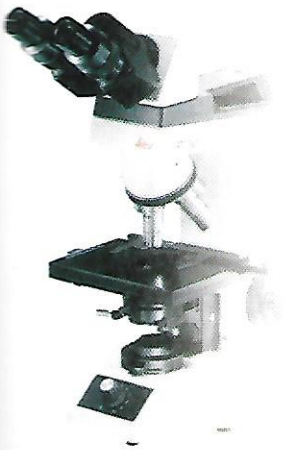


Άσκηση 4η

# Εκτίμηση των παραμέτρων προσδιορισμού του μικροβιακού πληθυσμού

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για τους σκοπούς της Μικροβιολογίας ως αύξηση ορίζεται η μεγέθυνση της μάζας μέρους ή όλου του ζωντανού οργανισμού. Κατά τη διάρκεια της αύξησης ενός μικροοργανισμού ο πληθυσμός των κυττάρων μεταβάλλεται σε σχέση με το χρόνο. Στους ανώτερους οργανισμούς η αύξηση συνοδεύεται και από διαφοροποίηση των κυττάρων για το σχηματισμό ειδικών δομών ή οργάνων.

***Βιομάζα:*** *καλείται το σύνολο της μικροβιακής μάζας*

Η βιομάζα ενός μικροοργανισμού είναι δυνατό να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας τις παρακάτω παραμέτρους, όπως είναι:

**ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ**

1) Οπτική πυκνότητα (ΟΠ) του εναιωρήματος της καλλιέργειας των μικροοργανισμών (Optical Density = OD)
2) Ολικός αριθμός κυττάρων (ΑΚ)
3) Αριθμός βιώσιμων μονάδων (ή αριθμός αποικιών που έχει προέλθει από μία και μόνο αναπαραγωγική μικροβιακή μονάδα [ΑΒΜ]) (colony formimg unit = cfu)
4) Ξηρό βάρος της βιομάζας (ΞΒ)

Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού (μονοκύτταρος, πολυκύτταρος, νηματοειδής κλπ) γίνεται επιλογή της κατάλληλης παραμέτρου.

Έμμεσοι τρόποι προσδιορισμού της μικροβιακής βιομάζας ενός μικροοργανισμού είναι η εκτίμηση της ειδικής ενεργότητας ενός βασικού ενζύμου [π.χ. φωσφατάση (βλέπε όγδοη άσκηση), αφυδρογονάση, ουρεάση κλπ] ή η εκτίμηση της αναπνοής προσδιορίζοντας το παραγόμενο $CO_2$.

Η εκτίμηση της μικροβιακής αύξησης είναι ένα άλλο φαινόμενο και εξετάζεται στην πέμπτη άσκηση.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| Αντικείμενα | Θρεπτικά Υποστρώματα | Μικροοργανισμοί | Όργανα |
|---|---|---|---|
| Κωνικές φιάλες | Θρεπτικός ζωμός σε υγρή μορφή [Nutrient Broth, (NB)] βακτηριολογικό θρεπτικό υπόστρωμα. | *Escherichia coli* | Σπεκτροφωτόμετρο |
| Σιφώνια (1ml, 5ml) | Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα AGS (Arginine Glycerol Salt) εκλεκτικό για στρεπτομύκητες. | *Streptomyces griseus* | Καταμετρητής αποικιών |
| Σιφώνιο Pasteur | Czapek-Dox Άγαρ (CzA) μυκητολογικό θρεπτικό υπόστρωμα | *Aspergillus carbonarius* | Συσκευή διήθησης |
| Κυψελίδες σπεκτροφωτόμετρου | | | |
| Αντικειμενοφόρος Neubauer | | | |
| Καλυπτρίδες | | | |
| Γυάλινος διανομέας εμβολιασμού | | | |

