπόστρωμα είναι υπερβολικά πηκτό, έχει δεσμεύσει μεγάλη ποσότητα νερού, οπότε το διαθέσιμο νερό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι περιορισμένο.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι είναι απολύτως απαραίτητα για την Μικροβιολογία τόσο τα υγρά όσο και τα στερεά υποστρώματα. Στα υγρά υποστρώματα έχουμε την ανάπτυξη κυττάρων που βρίσκονται σε διαφορετική φυσιολογική κατάσταση σε σύγκριση με τα κύτταρα των αποικιών στα στερεά υποστρώματα τα οποία βρίσκονται συγκεντρωμένα με αποτέλεσμα τα προϊόντα του μεταβολισμού τους να είναι συμπυκνωμένα γύρω τους.

Τα στερεά υποστρώματα είναι απολύτως απαραίτητα διότι στην επιφάνειά τους, αναπτύσσονται «αποικίες» οι οποίες έχουν προέλθει από ένα μεμονωμένο κύτταρο. Συνεπώς μας δίνεται η δυνατότητα από μια μικτή υγρή καλλιέργεια να απομονώσουμε τις αποικίες που μας ενδιαφέρουν, κάτι που δεν είναι εφικτό να συμβεί σε μια μικτή υγρή καλλιέργεια όπου τα μεμονωμένα κύτταρα είναι ελεύθερα, και είναι αδύνατον οπτικά να εντοπισθούν και να απομονωθούν. Κατά κάποιο τρόπο ένα στερεό υπόστρωμα δρα ως «μέσο παγίδευσης/σταθεροποίησης» ενός κυττάρου, ή ως «μεγεθυντικός φακός» διότι μας δίνει την δυνατότητα να χειριστούμε βλέποντας δια γυμνού οφθαλμού μια αποικία η οποία, ουσιαστικά, είναι ένα κύτταρο πολλαπλασιασμένο χιλιάδες φορές.

B. Την σύστασή τους: Τα υποστρώματα με βάση τη σύστασή τους διακρίνονται σε συνθετικά (*synthetic* ή *defined*) και φυσικά ή σύνθετα (*complex*).

- **Σύνθετα υποστρώματα:** Είναι υποστρώματα των οποίων η σύσταση δεν είναι με απόλυτη ακρίβεια γνωστή, π.χ. εκχύλισμα κακάο, ορός αίματος, κ.α. Χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη μικροοργανισμών από πολύ ειδικά περιβάλλοντα σε μία προσπάθεια να παρέχουμε σε αυτούς ειδικά διατροφικά στοιχεία για να μπορέσουν να αναπτυχθούν. Μόνο για ερευνητικούς σκοπούς.
- **Συνθετικά υποστρώματα:** Είναι τα υποστρώματα εκείνα των οποίων η σύσταση είναι γνωστή με απόλυτη ακρίβεια. Είναι τα κλασικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια ανάλυσης τροφίμων.

Γ. Τη χρήση τους: Τα υποστρώματα με βάση την χρήση τους διακρίνονται σε γενικά, εκλεκτικά (*selective*), εμπλουτιστικά (*enriched*) και διαφοροποίησης/ χρωμογόνα (*differential/ chromogenic*).

- **Γενικό υπόστρωμα:** Είναι υποστρώματα των οποίων η σύσταση επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων ειδών βακτηρίων (όχι βέβαια των περισσότερων απαιτητικών).
- **Εμπλουτιστικά υποστρώματα:** Είναι τα υποστρώματα εκείνα των οποίων η σύσταση ευνοεί ιδιαίτερα την ανάπτυξη ενός είδους ή γένους μικροοργανισμών, χωρίς ωστόσο να θανατώνει τα υπόλοιπα είδη μικροοργανισμών που συνυπάρχουν στο δείγμα. Συνήθως περιέχουν «*αυξητικούς παράγοντες*» δηλαδή ουσίες οι οποίες είναι εντελώς απαραίτητες για την ανάπτυξη ορισμένων ειδών μικροοργανισμών.
- **Εκλεκτικά υποστρώματα:** Είναι τα υποστρώματα εκείνα των οποίων η σύσταση επιτρέπει την ανάπτυξη ενός μόνο είδους μικροοργανισμών, θανατώνοντας όλους τους υπόλοιπους που συνυπάρχουν στο δείγμα. Εκλεκτικοί παράγοντες μπορεί, επίσης να είναι χημικές ουσίες (π.χ. αντιβιοτικά), χαμηλές τιμές pH (<3.5) ή υψηλές θερμοκρασίες επώασης (π.χ. 44,1°C).
- **Διαφοροποίησης:** Είναι τα υποστρώματα εκείνα τα οποία στην σύστασή τους περιέχουν πολύ ειδικά συστατικά τα οποία διαφοροποιούν μορφολογικά αποικίες διαφορετικών ειδών βακτηρίων (π.χ. οι αποικίες *Listeria monocytogenes* σε υπόστρωμα ALOA εμφανίζονται να περιβάλλονται από θαμπή ζώνη). Συχνά ονομάζονται και χρωμογόνα (*chromogenic*).

