



Γενική Μικροβιολογία

Ενότητα 9^η

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ

Όνομα καθηγητή: **Δ. ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΣ**

Όνομα καθηγητή: **Γ. ΖΕΡΒΑΚΗΣ**

Όνομα καθηγητή: **ΑΝ. ΤΑΜΠΑΚΑΚΗ**

Τμήμα: **ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



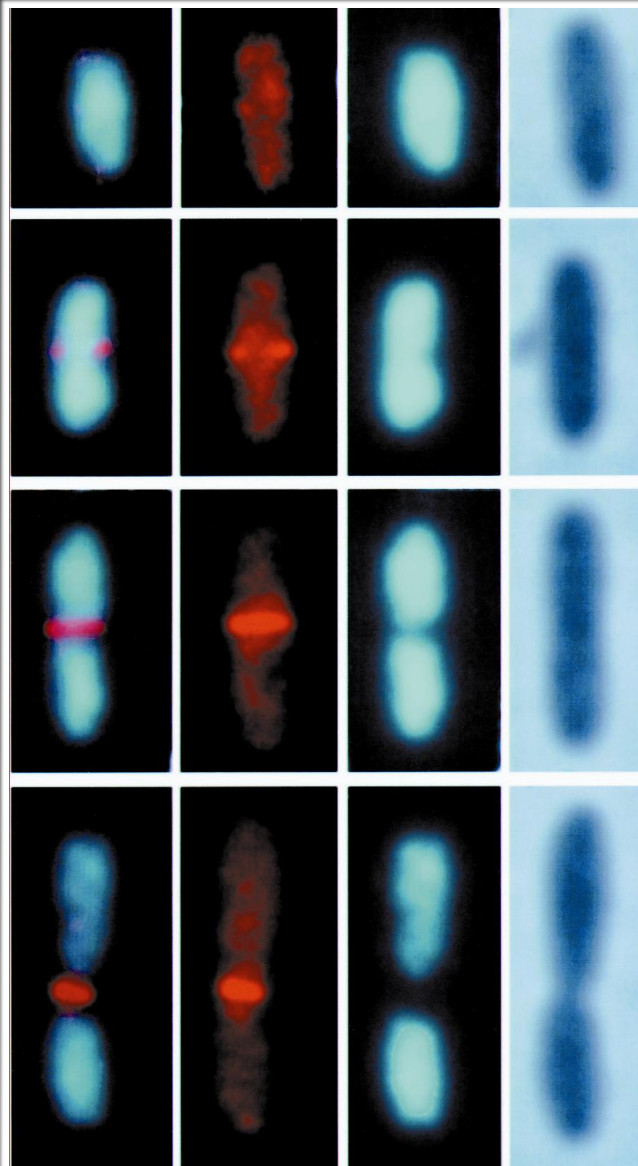


ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

- Παρουσίαση της κυτταρικής διαίρεσης και των κύριων μεθόδων καταμέτρησης μικροοργανισμών
- Συνοπτική παρουσίαση της συνεχούς καλλιέργειας μικροοργανισμών



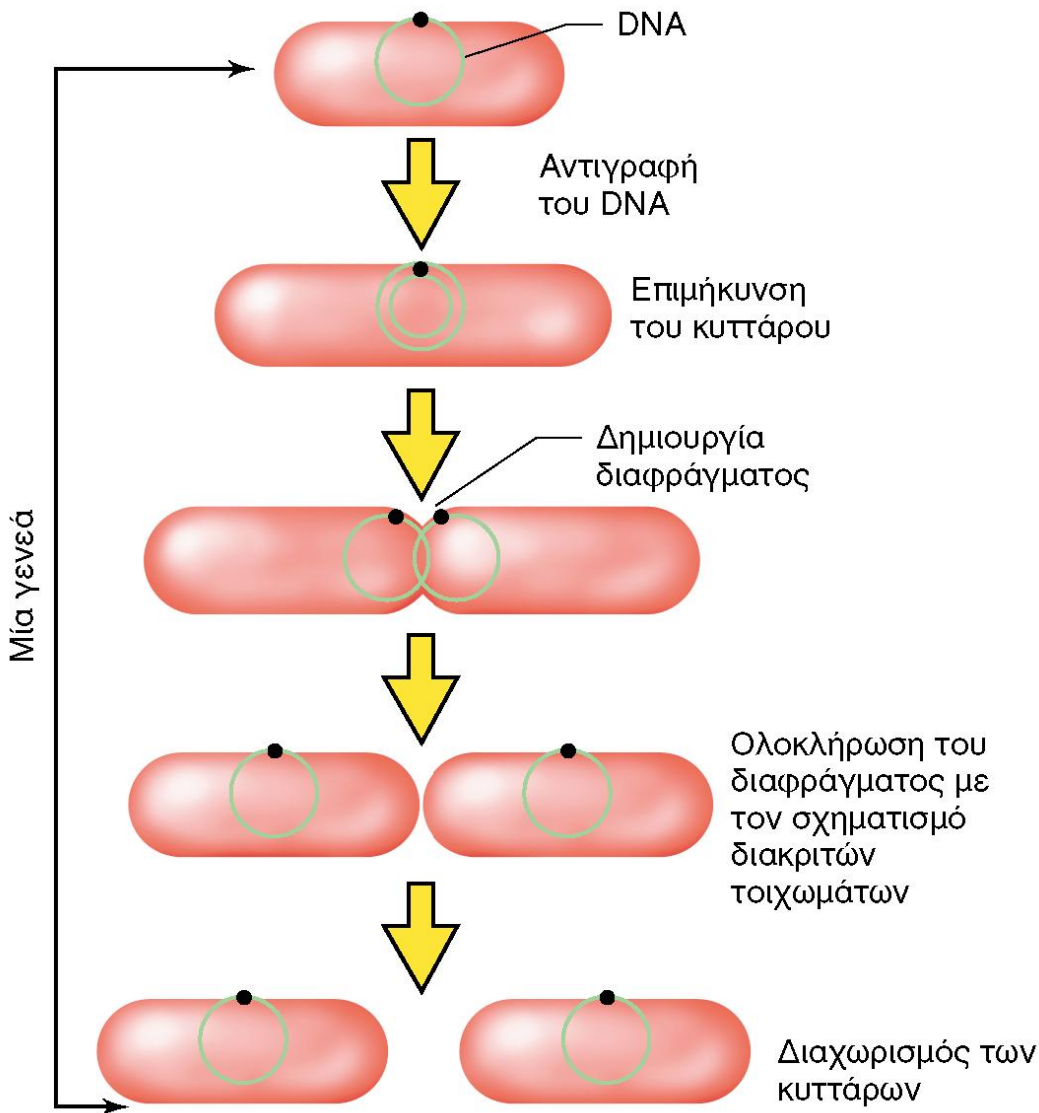
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ



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.