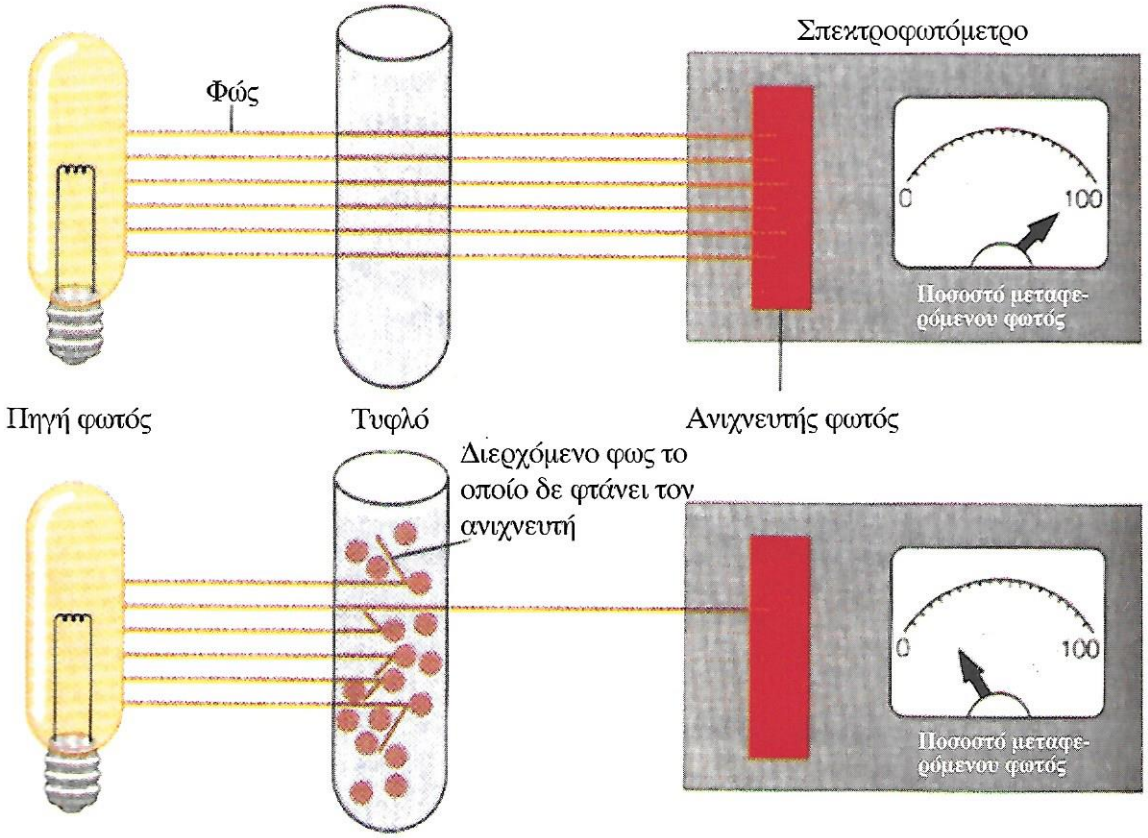
## Διαδικασία Εκτέλεσης της Άσκησης

### *Μέρος Πρώτο*

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας (Οπτική Πυκνότητα) και του ολικού αριθμού κυττάρων (ΑΚ) θα γίνει σε μία καλλιέργεια του βακτηρίου *Escherichia coli*, η οποία θα έχει αυξηθεί για 18 ώρες.

**Ι. Προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) της καλλιέργειας**

Σε ένα σπεκτροφωτόμετρο τύπου Pharmacia LKB, Novaspec II και σε μήκος κύματος 600 nm μετράται η πυκνότητα του εναιωρήματος της καλλιέργειας του μικροοργανισμού όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.




**Εικόνα 1:** Εκτίμηση της μικροβιακής βιομάζας μέσω οπτικής πυκνότητας. Υπολογισμός της μικροβιακής βιομάζας μετρώντας της απορρόφηση του φωτός. Καθώς ο πληθυσμός και η θολερότητα αυξάνουν, τόσο περισσότερο φως διαθλάται με αποτέλεσμα η τιμή της απορρόφησης που δίνεται από το σπεκτροφωτόμετρο να αυξάνει. Συνήθως ο μετρητής του σπεκτροφωτομέτρου έχει δύο κλίμακες. Η κάτω κλίμακα απεικονίζει την απορρόφηση ενώ η πάνω κλίμακα την % διαπερατότητα. Η απορρόφηση αυξάνει καθώς η % διαπερατότητα μειώνεται.

Για τις ανάγκες της άσκησης (λόγοι οικονομίας χρόνου) γίνεται προσπάθεια συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας ενός μικροβιακού δείγματος με τον αριθμό των κυττάρων που περιέχεται σ' αυτό. Έτσι έχει βρεθεί πειραματικά και για τις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας ότι η ΟΠ = 1 για την *E. coli* αντιστοιχεί κατά προσέγγιση σε $0,8x10^9$ κύτταρα ανά ml.