❖ **Καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου:** Είναι η καλλιέργεια εκείνη η οποία αποτελείται αποκλειστικά από ένα είδος βακτηρίου και έχει προέλθει από ένα αρχικό μεμονωμένο κύτταρο (*single cell*). Οι καθαρές καλλιέργειες προέρχονται από μικτές καλλιέργειες, δηλαδή από καλλιέργειες που αποτελούνται από πολλά και διαφορετικά είδη βακτηρίων. Πολύ συχνά στην Μικροβιολογική πρακτική χρειάζεται να απομονώνουμε «*καθαρές*» αποικίες για να μπορούμε να τις μελετούμε και να εξάγουμε πληροφορίες σχετικά με το δείγμα μας (π.χ. απομόνωση *Salmonella* spp. σ' ένα τρόφιμο το καθιστά ακατάλληλο για κατανάλωση).

Για την απομόνωση καθαρών καλλιιεργειών απαιτείται συνδυασμός ενός ή περισσότερων από τους παρακάτω παράγοντες - ενδεικτικά:

- Χρήση εμπλουτιστικών υποστρωμάτων.
- Χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων που συνήθως περιέχουν κατάλληλα αντιβιοτικά
- Επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού.

- Ανάπτυξη σε κατάλληλη οξειδοαναγωγική ατμόσφαιρα (αερόβια, αναερόβια, μικροαερόφιλο).
 - Ανάπτυξη σε pH διαφορετικών τιμών
- ❖ Υπάρχουν πολύ λίγοι μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν είναι δυνατόν να αναπτυχθούν σε υγρά αλλά μόνο σε στερεά υποστρώματα, π.χ. το βακτήριο *Legionella* που είναι παθογόνο για τον άνθρωπο και προκαλεί την λεγόμενη «νόσο των Λεγεωναρίων».
- Επίσης υπάρχουν μικροοργανισμοί που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κανενός είδους συνθετικά υποστρώματα αλλά μόνο σε ζωντανά κύτταρα ή ακόμα και σε ζωντανούς ξενιστές. Το βακτήριο που προκαλεί την λέπρα (*Mycobacterium leprae*) αναπτύσσεται σε Αρμαντίλο ή το βακτήριο που προκαλεί την σύφιλη (*Treponema pallidum*) αναπτύσσεται σε κουνέλια.
- ❖ **Μονάδα μέτρησης** του πληθυσμού ζωντανών βακτηρίων είναι το «**cfu/mL**» που προέρχεται από τον όρο «**colony forming units / mL**» που εκφράζει «τον αριθμό των αποικιών που έχουν αναπτυχθεί σ' ένα τρυβλίο και έχουν προέλθει από ένα κύτταρο και περιέχονταν σ' ένα ml ή g δείγματος».
- ❖ Οι μικροβιολογικές αναλύσεις διακρίνονται στις δύο ακόλουθες μεγάλες ομάδες με βάση αποκλειστικά το τελικό αποτέλεσμα:
- **Ποιοτικές αναλύσεις (Qualitative analyses):** Στις αναλύσεις αυτές μας ενδιαφέρει η παρουσία ή μη ενός είδους μικροοργανισμών χωρίς να μας ενδιαφέρει ο πληθυσμός τους.
 - **Ποσοτικές αναλύσεις (Quantitative analyses):** Στις ποσοτικές αναλύσεις καταμετρούμε τον πληθυσμό των μικροοργανισμών που μας ενδιαφέρουν.
- ❖ **Μεθοδολογίες καταμέτρησης των μικροοργανισμών:** Έχουν αναπτυχθεί πάρα πολλές διάφορες τεχνικές μέτρησης του πληθυσμού των μικροοργανισμών με επιμέρους πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα η κάθε μία, διακρίνονται δε στις δύο ακόλουθες μεγάλες ομάδες:
- A. Άμεσες μέθοδοι καταμέτρησης του πληθυσμού (direct methods)**
Ονομάζονται έτσι διότι σε αυτές μετράμε τα κύτταρα των μικροοργανισμών άμεσα.