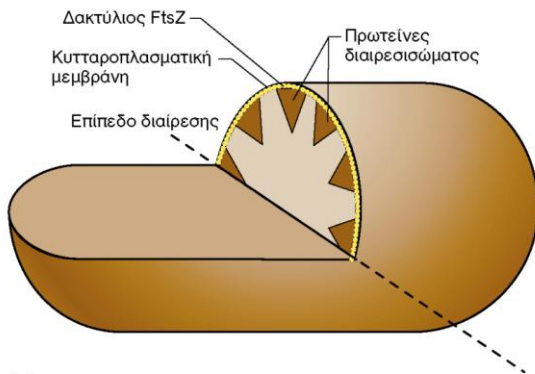
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΧΟΤΟΜΗΣΗΣ



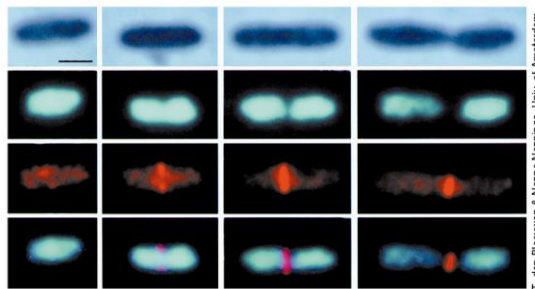
Εικόνα 6.1: Η όλη διαδικασία διχοτόμησης ενός ραβδόμορφου προκαρυωτικού οργανισμού. Για λόγους απλότητας, το πυρηνοειδές απεικονίζεται ως ένας απλός πράσινος κύκλος.



ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ



(α)



T. den Blaauwen & Nieme-Nanninga, Univ. of Amsterdam

Πρωτεΐνες Fts (Filamentous temperature sensitive)

Κυτταρικό Σχήμα Προκαρυωτικών

Ειδικές Πρωτεΐνες καθορισμού σχήματος

Πρωτεΐνη MreB, μοιάζει με ακτίνη

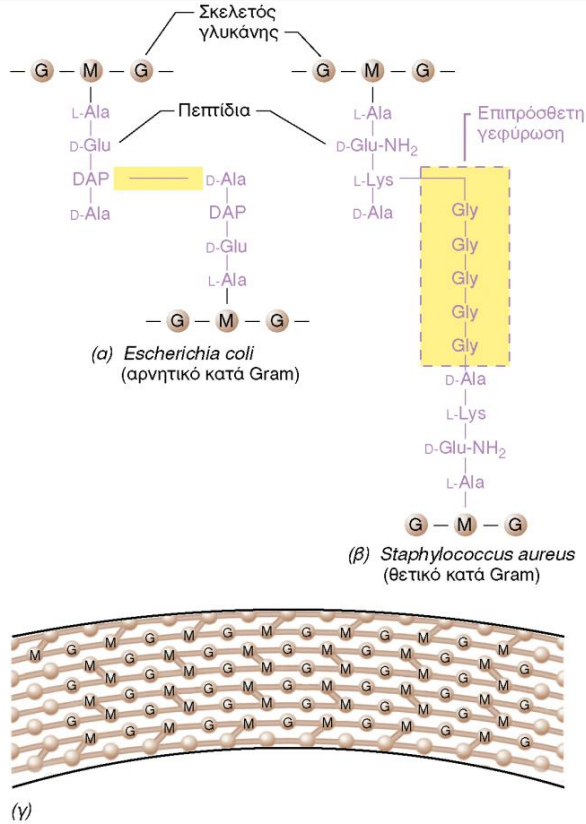
Ευκαρυωτικών

- Δημιουργία κυτταροσκελετού
- Όχι στους κόκκους (άρα το «προδιαγεγραμμένο» σχήμα είναι το σφαιρικό)

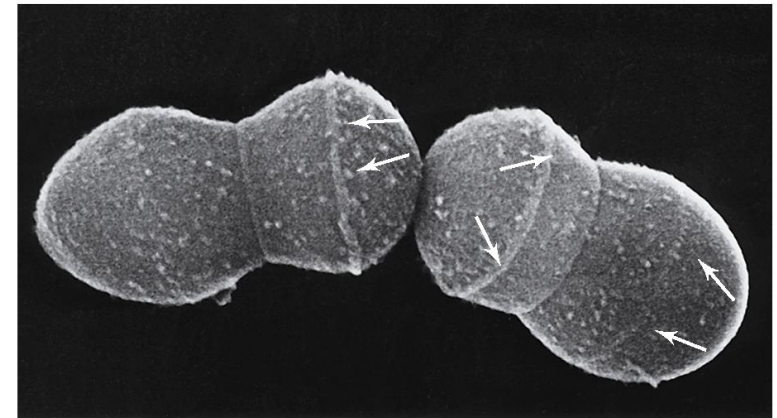
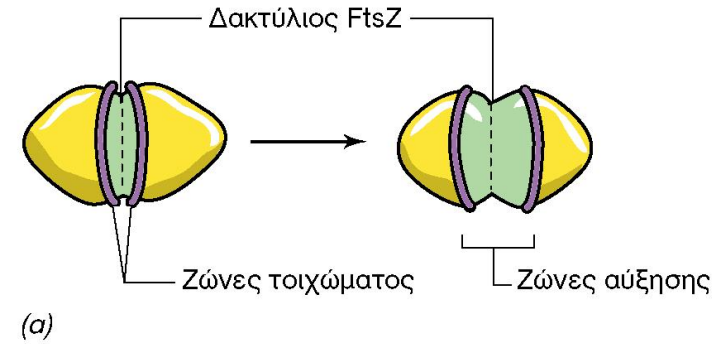
Εικόνα 6.2: Ο δακτύλιος FtsZ και η κυτταρική διαίρεση. (α) Εγκάρσια τομή ραβδόμορφου κυττάρου, όπου φαίνονται τα μόρια του δακτυλίου FtsZ γύρω από το επίπεδο της διαίρεσης. (β) Σχηματισμός και αποδόμηση του δακτυλίου FtsZ κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στο βακτήριο *Escherichia coli*. Μικροσκοπία: 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, 1μm.



ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ



Εικόνα 4.1: Τρόποι συνδυασμού των μονάδων πεπτιδίων και γλυκάνης κατά τον σχηματισμό του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης. (α) Χωρίς πρόσθετες γεφυρώσεις (στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια), (β) Με πρόσθετες γεφυρώσεις γλυκινων (στο θετικό κατά Gram βακτήριο *Staphylococcus aureus*). (γ) Συνολική εικόνα της δομής της πεπτιδογλυκάνης. Το διάγραμμα απεικονίζει διαδοχικές στρώσεις πεπτιδογλυκάνης διασυνδεδεμένες μεταξύ τους. Η πλήρης σιβάδα της πεπτιδογλυκάνης αποτελεί μια συνεχή περιοχή τέτοιων στρώσεων που περικλείει, στον τρισδιάστατο χώρο, το (κυλινδρικό ή σφαιρικό) κύτταρο. G, N-ακετυλογλυκοζαμίνη· M, N-ακετυλομουραμικό οξύ.

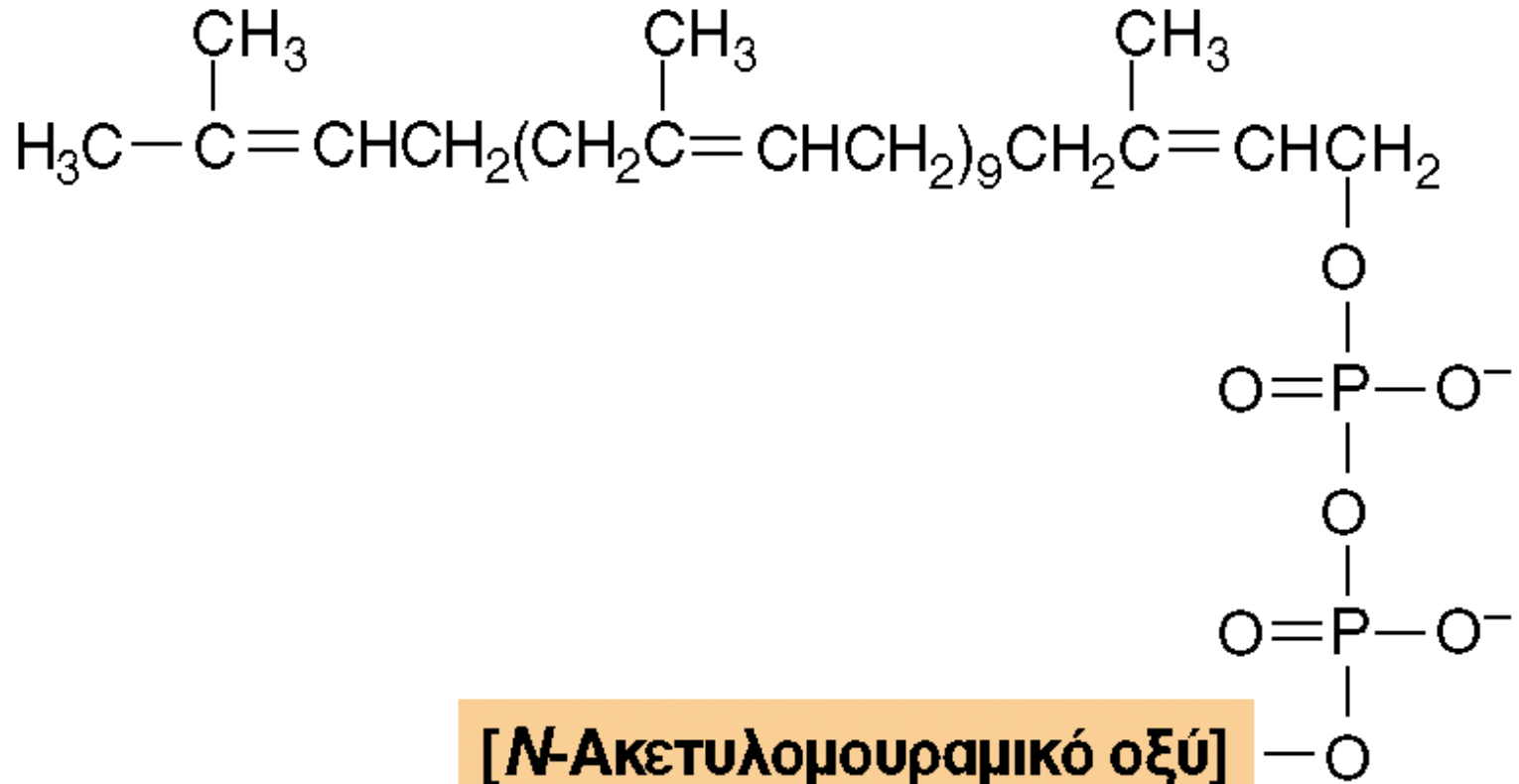


A. Urneda and K. Ameko

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.