Η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα να είναι απλή και άρα εύκολη, μη δαπανηρή και να μην καταστρέφει το δείγμα. Εφαρμόζεται ευρέως για την εκτίμηση της κινητικής της μικροβιακής αύξησης αλλά απαιτείται συνεχής έλεγχος των δειγμάτων για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν εφαρμόζεται σε όλους τους μικροοργανισμούς (π.χ. δεν εφαρμόζεται στους νηματοειδείς μικροοργανισμούς, όπως είναι τα βακτήρια του γένους *Streptomyces* και στους μύκητες όπως το γένος *Aspergillus*, *Penicillium* κλπ.) και θεωρείται λιγότερο ευαίσθητη από τον αριθμό ολικών κυττάρων.

- Ανακινήστε καλά την καλλιέργεια των 18 ωρών της *E. coli* που σας έχει δοθεί.
- Λαμβάνετε 3 ml καλλιέργειας, με σιφώνιο των 5 ml, το μεταφέρετε σε κυψελίδα του σπεκτροφωτομέτρου.
- Επιλέγετε ως μήκος κύματος τα 600 nm.

- Μηδενίζετε το σπεκτροφωτόμετρο μετρώντας την οπτική πυκνότητα κυψελίδας που περιέχει απεσταγμένο νερό.

- Στη συνέχεια τοποθετείτε στο σπεκτροφωτόμετρο την κυψελίδα με το δείγμα της καλλιέργειάς σας.

- Καταγράφετε την ένδειξη του φωτομέτρου στη σελίδα των σημειώσεων. Αυτή η τιμή αντιστοιχεί στον αριθμό κυττάρων, που θα καταμετρηθεί κάτω από το μικροσκόπιο με τη βοήθεια της αντικειμενοφόρου Neubauer, της καλλιέργειας *E. coli* των 18 ωρών.

## ΙΙ. Προσδιορισμός του ολικού αριθμού κυττάρων (ΑΚ) της καλλιέργειας

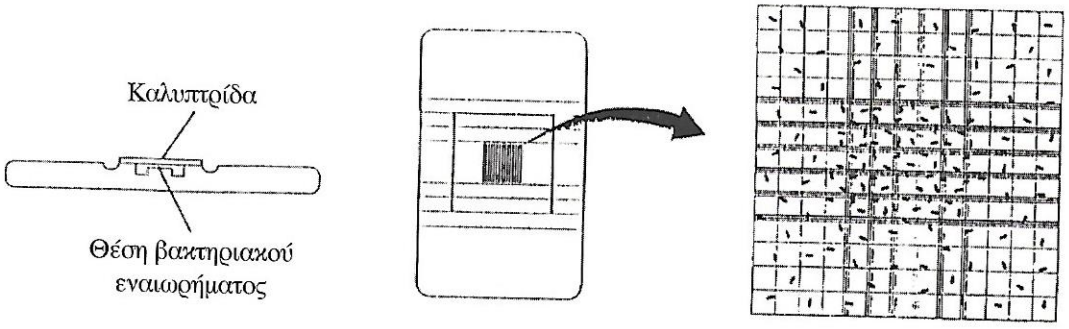
Ο ολικός αριθμός κυττάρων σε ένα μικροβιακό πληθυσμό είναι δυνατό να προσδιοριστεί καταμετρώντας τα κύτταρα κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο. Ο προσδιορισμός αυτός μπορεί να γίνει σε υγρό δείγμα καλλιέργειας. Υπάρχουν ειδικές αντικειμενοφόροι πλάκες τύπου Neubauer (Εικόνα 2) οι οποίες είναι χαραγμένες και σχηματίζουν μικρά τετράγωνα γνωστού όγκου. Είναι δυνατή η εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα όγκου του κάθε τετραγώνου του οπτικού πεδίου που καταμετράται. Γίνεται αναγωγή του αριθμού των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος αρχικής καλλιέργειας. Η μέθοδος δίνει ένα άμεσο προσδιορισμό του αριθμού των μικροβιακών κυττάρων. Εντούτοις, έχει στατιστικά σφάλματα γιατί υπόκειται στην κρίση του κάθε ερευνητή και τα εξής μειονεκτήματα:

α) δε γίνεται διαχωρισμός νεκρών και βιώσιμων κυττάρων

β) τα μικρού μεγέθους κύτταρα δεν είναι ευδιάκριτα κάτω από το μικροσκόπιο και αρκετά κύτταρα είναι δυνατό να αγνοηθούν

γ) απαιτείται μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων για τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων νωπού παρασκευάσματος

δ) η μέθοδος είναι ακατάλληλη για εναιωρήματα μικροοργανισμών χαμηλής συγκέντρωσης π.χ. χαμηλότερα των $10^6$ κυττάρων ανά ml.




