

ΙΣΤΟΡΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

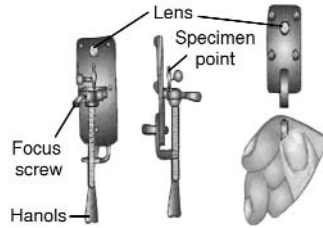
Κατασκευή του μικροβιακού κυττάρου

Μικροβιολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με τη μελέτη των οργανισμών οι οποίοι δεν είναι ορατοί με γυμνό οφθαλμό και οι οποίοι ονομάζονται μικροοργανισμοί.

Η ιστορία της Μικροβιολογίας αρχίζει από τα μέσα του 17ου αιώνα, όταν ο Ολλανδός Antony van Leeuwenhoek (1632-1732) με πρωτόγονα μικροσκόπια, τα οποία μόνος του κατασκεύαζε, παρατήρησε ζώντα πρωτόζωα (1674) και μικρόβια (1675) τα οποία περιέγραψε και σχεδίασε. Με τα απλά αυτά μικροσκόπια επιτυγχάνονταν μεγεθύνσεις 50 έως 300 διαμέτρων, ανάλογα με την εστιακή απόσταση του φακού.

Τις παρατηρήσεις του ο Leeuwenhoek γνωστοποιούσε με επιστολές και σχέδια των παρατηρούμενων οργανισμών, στην *Royal Society* του Λονδίνου. Οι επιστολές δημοσιεύονταν στο περιοδικό της εταιρείας και με αυτόν τον τρόπο γίνονταν γνωστές στον κόσμο. Ο Leeuwenhoek δικαίως θεωρείται ο πρώτος μικροβιολόγος και πρωτοζωολόγος, ο ιδρυτής νέας επιστήμης, της Μικροβιολογίας (Εικ. Α-1).

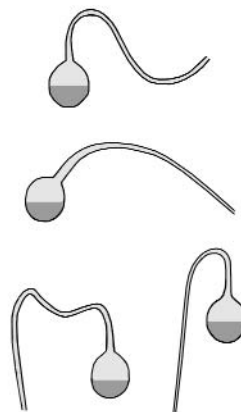
Η πραγματική όμως σημασία των μικροβίων για την οικονομία της φύσης και την παθολογία του ανθρώπου άρχισε να κατανοείται αφότου ο Γάλλος χημικός Louis Pasteur (1822-1895) ερεύνησε και απέδειξε ότι οι διάφορες ζυμώσεις, όπως η ζύμωση του σακχάρου σε οινόπνευμα κ.ά. συνδέονται με τη δράση ζώντων μικροοργανισμών. Μέχρι τότε πιστευόταν ότι οι ζυμώσεις ήταν απλές χημικές αντιδράσεις. Ο Pasteur επίσης απέδειξε ότι διάφοροι «νόσοι» του οίνου και του ζύθου οφείλονται σε μικροοργανισμούς, οι οποίοι διαφέρουν από αυτούς οι οποίοι υπό κανονικές συνθήκες προκαλούν τη μετατροπή του σακχάρου σε αλκοόλη. Συγχρόνως ο Pasteur κατέρριψε



Εικόνα A-1. Antony Van Leeuwenhoek (1683-1732). Το μικροσκόπιό του.

την αρχαιότατη θεωρία της αυτομάτης γένεσης (1860-61) με θαυμάσια και απλά πειράματα. Απέδειξε ότι οι μικροοργανισμοί και γενικά οι ζώντες οργανισμοί, ουδέποτε δημιουργούνται αυτομάτως, αλλά πάντοτε προέρχονται από άλλους όμοιους ζώντες οργανισμούς.

Από τη μελέτη και καταπολέμηση των νόσων του οίνου ο Pasteur έστρεψε την προσοχή του στις νόσους των ζώων και του ανθρώπου. Με τις παρατηρήσεις του απέδειξε ότι ειδικοί μικροοργανισμοί προκαλούν ειδικές νόσους (Εικ. A-2). Πριν από την εμφάνιση του Pasteur, ο Γάλλος ιατρός



Εικόνα A-2. Louis Pasteur (1822-1895). Αλκοολική ζύμωση, Κατάρριψη θεωρίας αυτόματης γένεσης.

