

Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

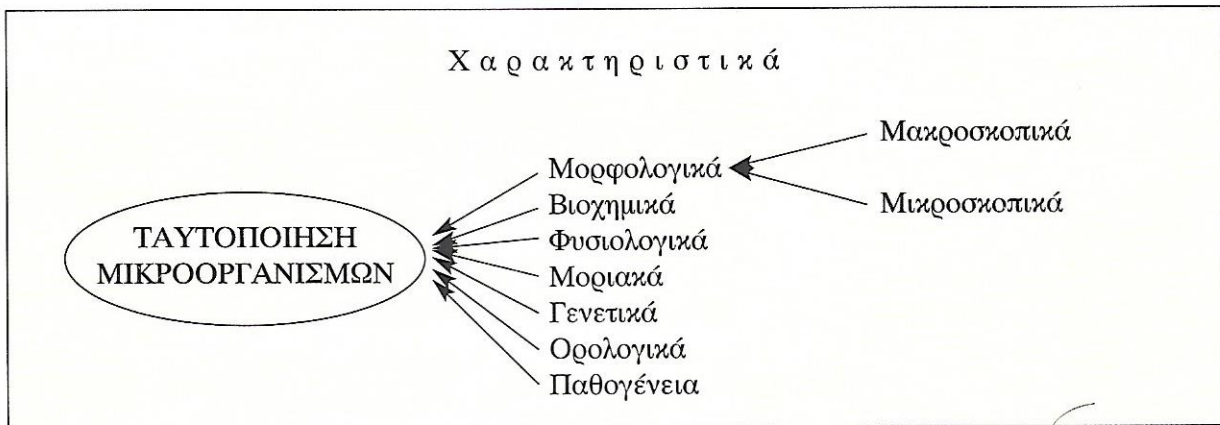
Η συστηματική κατάταξη των μικροοργανισμών σε κατηγορίες που αντανακλούν το βαθμό συγγένειας και διάκρισης μεταξύ τους μελετάται από την επιστήμη της Ταξινομικής.

Οι Μικροβιολόγοι σε αντίθεση με τους Βοτανικούς και Ζωολόγους αντιμετωπίζουν ιδιαίτερα προβλήματα στον προσδιορισμό (ταυτοποίηση) των μικροοργανισμών σε γένη και είδη. Οι μικροοργανισμοί δεν έχουν εμφανή πρότυπα της εξελικτικής σχέσης τους, ούτε την ποικιλομορφία των ανατομικών χαρακτηριστικών των ανωτέρων οργανισμών. Η ταυτοποίηση λοιπόν των μικροοργανισμών βασίζεται όχι μόνο στα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των αποικιών τους (π.χ. χαρακτηριστικά μιας καλλιέργειάς τους) αλλά κυρίως στα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά (π.χ. μέγεθος, σχήμα), στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, στις βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές, στην παθογένειά τους και, τα τελευταία χρόνια, στα μοριακά και γενετικά τους πρότυπα.

Η διαδικασία της ταυτοποίησης ενός μικροοργανισμού βασίζεται στην υπόθεση ότι ο προς μελέτη μικροοργανισμός είναι σε καθαρή απομονωμένη καλλιέργεια. Είναι λοιπόν απαραίτητη προϋπόθεση για έναν επιστήμονα να δώσει έμφαση στην καθαρότητα της καλλιέργειας που πρόκειται να προσδιορισθεί ταξινομικά.