(α) (β) (γ)

**Εικόνα 2.** (α) Η αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer όπως φαίνεται από το πλάι. Φαίνεται η καλυπτρίδα και το κενό κάτω από αυτή όπου περιέχεται το βακτηριακό εναιώρημα. (β) Ο θάλαμος όπως φαίνεται από πάνω. Η περιοχή καταμέτρησης διακρίνεται στο κέντρο. (γ) Μία μεγέθυνση της περιοχής καταμέτρησης των κυττάρων. Τα βακτήρια καταμετρώνται σε διαφορετικά μεγάλα τετράγωνα (κάθε μεγάλο τετράγωνο αποτελείται από 16 μικρά) του κέντρου συνήθως υπό μεγέθυνση 40x έως 100x. Ο μέσος όρος του αριθμού των βακτηρίων ανά μικρό τετράγωνο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων στο αρχικό δείγμα. Κάθε μικρό τετράγωνο καλύπτει μία περιοχή εμβαδού 0,0025 $mm^2$. Ο θάλαμος είναι 0,1 mm βαθύς και επομένως:

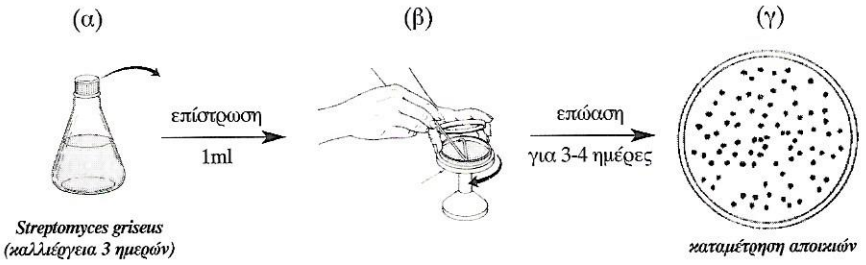
$$\text{βακτήρια / cm}^3 = \frac{\text{μέσος όρος βακτηρίων/μικρό τετράγωνο x 1000 x α}}{0{,}00025}$$

α = παράγοντας της αραίωσης του δείγματος

- Αναμίξετε την καλλιέργειά σας πολύ καλά.
- Λαμβάνετε μία μικρή ποσότητα (1 σταγόνα), με σιφώνιο Pasteur, από την καλλιέργεια και τη μεταφέρετε στο κέντρο της αντικειμενοφόρου Neubauer.
- Καλύπτετε το δείγμα με καλυπτρίδα.
- Παρατηρήστε το παρασκεύασμα στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια του φακού 40x
- Καταμετρήστε τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται εντός 48 τουλάχιστον μικρών τετραγώνων (περίπου 3 οπτικά πεδία).
- Υπολογίστε τα αποτελέσματά σας ως το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων ανά ml αρχικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού.
- Αντιστοιχίστε την τιμή αυτή σε εκείνη της οπτικής πυκνότητας της ίδιας καλλιέργειας.

## *Μέρος Δεύτερο*

Η εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων μονάδων (ΑΒΜ = cfu) θα γίνει σε δείγμα καλλιέργειας 3 ημερών του νηματοειδούς βακτηρίου *Streptomyces griseus*. Η μέθοδος απαιτεί την προετοιμασία τρυβλίων με στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Τα τρυβλία (τουλάχιστον 3 ανά δείγμα) μετά τη στερεοποίηση του υποστρώματος εμβολιάζονται με 1 ml από δείγμα υγρής καλλιέργειας του στρεπτομύκητα που έχει αυξηθεί για 3 ημέρες. Η μέθοδος εμβολιασμού που εφαρμόζεται είναι η διασπορά του εμβολίου με το γυάλινο διανομέα. Η διαδικασία φαίνεται στην Εικόνα 3.




**Εικόνα 3.** Εκτίμηση βιώσιμων μονάδων ανά ml αρχικής καλλιέργειας.

Μετά την επώαση των τρυβλίων για 3-4 ημέρες γίνεται προσεκτική καταμέτρηση των αποικιών στον ειδικό καταμετρητή (θα σας γίνει επίδειξη από τον υπεύθυνο της άσκησης).