Davaine το 1850, παρατήρησε στο αίμα προβάτων πασχόντων από άνθρακα μεγάλα βακτηρίδια, τον γνωστό σήμερα Βάκιλλο του άνθρακα. Αργότερα το 1876 ο Γερμανός ιατρός Robert Koch (1843-1910) απέδειξε ότι ο Βάκιλλος του άνθρακα ήταν το αίτιο της νόσου άνθρακας. Στη Γαλλία οι Pasteur και Joubert (1877) απέδειξαν επίσης την αιτιολογική σχέση του B. του άνθρακα προς την ομώνυμη νόσο.

Η παρατήρηση αυτή επί της μικροβιακής αιτιολογίας των νόσων είναι η αρχή της **ιατρικής μικροβιολογίας**. Το 1882 ο Koch μελέτησε τη φυματίωση του ανθρώπου και σε μικρό διάστημα περιέγραψε το Βακτηρίδιο της φυματίωσης, το οποίο έκτοτε αναφέρεται και ως βακτηρίδιο του Koch, το καλλιέργησε και με εμβολιασμό μετέδωσε τη φυματίωση σε πειραματόζωα. Με τη βοήθεια των ερευνών αυτών ο Koch περιέγραψε τα κριτήρια τα οποία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την απόδειξη της σχέσης ενός μικροβίου προς ορισμένη νόσο. Τα κριτήρια αυτά είχαν τεθεί υπό του Henle ήδη από το 1840, αλλά είναι γνωστά ως «**αξιώματα του Koch**» και είναι τα εξής:

1. *Ο μικροοργανισμός πρέπει να ανευρίσκεται σ' όλες τις περιπτώσεις της νόσου και στις απ' αυτήν προκαλούμενες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις.*
2. *Ο μικροοργανισμός πρέπει να απομονώνεται και να καλλιεργείται εκτός του πάσχοντος σώματος σε καθαρή καλλιέργεια και να διατηρείται σε καλλιέργεια επί πολλές γενιές.*
3. *Ο απομονωθείς μικροοργανισμός πρέπει να αναπαράγει τη νόσο εμβολιαζόμενος σε ευαίσθητα πειραματόζωα.*
4. *Ο ίδιος μικροοργανισμός πρέπει να απομονώνεται με καλλιέργεια από το εμβολιασμένο πειραματόζωο.*

Η συμβολή του R. Koch στην πρόοδο της Μικροβιολογίας υπήρξε μεγάλη. Απ' αυτόν αναπτύχθηκαν οι τεχνικές της καλλιέργειας σε στερεά θρεπτικά υλικά. Για τη στερεοποίηση των θρεπτικών υλικών ο Koch χρησιμοποίησε αρχικώς την πηκτή. Το 1883 αντικατέστησε την πηκτή με το άγαρ. Η μικροφωτογραφία και η χρήση των χρωστικών της ανιλίνης για τη χρώση και μελέτη των μικροβίων, εφαρμόστηκαν επίσης από τον Koch (Εικ. Α-3).

Πριν από το τέλος του 19ου αιώνα είχαν ανακαλυφθεί και μελετηθεί μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για τις περισσότερες νόσους των ανθρώπων και ζώων. Οι γνώσεις αυτές οδήγησαν στην καταπολέμηση των νόσων και την απαλλαγή της ανθρωπότητας από τις καταστρεπτικές επιδημίες του παρελθόντος. Παράλληλα προς τις έρευνες αυτές με τις οποίες διευκρινίστηκε η αι-



*Ανακαλύψεις:
Μυκοβ. φυματίωσης
Βάκιλλος άνθρακα
Στερεά θρεπτικά υλικά
Χρώσεις μικροβίων*

Εικόνα Α-3. Robert Koch (1843-1910).

τιολογία των νόσων, αποδείχτηκε ότι στο χώμα, στον αέρα, στο νερό των ποταμών και λιμνών υπάρχουν διάφορα είδη μικροοργανισμών, πολλά από τα οποία είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας. Διερευνήθηκε επίσης η σημασία των μικροβίων για τη γεωργία και τις βιομηχανίες, τη γαλακτοκομία, την κονσερβοποιία, οινοποιία κλπ.