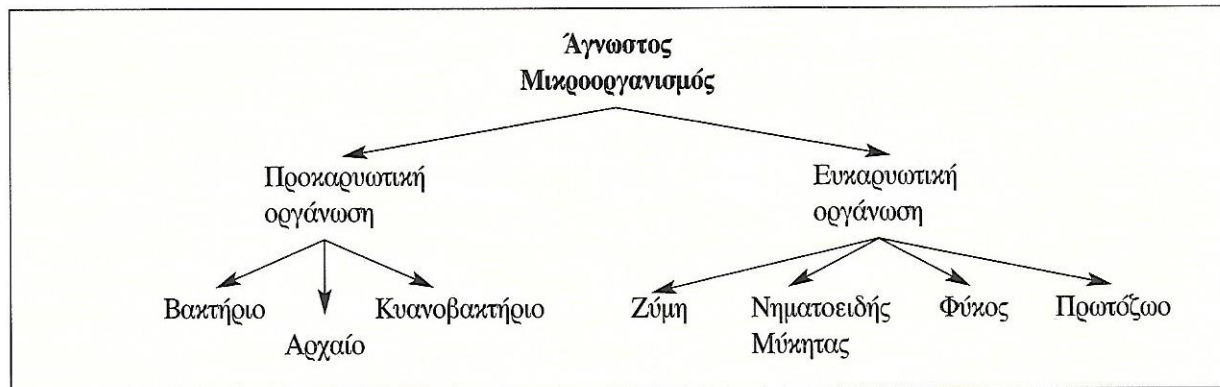
Η διαδικασία που ακολουθείται με στόχο τον προσδιορισμό ενός μικροοργανισμού είναι η καταγραφή μορφολογικών, βιοχημικών, φυσιολογικών, μοριακών και γενετικών χαρακτήρων. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της καταγραφής συγκρίνονται με ήδη γνωστά πρότυπα εγχειριδίων ή με στοιχεία βάσεων δεδομένων σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές και προωθείται ο προσδιορισμός του μικροοργανισμού σε ομάδα, οικογένεια, γένος και πιθανά είδος.

Για την απλούστευση της διαδικασίας ταυτοποίησης σήμερα υπάρχουν ειδικά διαγνωστικά συστήματα (kits), εύκολα στη χρήση, που συνήθως αφορούν βιοχημικές και φυσιολογικές δοκιμές. Με τα συστήματα αυτά επιτυγχάνεται γρήγορη και ακριβής ταυτοποίηση η οποία όμως συνδυάζεται πάντα με πολλές άλλες μικροβιολογικές γνώσεις που αφορούν τον/τους προς μελέτη μικροοργανισμό/ούς.