Ο αριθμός των βιώσιμων μονάδων (ΑΒΜ) εκφράζεται ανά ml αρχικής καλλιέργειας.

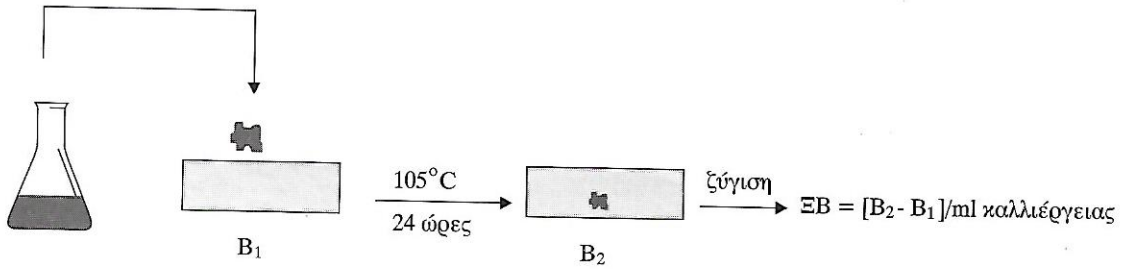
***Σημείωση***: Εάν η καλλιέργεια είναι πολύ πυκνή είναι δυνατόν να απαιτηθεί αραίωση του δείγματος της καλλιέργειας με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων πριν από το στάδιο (β) της Εικόνας 3.

Η μέθοδος έχει αρκετά στατιστικά σφάλματα και γι' αυτό το λόγο απαιτείται προσοχή. Η συνήθης πρακτική για αξιόπιστα αποτελέσματα είναι η καταμέτρηση από 30 έως και 300 αποικίες σε κάθε τρυβλίο. Άρα προέχει η εκτίμηση του σωστού βαθμού αραίωσης του αρχικού δείγματος.

Παρ' όλα τα μειονεκτήματα (στατιστικά σφάλματα, επίπονη μέθοδος, πολυδάπανη, χρονοβόρα) η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη στη Βιομηχανία Τροφίμων, στη Μικροβιακή Ιατρική και στη Μικροβιολογία Περιβάλλοντος.

## *Μέρος Τρίτο*

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης της βιομάζας ενός μικροοργανισμού είναι δυνατό να γίνει με τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους της καλλιέργειας του μικροοργανισμού. Στη συγκεκριμένη περίπτωση θα εκτιμηθεί το ξηρό βάρος καλλιέργειας *Aspergillus nidulans.*

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής: η καθαρή μάζα των μικροοργανισμών συλλέγεται με φυγοκέντρηση ή διήθηση, ξηραίνεται στους 105 °C για 24 ώρες (ενώ για τα βακτήρια αρκούν 12-18 ώρες) και ζυγίζεται. Το βάρος εκφράζεται ως mg ή g ξηρής βιομάζας ανά ml αρχικής καλλιέργειας. Για τους νηματοειδείς μικροοργανισμούς, όπως οι μύκητες, ο προσδιορισμός του ξηρού βάρους είναι η καλύτερη μέθοδος εκτίμησης της μεταβολής της βιομάζας τους. Οι άλλες μέθοδοι, όπως είναι ο αριθμός βιώσιμων μονάδων, δεν είναι ικανοποιητικές.

- Ζυγίζετε ένα μικρό κομμάτι αλουμινόχαρτου διαστάσεων (5 x 5) cm και σημειώστε το βάρος ως $B_1$.
- Διηθείτε την καλλιέργεια του μύκητα στη συσκευή που σας έχει δοθεί.
- Με μία σπάτουλα μεταφέρετε το υγρό μυκήλιο προσεκτικά πάνω στο προζυγισμένο κομμάτι αλουμινόχαρτου.
- Τοποθετήστε το υγρό μυκήλιο σε κλίβανο των 105°C.
- Μετά την ξήρανση ζυγίστε το ξηρό μυκήλιο μαζί με το αλουμινόχαρτο και σημειώστε το βάρος ως $B_2$.
- Η διαφορά των δύο βαρών ($B_2$-$B_1$) είναι το βάρος του ξηρού μυκηλίου του μικροοργανισμού σας.
- Η τιμή του ΞΒ που βρήκατε πρέπει να εκφραστεί σε γραμμάρια (g) ανά 1 ml αρχικής καλλιέργειας που διηθήσατε.