Κατά την τελευταία δεκαετία του 19ου αιώνα αποδείχτηκε η ύπαρξη των ιών. Το 1892 ο Ρώσος D. Ivanovski (1864-1920) απέδειξε ότι η μωσαϊκή νόσος του καπνού είναι δυνατόν να μεταδοθεί στα υγιή φυτά καπνού με εμβολιασμό με σπόρο νοσούντων φυτών απαλλαγμένο κοινών μικροβίων μετά από διήθηση δια μικροβιοκρατών ηθμών. Το εύρημα τούτο επιβεβαιώθηκε από τον Ολλανδό Beijerinck το 1898. Έτσι η πρώτη νόσος για την οποία αποδείχτηκε ότι το αίτιο της ήταν διηθητός ιός, ήταν νόσος φυτού. Το 1898 οι Γερμανοί Frosch και Löffler απέδειξαν ότι η νόσος του αφθώδους πυρετού των ζώων οφείλεται επίσης σε ιό. Το 1900 ο Walter Reed και οι συνεργάτες του, εργαζόμενοι στην Κούβα, απέδειξαν ότι ο κίτρινος πυρετός του ανθρώπου οφείλεται σε διηθητό ιό (Βλέπε Κεφ. Ζ').

Σαπρόφυτα και παθογόνα μικρόβια

Πολλά από τα μικρόβια λαμβάνουν για την ανάπτυξή τους τις απαιτούμενες ουσίες από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται (χώμα, νερό), τρεφό-

μενα με νεκρές οργανικές ουσίες. Πρόκειται για τα «*ελευθέρως ζώντα μικρόβια*». Αυτά δεν είναι βλαπτικά για τον άνθρωπο και τα ζώα. Εντούτοις μερικά τουλάχιστον μικρόβια έχασαν την ικανότητα να ζουν ελεύθερα και εξαρτώνται από άλλους οργανισμούς, επί ή εντός των οποίων ζουν και λαμβάνουν την τροφή τους. Τα μικρόβια αυτά μοιάζουν προς τα ελευθέρως ζώντα και πιστεύεται ότι προέρχονται απ' αυτά. Κατέστησαν έτσι τα μικρόβια αυτά «*παράσιτα*», δηλαδή εξαρτώνται για την ανάπτυξη και διατήρησή τους από τους μεγαλύτερους οργανισμούς απ' τους οποίους λαμβάνουν και την τροφή τους. Η ύπαρξη ενός μικροβίου στους ιστούς δεν σημαίνει πάντοτε τη γένεση νόσου. Πολλά είδη μικροβίων τα οποία καλούνται «*σαπρόφυτα*» ζουν στο δέρμα και τους βλεννογόνους του ανθρώπου και των ζώων χωρίς να προκαλούν νοσηρές εκδηλώσεις.

Μικρόβια τα οποία μπορούν να προκαλέσουν νόσο και παθολογικές αλλοιώσεις στον άνθρωπο ή τα ζώα καλούνται «*παθογόνα*». Η ικανότητα πρόκλησης ελαφράς ή βαριάς νόσου εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη των μικροβίων, αλλά και από την κατάσταση του οργανισμού. Ενίοτε μικρόβια τα οποία ζουν σαπροφυτικά, μπορούν να καταστούν παθογόνα υπό ορισμένες συνθήκες (*δυσνητικώς παθογόνα μικρόβια*).

Η Ιατρική Μικροβιολογία, Μυκητολογία, Ιολογία και Παρασιτολογία ασχολούνται με τη διακρίβωση της αιτιολογίας και παθογένειας, την εργαστηριακή διάγνωση και θεραπεία των νόσων που προκαλούνται από τους διάφορους μικροοργανισμούς όπως και με την επιδημιολογία και την καταπολέμηση των νόσων αυτών. Ως προς το περιεχόμενό τους, έχουν στενούς δεσμούς με τους διάφορους άλλους κλάδους της Ιατρικής, όπως με την Υγιεινή και Προληπτική ιατρική, την Παθολογία και Παθολογική ανατομική, τη Χειρουργική, τη Φαρμακολογία και τη Θεραπευτική.

Ταξινόμηση των μικροοργανισμών


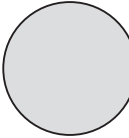









Τα μικρόβια είναι ζώντες οργανισμοί αόρατοι με γυμνό οφθαλμό, σχετικώς απλοί στην κατασκευή και συνήθως μονοκύτταροι. Με το σύνθετο μικροσκόπιο είναι ορατά πολλά από τα μικρόβια των οποίων το μέγεθος είναι μεγαλύτερο του 0,2 μm (όριο της διακριτικής ικανότητας του μικροσκοπίου). Μικροοργανισμοί μεγέθους μικρότερου του 0,2 μm, όπως οι ιοί, είναι ορατοί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Με τη ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δυνατόν να διακρίνουμε σωματίδια απέχοντα μεταξύ τους 0,001 μm. Ιοί διαμέτρου 0,01-0,2 μm είναι ορατοί με αυτό.