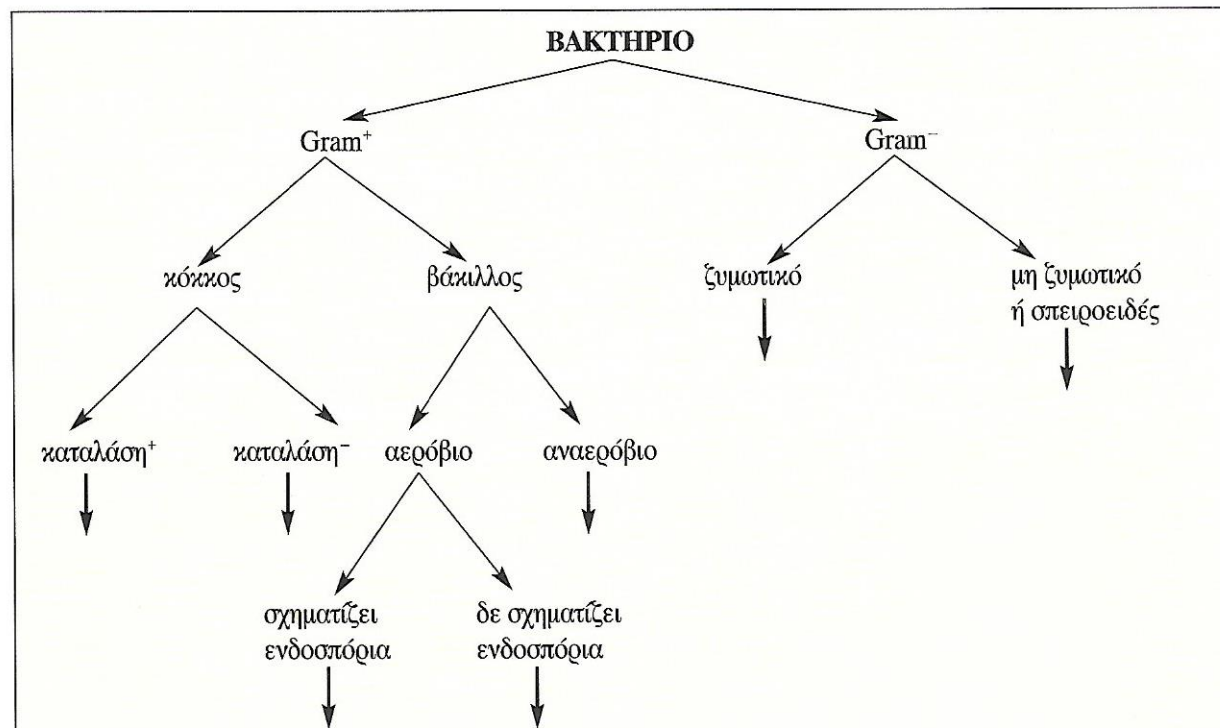


Ένα βασικό σχήμα της διαδικασίας προσδιορισμού ενός μικροοργανισμού φαίνεται παρακάτω.

ΣΤΑΔΙΟ Ι:



ΣΤΑΔΙΟ ΙΙ: π.χ. έστω ότι είναι ΒΑΚΤΗΡΙΟ



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντικείμενα	Θρεπτικά Υποστρώματα	Άλλα Αντιδραστήρια	Μέθοδοι Ταυτοποίησης
Δοκιμαστικοί σωλήνες	Nutrient Broth (NB) (τυπικό ή γενικού τύπου θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων)	Κρυσταλλικό ιώδες	Χρώση κατά Gram
Σιφόνια (1ml)		Διάλυμα ιωδίου	Δοκιμή οξειδάσης
Αντικειμενοφόροι		Διάλυμα αιθανόλης 95°	Δοκιμή καταλάσης
Καλυπτρίδες		Διάλυμα σαφρανίνης	Θερμικό σοκ - έλεγχος ύπαρξης σπορίων
Τρυβλία Petri		Αντιδραστήριο οξειδάσης	
		Αντιδραστήριο καταλάσης	

Διαδικασία Εκτέλεσης της Άσκησης

Σκοπός της 11^{ης} και 12^{ης} άσκησης είναι η εξοικείωση του φοιτητή με τις τεχνικές ταυτοποίησης των τριών βασικών ομάδων των μικροοργανισμών: βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων.

Επειδή δεν είναι δυνατόν να εφαρμόσουμε ολοκληρωμένη τη διαδικασία της ταυτοποίησης ενός μικροοργανισμού στο τρίωρο της εργαστηριακής πρακτικής άσκησης, θα γίνουν δειγματοληπτικά εκτός από τα μορφολογικά (μακροσκοπικά και μικροσκοπικά) χαρακτηριστικά, κάποιες βασικές επιλεγμένες βιοδοκιμές.

Μέρος Πρώτο: Ταυτοποίηση Βακτηρίων

Σας δίδονται 4 καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων Α, Β, Γ και Δ. Κατ' αρχήν καταγράψτε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

I. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ

α) Χαρακτηριστικά καλλιέργειας σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα

- **Μορφολογία αποικίας:** Το χρώμα, το μέγεθος, το σχήμα της αποικίας είναι πολύ σημαντικά, αλλά όχι και καθοριστικά για την ταυτοποίηση του βακτηρίου, εφόσον αρκετά είδη διαφορετικά μεταξύ τους μπορούν να δώσουν πολύ όμοιες μορφές αποικίας.

1. Μορφή:

στικτή	κυκλική	νηματοειδής	ριζοειδής	ακανόνιστη
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. Ανύψωση:

πολύ λεπτή διάχυτη	επίπεδη	υπερυψωμένη	κυρτή	ημισφαιρική	κέντρο υπερυψωμένο
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. Περιθώριο:

σγουρό	νηματώδες	κροσσωτό	κυματοειδές	κυκλικό

β) Κυτταρικά χαρακτηριστικά

• **Μέγεθος**

Υπολογίζεται σε nm: μήκος, πλάτος ή διάμετρος κυττάρου κάτω από το μικροσκόπιο.