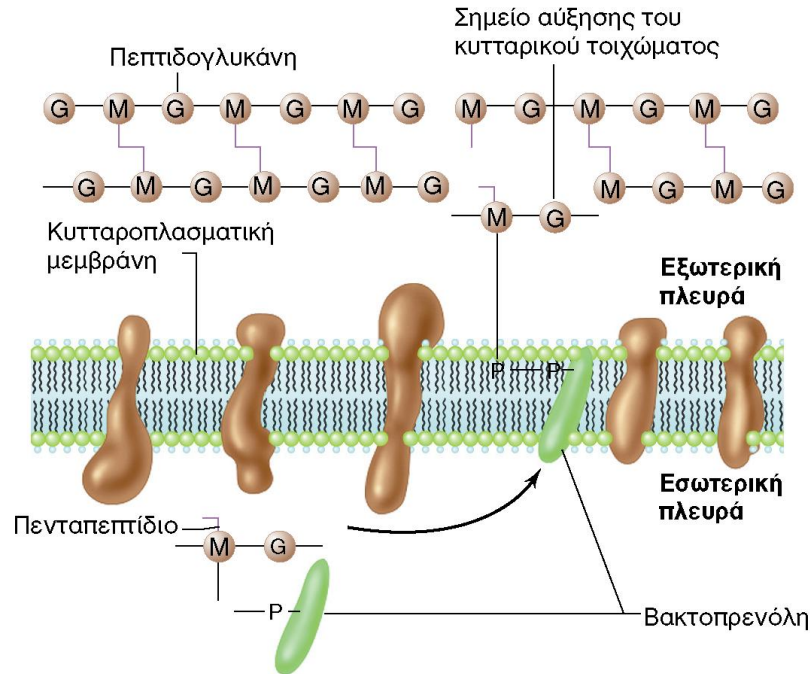
ΜΟΡΙΟ ΦΟΡΕΑΣ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ



Εικόνα 6.4: Η βακτοπρενόλη (φωσφορική ενδεκαπρενόλη), λιπιδικός φορέας λιπιδίων των δομικών μονάδων της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος.

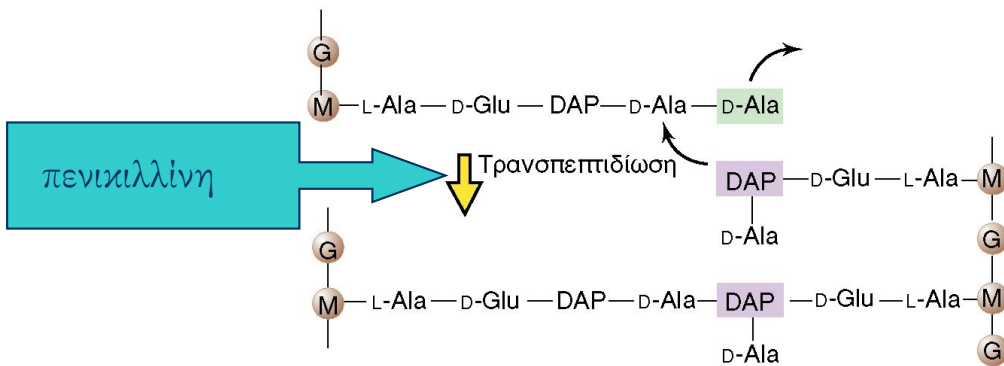


ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ ΚΑΙ ΤΡΑΝΣΠΕΠΤΙΔΙΩΣΗ



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.

(α)



(β)

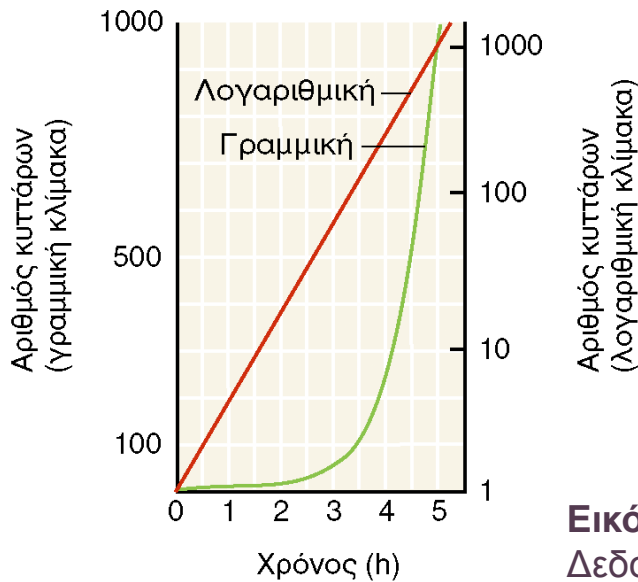


ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

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

(a)

1. Ρυθμός αύξησης
2. Γενεά, Χρόνος γενεάς



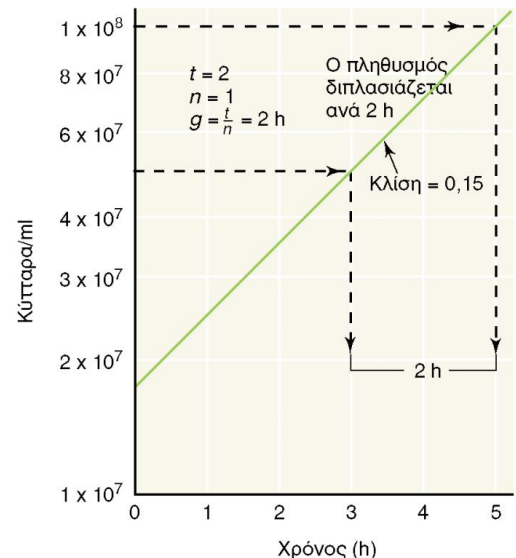
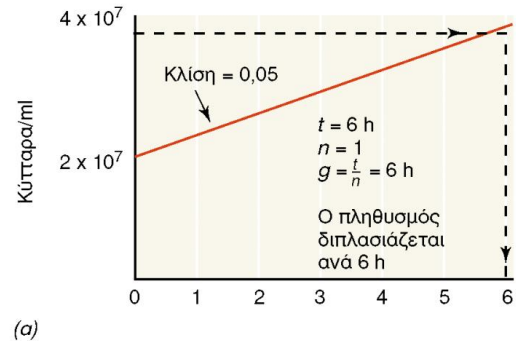
(β)

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).



ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΧΡΟΝΟΥ ΓΕΝΕΑΣ

n = αριθμός γενεών
 g = χρόνος γενεάς
 t = χρόνος εκθετικής φάσης
 N, N_0 = αριθμός κυττάρων
 $N = N_0 2^n$
 $g = t/n$

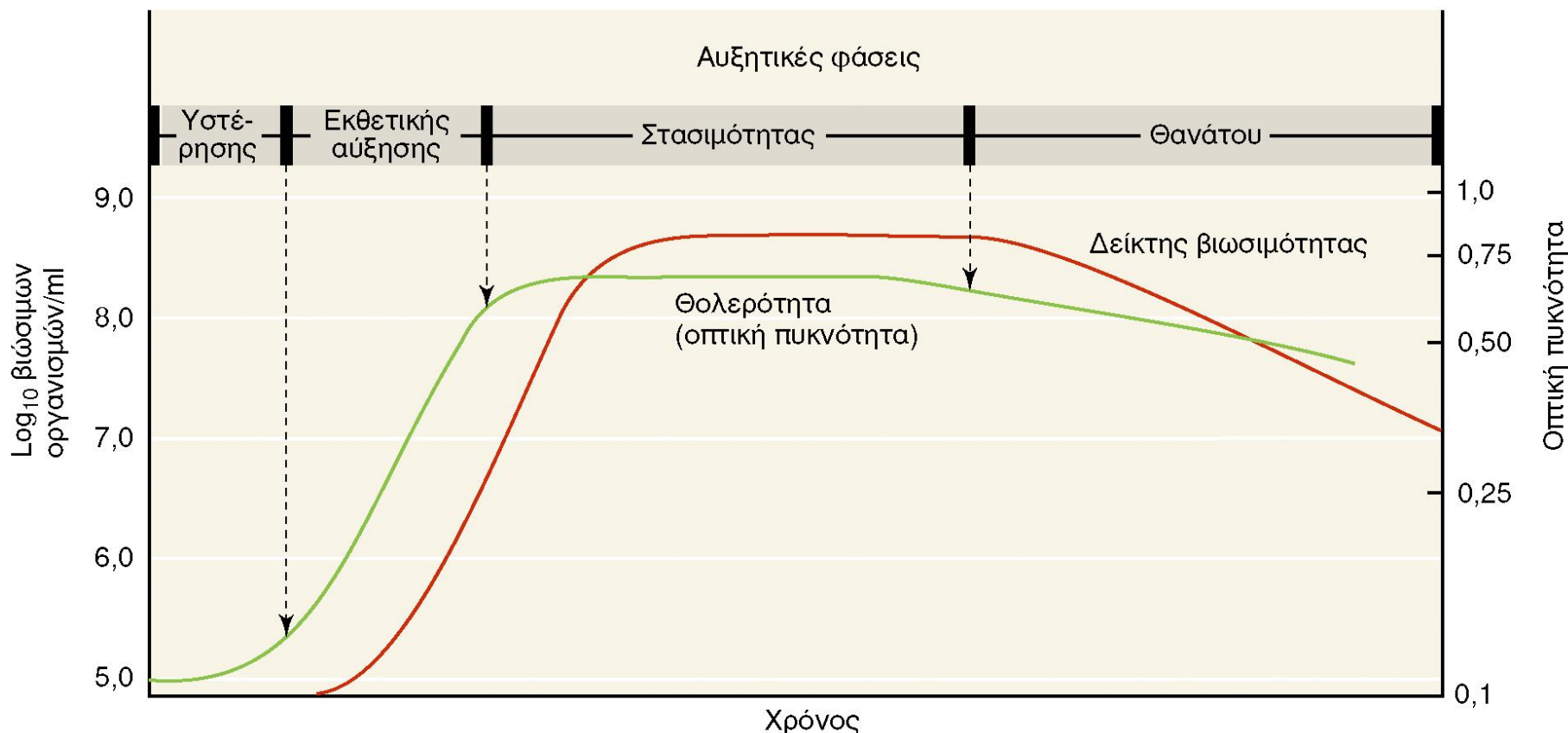


Σταθερά αύξησης $K = \ln 2/g$
 (Αριθμός γενεών ανά μονάδα χρόνου)

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.



Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΗ ΚΑΛΔΙΕΡΓΕΙΑ

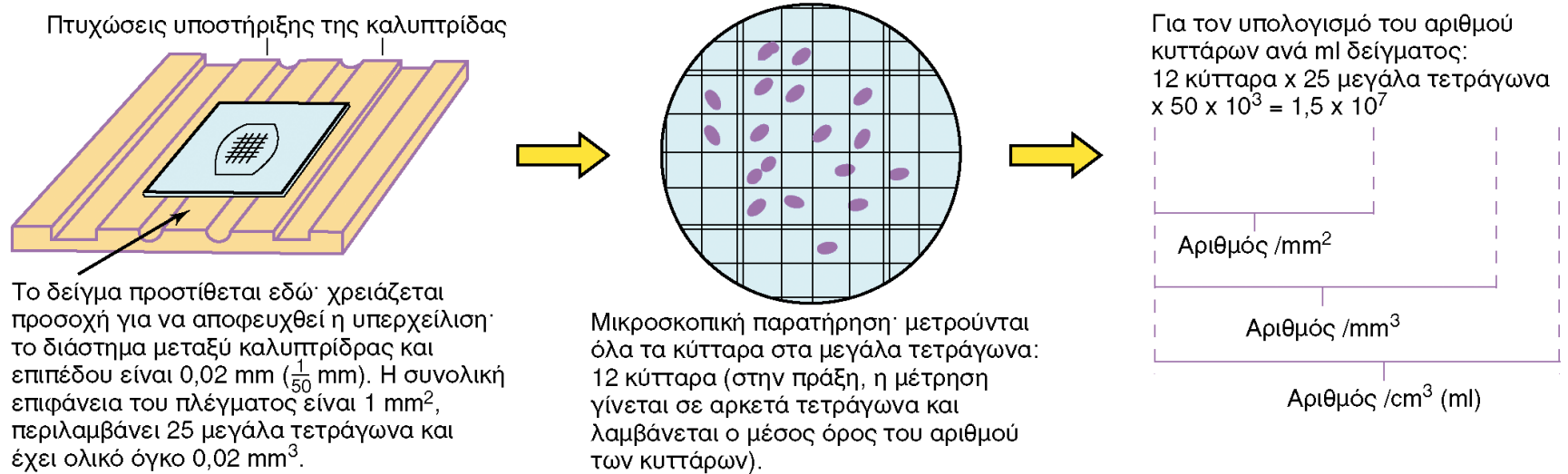


Εικόνα 6.8: Τυπική καμπύλη αύξησης ενός βακτηριακού πληθυσμού. Δείτε τα Τμήματα 6.5 και 6.6 για μια περιγραφή των μεθόδων μέτρησης του βακτηριακού πληθυσμού.



ΑΜΕΣΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



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



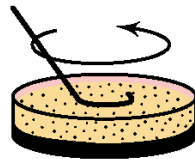
ΑΜΕΣΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ (2)

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

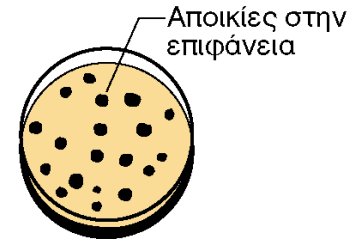
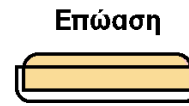
Μέθοδος υγρής επίστρωσης σε τρυβλίο



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

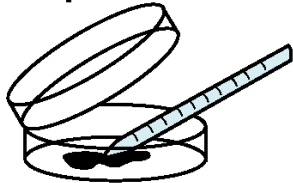


Ομοιόμορφη διασπορά του δείγματος στην επιφάνεια του άγαρ με τη βοήθεια αποστειρωμένου διανομέα

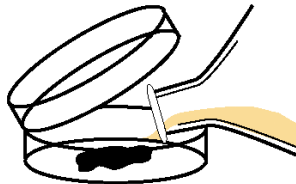


Τυπικό αποτέλεσμα της χρήσης της μεθόδου

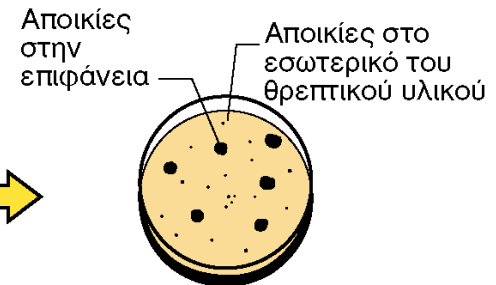
Μέθοδος αραίωσης του εμβολίου



Το δείγμα τοποθετείται σε αποστειρωμένο τρυβλίο



Προσθήκη αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού και καλή ανάμειξη με το εμβόλιο

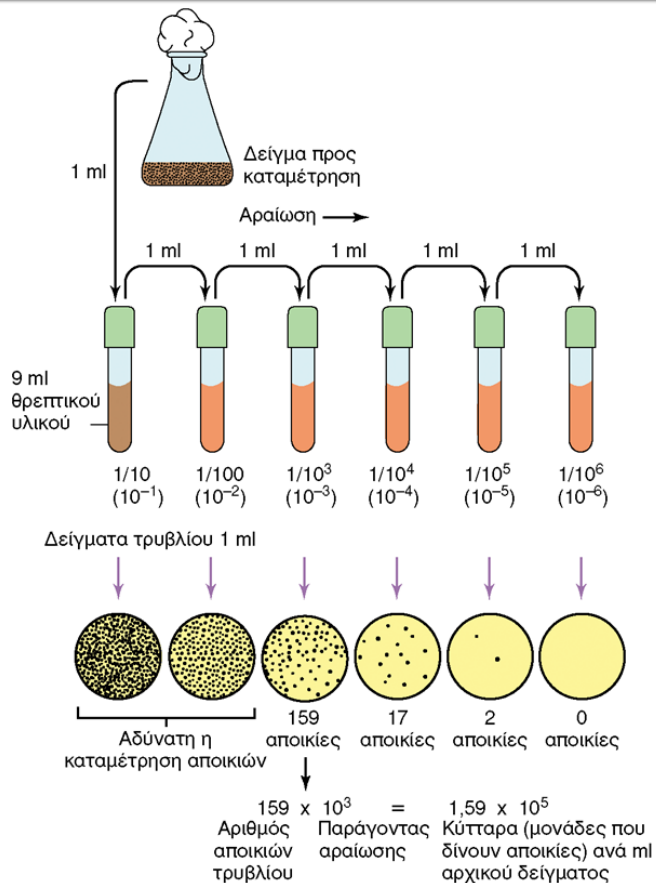


Τυπικό αποτέλεσμα της χρήσης της μεθόδου

Εικόνα 6.10: Δύο μέθοδοι μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας (καταμέτρησης επί τρυβλίου). Σε κάθε περίπτωση, συνήθως απαιτείται αραίωση του δείγματος πριν την επίστρωση.



ΑΜΕΣΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ (3)

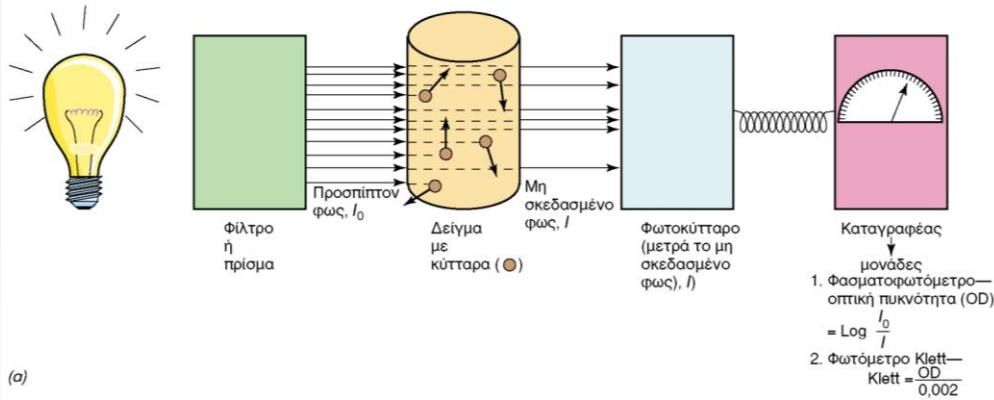


- μετρήσεις βιωσιμότητας κυττάρων με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.
- η μεγάλη ανωμαλία της καταμέτρησης επί τρυβλίου.

Εικόνα 6.11: Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος και χρήση της μεθόδου αραίωσης 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 αραίωσης 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.