- **Μέθοδος των τρυβλίων (plate counts):** Όταν δείγματα, από την εμπειρία, γνωρίζουμε ότι περιέχουν μεγάλο πληθυσμό βακτηρίων, αραιώνονται διαδοχικά με δεκαδικές αραιώσεις σε ρυθμιστικό διάλυμα και κατόπιν προσθέτονται σε τρυβλία που περιέχουν το κατάλληλο υπόστρωμα. Μετά από επώαση στην άριστη θερμοκρασία για τον μικροοργανισμό καταμετρώνται οι αποικίες των ζωντανών κυττάρων (*viable counts*).
 - **Μέθοδος της διήθησης (membrane filtration):** Όταν δείγματα, από την εμπειρία, γνωρίζουμε ότι περιέχουν μικρό πληθυσμό βακτηρίων, τότε απαιτούνται σχετικά υψηλές ποσότητες υγρού δείγματος (250–1.000 ml), απαλλαγμένου από στερεά, οι οποίες περνούν από ειδικό αποστειρωμένο φίλτρο (ηθμός) το οποίο συγκρατεί τα βακτήρια και μόνο. Ο ηθμός τοποθετείται στην επιφάνεια κατάλληλου υποστρώματος όπου μετά από κατάλληλη επώαση καταμετρώνται οι αποικίες των ζωντανών κυττάρων (*viable counts*).

- **Μέθοδος του πλέον πιθανού αριθμού (*Most Probable Number – MPN*):** Πρόκειται περί τεχνικής που βασίζεται σε στατιστικούς πίνακες. Πραγματοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος και κατόπιν 3 ml από κάθε αραιώση μεταφέρονται σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες (1 ml σε κάθε σωλήνα). Ακολουθεί επώαση και με βάση τον αριθμό των θετικών σωλήνων και την χρήση κατάλληλων πινάκων (McCrary) μπορούμε να υπολογίσουμε τον αρχικό αριθμό των ζωντανών βακτηρίων στο δείγμα. Χρησιμοποιείται για δείγματα που πιθανολογούμε ότι έχουν χαμηλό αριθμό μικροοργανισμών.
- **Μέθοδος της μικροσκόπησης (*microscopic counts*):** Σε κατάλληλες ειδικά βαθμονομημένες πλάκες τοποθετείται με ακρίβεια ποσότητα δείγματος και ακολουθεί μικροσκόπηση. Συχνά τα βακτήρια έχουν υποστεί χρώση για να είναι ευκολότερα να καταμετρηθούν. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητά της ενώ στα μειονεκτήματά της περιλαμβάνονται: δεν είναι ιδιαίτερα ακριβής ειδικά σε δείγματα που περιέχουν μικρό αριθμό βακτηρίων ($< 10^6$ cfu/ml), δεν μπορεί να γίνει, πάντα, διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών βακτηρίων. Επίσης, τα κινητά βακτήρια για να καταμετρηθούν θα πρέπει να ακινητοποιηθούν. Πολύ διαδεδομένη ακόμα και στις μέρες μας είναι η μέθοδος Howard η οποία χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση μυκηλιακών υφών σε φυτικούς ιστούς (ποσοστό μούχλας).
- **Κυτταρομετρία ροής (*flow cytometry*):** Πρόκειται για εξαιρετικά ακριβή, ταχεία μέτρηση καταμέτρησης μικροοργανισμών μέσω δέσμης ή δεσμών laser. Συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί ανάλογα με το είδος τους, έχουν στην επιφάνειά τους ειδικούς ιχνηθέτες που εκπέμπουν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ανάλογα με την συχνότητα της ακτινοβολίας που προσπίπτει σε αυτούς. Τα κύτταρα εξαναγκάζονται να περάσουν μέσα από ένα τριχοειδή σωλήνα ένα προς ένα. Καθώς διέρχονται από τον τριχοειδή σωλήνα, δέχονται την επίδραση της ακτινοβολίας, εκπέμπουν και έτσι καταμετρώνται. Είναι μια ακριβή μέθοδος, σπανίως χρησιμοποιείται σε βιομηχανίες τροφίμων, αντίθετα όμως βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στα Νοσοκομεία.