• **Σχήμα κυττάρου**

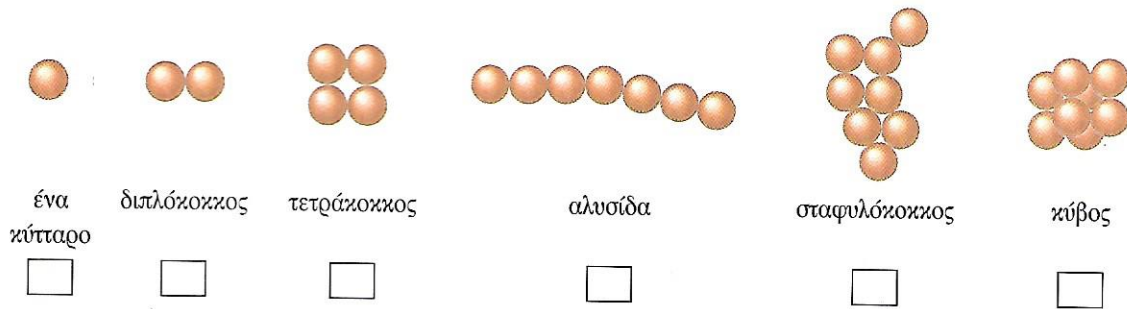
βάκιλλος	κόκκος	σπειρίλιο
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

• **Διάταξη των κυττάρων στο χώρο**

Διάταξη βακίλλων:

ένα κύτταρο	ζεύγος βακίλλων	αλυσίδα
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Διάταξη κόκκων:

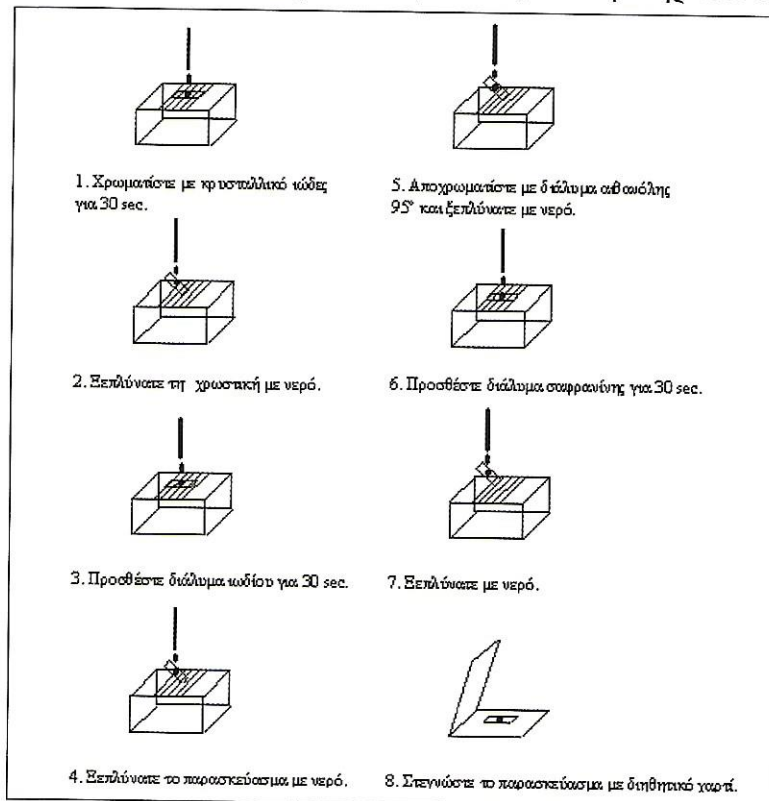


II. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

α) Χρώση και Gram

Στις ανωτέρω βακτηριακές καλλιέργειες πρέπει κατ' αρχήν να βρείτε ποιός μικροοργανισμός είναι κατά Gram θετικός και ποιός είναι κατά Gram αρνητικός. Η διαδικασία περιγράφεται στην Εικόνα 2. Ετοιμάστε ένα παρασκεύασμα από κάθε μικροοργανισμό και στερεώστε το πάνω από τη φλόγα του λύχνου Bunsen. Στη συνέχεια ακολουθήστε τα βήματα όπως στην Εικόνα 2. Το παρασκεύασμα πρέπει να έχει τη σωστή συγκέντρωση κυττάρων ώστε τα κύτταρα να είναι ευδιάκριτα.