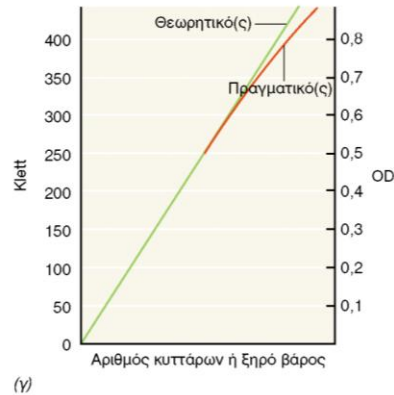
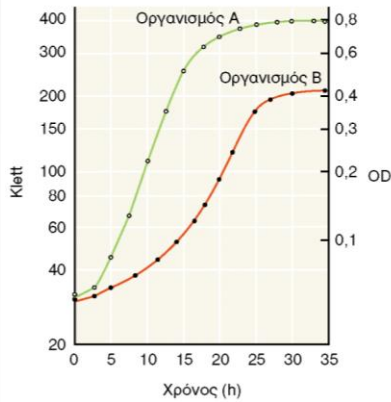


ΕΜΜΕΣΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ



ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑ

(α)

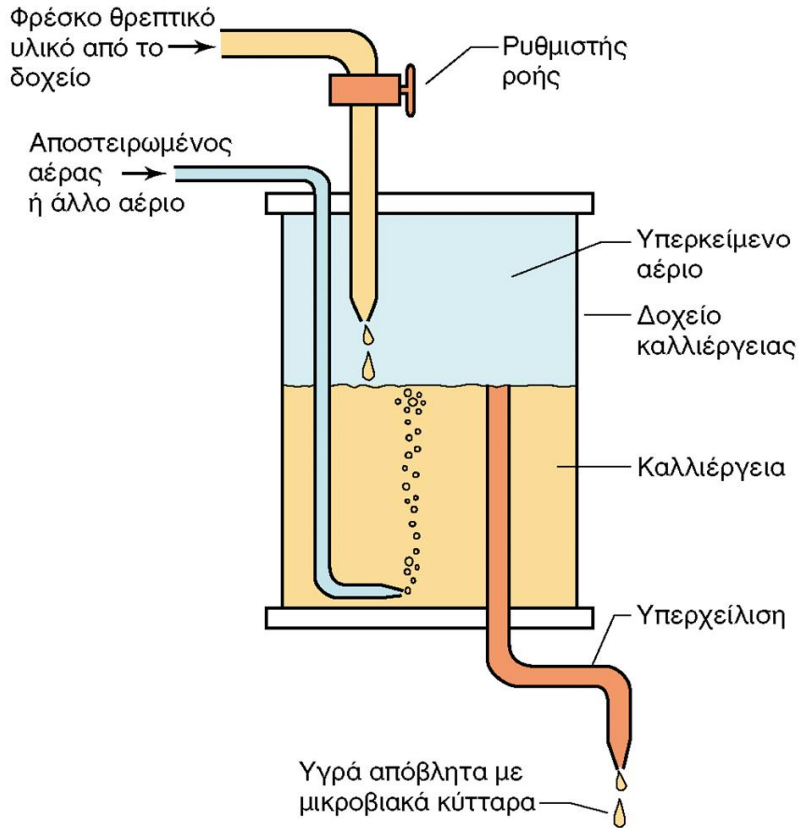


(β)

Εικόνα 6.12: Μετρήσεις θολερότητας στη μικροβιακή αύξηση, (α) Οι μετρήσεις της θολερότητας 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 καλλιεργειών 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 θολερότητας. Προσέξτε ότι η μονοσήμαντη αντιστοιχία ανάμεσα σε αυτές τις δύο σχέσεις δεν υφίσταται σε υψηλές τιμές θολερότητας.



ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: ΧΗΜΕΙΟΣΤΑΤΗΣ

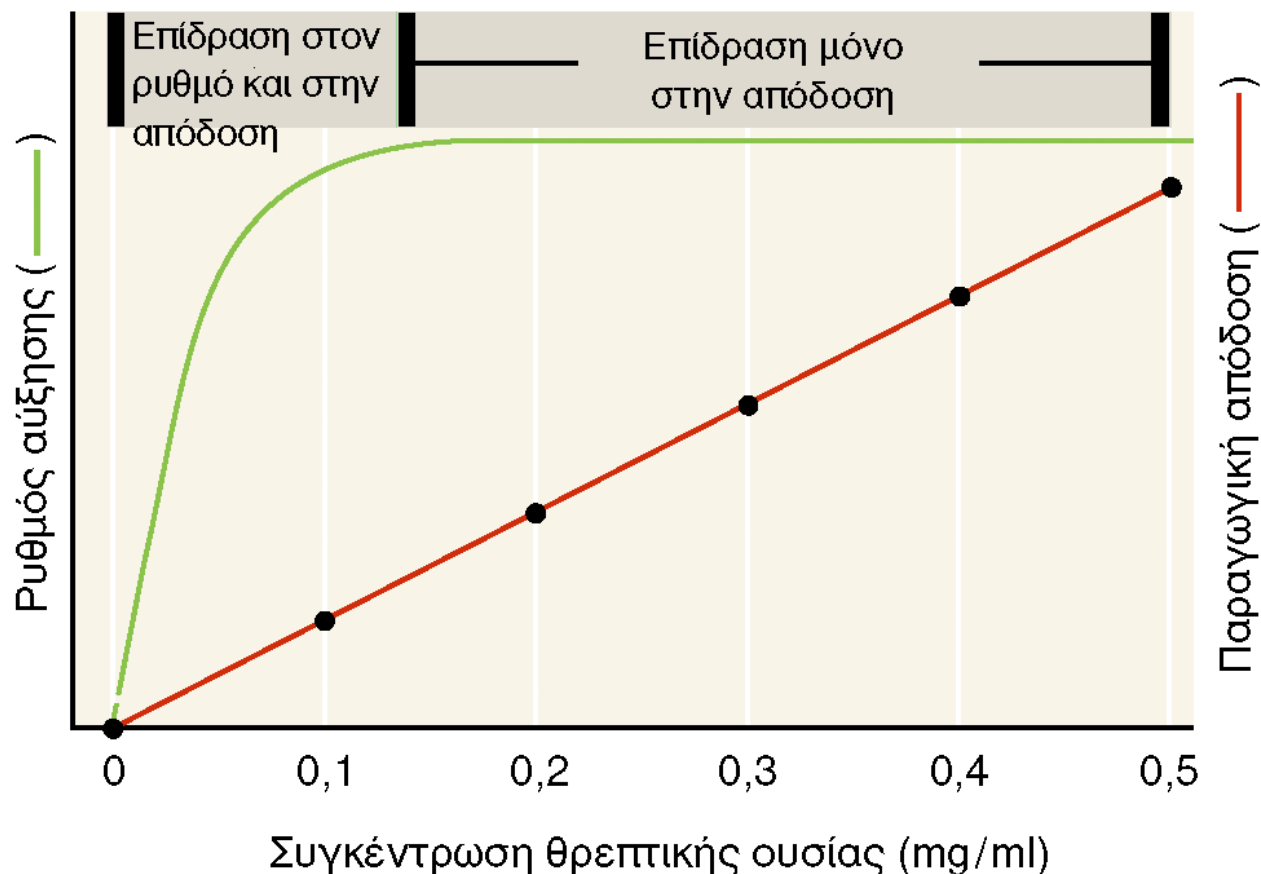


1. Ρυθμός αραίωσης (πόσος όγκος θρεπτικού προστίθεται και αφαιρείται)
2. Συγκέντρωση περιοριστικού παράγοντα

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.



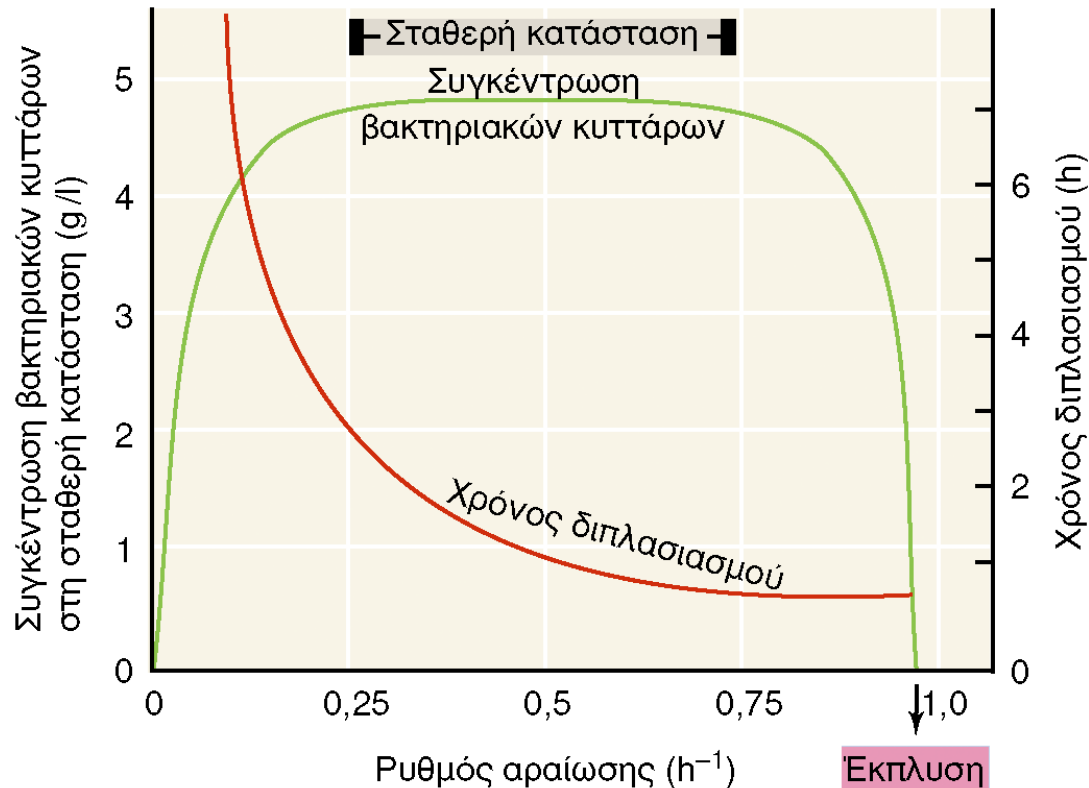
ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: ΧΗΜΕΙΟΣΤΑΤΗΣ(2)



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.



ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: ΧΗΜΕΙΟΣΤΑΤΗΣ(3)



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.



ΛΕΞΕΙΣ - ΚΛΕΙΔΙΑ

- Κυτταρική διαίρεση
- Αύξηση πληθυσμού
- Διαδοχικές αραιώσεις
- Μέτρηση θολερότητας καλλιέργειας
- Χημειοστάτης



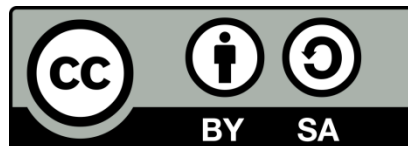
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❑ Βιολογία Των Μικροοργανισμών –
Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Κεφάλαιο 6,
ενότητα α΄.



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδεια χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.





Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





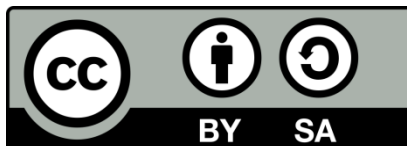
Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωργακόπουλος Δ., Ζερβάκης Γ., Ταμπακάκη Αν. «Γενική Μικροβιολογία». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
<https://mediasrv.aua.gr/eclass/courses/PREDCS100/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων, π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Η άδεια αυτή ανήκει στις άδειες που ακολουθούν τις προδιαγραφές του Ορισμού Ανοικτής Γνώσης [2], είναι ανοικτό πολιτιστικό έργο [3] και για το λόγο αυτό αποτελεί ανοικτό περιεχόμενο [4].

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

[2] <http://opendefinition.org/okd/ellinika/>

[3] <http://freedomdefined.org/Definition/EI>

[4] <http://opendefinition.org/buttons/>



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
 - το Σημείωμα Αδειοδότησης
 - τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
 - το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)
- μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.