B. Έμμεσες μέθοδοι (*indirect methods*): Σε αυτές τις μεθόδους η καταμέτρηση του πληθυσμού γίνεται με έμμεσο τρόπο, δηλαδή δεν καταμετρώνται τα κύτταρα ή οι αποικίες αλλά γίνεται έμμεσα η εκτίμησή τους μέσω περισσότερο ή λιγότερο εξειδικευμένων μεταβολικών προϊόντων που παράγουν οι μικροοργανισμοί. Κοινό χαρακτηριστικό των μεθόδων αυτών είναι η ταχύτητα η οποία είναι απαραίτητη σε πολλές περιπτώσεις. Υπάρχουν πάρα πολλές τεχνικές έμμεσου προσδιορισμού του πληθυσμού μικροοργανισμών και συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Αυτές που ονομαστικά αναφέρονται είναι απολύτως ενδεικτικές.

- **Μεταβολική δραστηριότητα (*metabolic activity*):** Είναι δυνατόν, υπό προϋποθέσεις, να μετρηθεί ο πληθυσμός μικροβίων σε ένα δείγμα με βάση την συγκέντρωση των παραπροϊόντων τους (π.χ. οργανικά οξέα). Και πάλι δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων.
- **Αγωγιμομετρία (*conductivity*):** Στις περισσότερες συσκευές ο τρόπος καταμέτρησης μικροοργανισμών στις συσκευές αυτές βασίζεται στην αρχή της αγωγιμότητας του ηλεκτρικού ρεύματος. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των βακτηρίων στο υγρό δείγμα τόσο μικρότερη είναι η αγωγιμότητά του. Οι ηλεκτρονικοί καταμετρητές χρησιμοποιούνται πολύ στην βιομηχανία τροφίμων (π.χ. BactoScan) διότι αναλύουν χιλιάδες δείγματα την ώρα και δίνουν άμεσα αποτελέσματα χωρίς να μεσολαβεί ο χρόνος της επώασης. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν γίνεται διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

- **Θολερομετρία (*turbidity*):** Ισχύει, υπό προϋποθέσεις, ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο πληθυσμός των βακτηρίων σε ένα υγρό διάλυμα τόσο μεγαλύτερος είναι ο σκεδασμός φωτός από τα κύτταρα άρα τόσο μεγαλύτερη η θολερότητα. Είναι ταχύτατη μέθοδος αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για υγρά, διαυγή δείγματα, και δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων.
- **Ξηρό βάρος (*dry weight*):** Η μέτρηση της βιομάζα ή του ξηρού βάρους των μικροοργανισμών χρησιμοποιείται κυρίως για την μέτρηση μυκήτων διότι η μορφολογία των αποικιών τους σε τρυβλία δεν διευκολύνει την καταμέτρησή τους.

Ερωτήσεις

Οι απαντήσεις των ερωτήσεων μπορεί να προέρχονται από τις διαφάνειες του μαθήματος, τις συζητήσεις επί των ερωτήσεων κατά τη διάρκεια του μαθήματος, καθώς και οποιαδήποτε άλλη έγκυρη επιστημονική πηγή