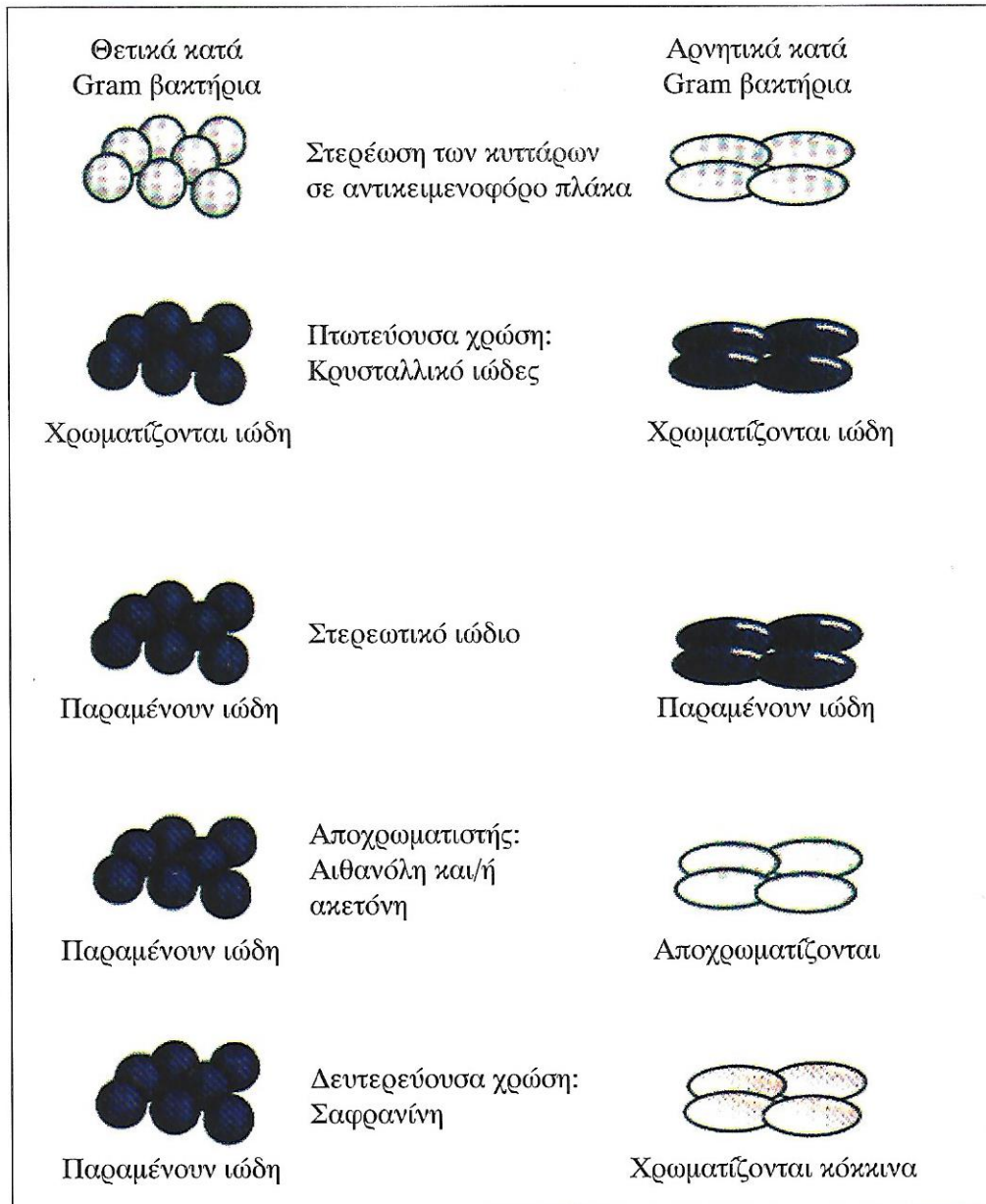
Παρατηρήστε στο μικροσκόπιο τα παρασκευάσματά σας και συμπληρώστε τον Πίνακα 1.



Εικόνα 2. Η διαδικασία της χρώσης κατά Gram.

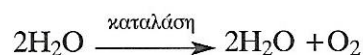
β) Ένζυμα της αναπνευστικής λειτουργίας

Η αναπνοή είναι μια από τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και την παρουσία των απαραίτητων ενζύμων για την αναγωγή του οξυγόνου. Τέτοια ένζυμα είναι η καταλάση και η οξειδάση.



Εικόνα 3. Ο χρωματισμός των βακτηριακών κυττάρων σε κάθε στάδιο της χρώσης κατά Gram. α) Θετικά κατά Gram βακτήρια, β) Αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

1) Η **καταλάση** είναι το ένζυμο που παράγεται από πολλά βακτήρια και καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με σύγχρονη απελευθέρωση οξυγόνου:



Η παρουσία της δράσης του ενζύμου καταλάση εκτιμάται απλά: Πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μεταφέρεται με τον κρίκο εμβολιασμού μια αποικία του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια πάνω στην ποσότητα των κυττάρων προσθέτονται μερικές σταγόνες H_2O_2 3% διαλύματος. Εάν παρατηρηθεί δημιουργία φυσαλίδων, σημειώστε ότι ο μικροοργανισμός είναι θετικός στη δοκιμή ύπαρξης του ενζύμου καταλάση. Το αντίθετο σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός δεν έχει ένζυμο, άρα είναι αρνητικός στην αντίδραση της καταλάσης. Καταγράψτε τα αποτελέσματά σας για τις βακτηριακές καλλιέργειες Α, Β, Γ, και Δ στον Πίνακα 1.

2) Η **οξειδάση** καθορίζει εάν ένας μικροοργανισμός είναι σε θέση να οξειδώσει κάποιες αρωματικές αμίνες (π.χ. ρ-αμινοδιμεθυλαμίνη) οπότε σχηματίζονται χρωματιστά προϊόντα. Αυτή η οξειδάση σχετίζεται, σε ορισμένα είδη βακτηρίων με τη δράση του ενζύμου κυτοχρωμική οξειδάση. Η βιοδοκιμή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ομάδα των εντεροβακτηρίων τα οποία έχουν αρνητική αντίδραση. Η διαδικασία της βιοδοκιμής έχει ως εξής: Σε 4 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετείστε 1ml διαλύματος Ringer. Σε κάθε σωλήνα παρασκευάστε εναιώρημα από τις καλλιέργειες Α, Β, Γ και Δ κατά σειρά και αναμίξτε στο vortex για 1-2 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προσθέστε 1-2 σταγόνες αντιδραστήριου οξειδάσης (έρχεται έτοιμο από το εμπόριο) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, αναμίξτε καλά και μετά από δύο λεπτά της ώρας (και όχι περισσότερο) παρατηρείστε μακροσκοπικά τους σωλήνες. Η δημιουργία χρώματος (μπλε-μωβ) σημαίνει θετική αντίδραση οξειδάσης. Καταγράψτε τα αποτελέσματα σας για κάθε βακτηριακή καλλιέργεια στον Πίνακα 1.