1. Τί είναι η μικροσκόπηση;
2. Για ποιούς λόγους μικροσκοπούμε μικροοργανισμούς;
3. Πόσοι τύποι μικροσκοπιών υπάρχουν;
4. Που βασίζεται η λειτουργία των οπτικών μικροσκοπιών; Μέχρι πόσο μπορεί να φθάσει η μεγέθυνσή τους;
5. Που βασίζεται η λειτουργία των ηλεκτρονιακών μικροσκοπιών; Μέχρι πόσο μπορεί να φθάσει η μεγέθυνσή τους; Αναφέρατε δύο μικροσκοπία αυτού του τύπου.
6. Που βασίζεται η λειτουργία των μικροσκοπιών ακίδας; Μέχρι πόσο μπορεί να φθάσει η μεγέθυνσή τους;
7. Κατά την διενέργεια των εργαστηριακών ασκήσεων τις είδους μικροσκοπία χρησιμοποιήσατε;
8. Τί είναι τα «μικροσκοπία φθορισμού»;
9. Κατά την μικροσκόπηση τα βακτήρια είναι ζωντανά ή όχι ;
10. Τί είναι «χρώση» ενός μικροοργανισμού;
11. Τί είναι «στερεοποίηση» ή «μονιμοποίηση» ενός δείγματος προς μικροσκόπηση;
12. Τι είναι «πρόστρωμα» ή «πρόστρωμα»;
13. Τί είναι «παράγοντας αποχρωματισμού» ή «παράγοντας διαφοροποίησης»;
14. Πώς μπορούμε να είμαστε βέβαιοι ότι μια χρώση Gram έδωσε σωστό αποτέλεσμα;
15. Τί είναι υπόστρωμα;
16. Τί συνήθως, περιέχουν τα περισσότερα υποστρώματα;
17. Τί είναι το άγαρ; Από που προέρχεται; Γιατί το χρησιμοποιούμε στην Μικροβιολογία;
18. Έχει το άγαρ θρεπτικές ιδιότητες;
19. Γιατί στην μικροβιολογική πρακτική χρησιμοποιούμε και υγρά και στερεά υποστρώματα;
20. Πόσο άγαρ (% κ.β.) πρέπει να προσθέσουμε σ' ένα υπόστρωμα ώστε να το στερεοποιήσουμε; Τί θα συμβεί εάν προσθέσουμε λιγότερο ή περισσότερο από την κατάλληλη ποσότητα;
21. Σε τι διακρίνονται τα υποστρώματα με βάση:
 - (α) την φυσική τους κατάσταση
 - (β) την σύστασή τους
 - (γ) την χρήση τους
22. Σε ένα οικιακό ψυγείο υπάρχουν υποστρώματα;
23. Τί είναι εμπλουτιστικό υπόστρωμα;
24. Τί είναι εκλεκτικό υπόστρωμα;
25. Τί είναι τα υποστρώματα διαφοροποίησης;
26. Τί είναι καθαρή καλλιέργεια;
27. Τί σημαίνει ο όρος «cfu/mL»;

- 28.** Οι Μικροβιολογικές αναλύσεις διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες. Ποιές είναι αυτές;
- 29.** Θέλουμε να μετρήσουμε τον πληθυσμό των βακτηρίων μιας, δεξαμενής πόσιμου νερού. Ποιά μέθοδο καταμέτρησης μικροοργανισμών θα επιλέξετε και γιατί;
- 30.** Έχουμε δείγμα για μικροβιολογική ανάλυση το οποίο γνωρίζουμε ότι περιέχει μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Ποιά μέθοδο ανάλυσης θα χρησιμοποιήσετε και γιατί;
- 31.** Έχουμε δείγμα για μικροβιολογική ανάλυση το οποίο γνωρίζουμε ότι περιέχει μικρό αριθμό μικροοργανισμών. Ποιά μέθοδο ανάλυσης θα χρησιμοποιήσετε και γιατί;
- 32.** Στο εργαστήριο φθάνει δείγμα για το οποίο θέλουμε άμεσα να καταγράψουμε τον αριθμό των μικροοργανισμών που υπάρχουν. Ποιά τεχνική προτείνετε;
- 33.** Εάν θέλουμε να καταγράψουμε τον πληθυσμό σε χιλιάδες δείγματα μέσα σε διάστημα λίγων ωρών, ποιο τύπο μεθόδων θα προτείνετε; Γιατί στα εργαστήρια ανάλυσης τροφίμων δεν χρησιμοποιούν την μέθοδο αυτή;