3) **Σχηματισμός ενδοσπορίων - θερμικό σοκ.** Είναι γνωστό ότι μερικές ομάδες βακτηρίων (όπως π.χ. τα *Clostridium* και τα *Bacillus*) δημιουργούν ανθεκτικές μορφές κυττάρων οι οποίες είναι ικανές να επιβιώνουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος. Κατά τη διαδικασία ταυτοποίησης ενός βακτηρίου συνίσταται η δοκιμή του "θερμικού σοκ" για την εκτίμηση του σχηματισμού ενδοσπορίων από το βακτήριο. Κατ' αυτόν τον τρόπο ο προσδιορισμός του βακτηρίου συντομεύεται αρκετά. Η διαδικασία έχει ως εξής: Τοποθετείστε 5 ml υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου Α, Β, Γ και Δ σε υδατόλουτρο 80 °C για 10 λεπτά της ώρας. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες όλα τα βλαστητικά κύτταρα καταστρέφονται ενώ τα ενδοσπόρια επιβιώνουν. Στη συνέχεια χωρίστε με το μαρκαδόρο σας σε 4 τεταρτημόρια το τρυβλίο που περιέχει έτοιμο θρεπτικό στερεό άγαρ. Κατόπιν εμβολιάστε το κάθε τεταρτημόριο με μια σταγόνα από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα (Α, Β, Γ και Δ) που περιέχει τα άγνωστα βακτήρια (όπως φαίνεται στην Εικόνα 3). Επλώστε το τρυβλίο στους 30°C για 24 ώρες. Παρατηρείστε σε ποιο τεταρτημόριο υπάρχει αύξηση αποικιών. Είναι προφανές ότι οι αποικίες προήλθαν από τα επιβιώσαντα ενδοσπόρια των μικροοργανισμών. Καταγράψτε τα αποτελέσματά στον Πίνακα 1. Εάν ο μικροοργανισμός σχηματίζει ενδοσπόρια τοποθετείστε το θετικό πρόσημο (+) εάν όχι το αρνητικό πρόσημο (-).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα βιοδοκιμών βακτηρίων

Μικροοργανισμός	Α	Β	Γ	Δ
G ⁻				
G ⁺				
καταλάση				
οξειδάση				
Σχηματισμός ενδοσπορίων				

Μέρος Δεύτερο: Ταυτοποίηση Ζυμομυκήτων

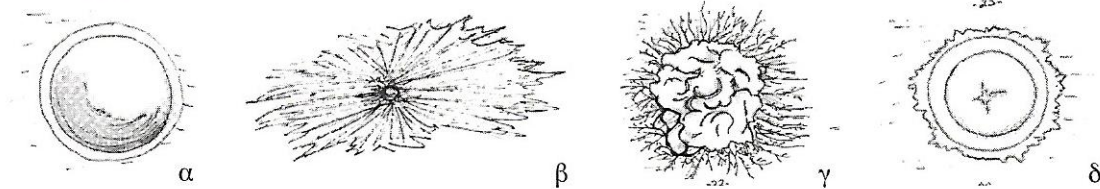
Σας δίδονται 4 καθαρές καλλιέργειες ζυμών Α, Β, Γ και Δ. Καταγράψτε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

I. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ

α) Χαρακτηριστικά καλλιέργειας σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα

- **Μορφολογία αποικίας:** Το χρώμα, το μέγεθος, το σχήμα της αποικίας είναι πολύ σημαντικά, αλλά όχι και καθοριστικά για την ταυτοποίηση μιας ζύμης, εφόσον αρκετά είδη διαφορετικά μεταξύ τους μπορούν να δώσουν πολύ όμοιες αποικίες.

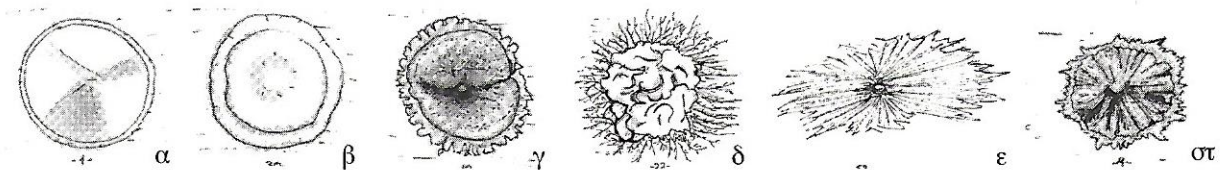
1. Μορφή:



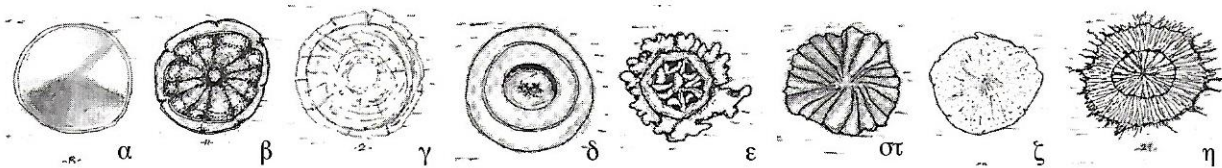
2. Ανύψωση:



3. Περιθώριο:



4. Επιφάνεια:



5. Υφή:

βουτυρώδης

γλοιώδης

σκληρή

μεμβρανώδης

εύθρουπτη

6. Οπτικά χαρακτηριστικά:

χρώμα:

- άσπρο
- κίτρινο
- υποκίτρινο
- ρόζ
- κόκκινο
- πράσινο
- μαύρο

αδιαφανής









ιριδίζουσα

θαμπή

λαμπερή

β) Κυτταρικά χαρακτηριστικά

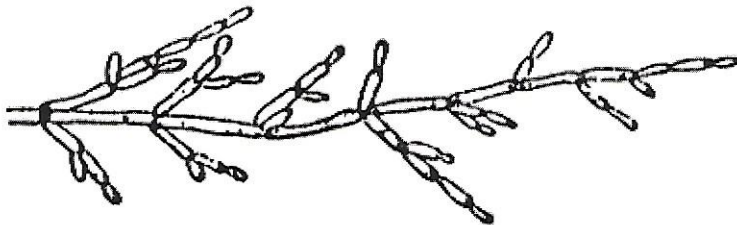
• Μορφολογία κυττάρων

- | | | | |
|---|--|---|--|
| 
σφαιρικό <input type="checkbox"/> | 
ελλειψοειδές <input type="checkbox"/> | 
αυγοειδές <input type="checkbox"/> | 
κυλινδρικό <input type="checkbox"/> |
| 
επιμήκες <input type="checkbox"/> | 
νηματοειδές <input type="checkbox"/> | 
λεμονοειδές <input type="checkbox"/> | 
τριγωνικό <input type="checkbox"/> |

• Βλαστική αναπαραγωγή

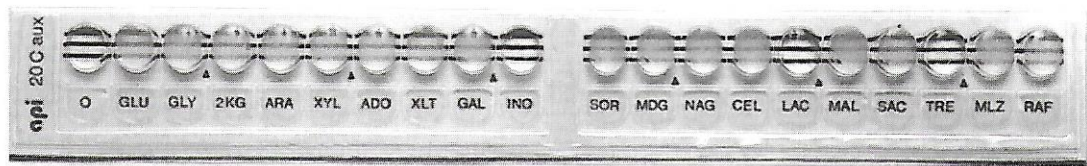
- | | | | |
|--|--|--|---|
| 
μονοπολική <input type="checkbox"/> | 
διπολική <input type="checkbox"/> | 
πολύπλευρα πολική <input type="checkbox"/> | 
σχάση <input type="checkbox"/> |
|--|--|--|---|

• Σχηματισμός μυκηλίου/ψευδομυκηλίου
Σχηματισμός ψευδομυκηλίου (PH/TH)



II) ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Θα σας γίνει επίδειξη του διαγνωστικού συστήματος API ID 32C (Εικόνα 4) το οποίο είναι ειδικό για τον προσδιορισμό των ζυμών. Η ταυτοποίηση των ζυμών στη συγκεκριμένη άσκηση θα βασιστεί στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία έχετε καταγράψει.



Εικόνα 4. Διαγνωστικό σύστημα API ID 32C, ειδικό για τον προσδιορισμό των ζυμών.