Οι μικροοργανισμοί γενικώς ταξινομήθηκαν από τον Haeckel (1866) σε χωριστό βασίλειο, τα «**Πρώτιστα**». Οι οργανισμοί που ανήκουν στα «Πρώτιστα» διακρίνονται από τα φυτά και τα ζώα από την απλή τους κατασκευή. Είναι συνηθέστερα μονοκύτταροι οργανισμοί, εάν δε είναι πολυκύτταροι οργανισμοί, δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση των ιστών.

Τα πρώτιστα υποδιαιρούνται σε: 1. «**Ανώτερα Πρώτιστα ή Ευκαρυωτικά**», τα οποία χαρακτηρίζονται από κυτταρική κατασκευή όμοια με αυτή των φυτών και ζώων, την καλούμενη ευκαρυωτική, και 2. «**Κατώτερα Πρώτιστα ή Προκαρυωτικά**», τα οποία χαρακτηρίζονται από απλούστερη κυτταρική κατασκευή, καλούμενη προκαρυωτική.

Στα *Ευκαρυωτικά* υπάγονται τα *Πρωτόζωα*, οι *Μύκητες* και τα *Φύκη* (εκτός των *Κυανοφυκών*). Στα δύο πρώτα περιλαμβάνονται πολλά είδη ιατρικής σημασίας. Στα *Προκαρυωτικά* υπάγονται τα *Βακτήρια*. Με τον όρο αυτό υποδηλώνονται εδώ, τα από τους ξένους αποκαλούμενα *Bacteria* και τα *Κυανοφύκη*. Τα *Βακτήρια* γενικώς έχουν μέγεθος 0,2-2 μm (Εικ. Α-4).

Στα *Βακτήρια* (*Bacteria*) υπάγονται τα *Σπειροχαιτιακά* (Σπειροχαιίτες),

Κύτταρα	Μεγίστη διάμετρος σε (nm)	
Ερυθρά αιμοσφαίρια	7,500	
Βακτήρια		
Στρεπτόκοκκος	750	
Ρικέτσια	250	
Ιοί		
Δαμαλίδας	210	
Απλού έρπητα	130	
Λύσσας	125	
Γρίπης	85	
Αδενοϊοί	75	
T2 φάγος	65	
Πολιομελίτιδας	27	
Κίτρινου πυρετού	22	

Εικόνα Α-4. Συγκριτικά μεγέθη Κυττάρων – Βακτηρίων – Ιών.
[Ελήφθη από Talaro K. and A. (1993). *Foundations in Microbiology*
Wm.C. Brown publishes με μετάφραση των όρων].

τα *Ακτινομυκητιακά*, τα *Ευβακτηριακά* (Eubacteria), τα *Μυκοπλάσματα*, οι *Ρικέτσιες* και τα *Χλαμύδια*.

Τα βακτήρια ονομάζονται και *Σχιζομύκητες*, έλαβαν δε το όνομα αυτό διότι πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση. Οι Ρικέτσιες ως προς το μέγεθος είναι μικρότερες των άλλων μικροβίων: 0,2-0,5 μm (Εικ. Α-4).

Οι *Ιοί*, όμως, διαχωρίζονται σαφώς από τους άλλους μικροοργανισμούς. Το σωματίδιο του ιού αποτελείται από μόριο πυρηνικού οξέος, το οποίο μπορεί να είναι δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) ή ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA), περιβαλλόμενο από πρωτεϊνικό περίβλημα, το οποίο καλείται καψίδιο (capsid). Είναι αόρατοι με το κοινό μικροσκόπιο και αναπτύσσονται μόνο σε ζώντα κύτταρα. Οι Βακτηριοφάγοι είναι ιοί των μικροβίων. Προκαλούν συνήθως τη λύση των μικροβίων εισερχόμενοι και πολλαπλασιαζόμενοι σε αυτά.

Οι *Σχιζομύκητες* (*Schizomycetes*), αποτελούν κλάση, ταξινομούνται σε τάξεις, οικογένειες, φυλές, γένη και είδη, ανάλογα με τα μορφολογικά, φυσιολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά τους, τα μοριακά χαρακτηριστικά, τη σχέση των βάσεων του DNA του μικροβίου και του υβριδισμού των πυρηνικών οξέων. Τα ονόματα των μικροβίων έχουν ληφθεί από την Ελληνική και Λατινική γλώσσα. Η τάξη (order) λαμβάνει την κατάληξη -ales (-ιακά), η οικογένεια (family) την κατάληξη -aceae (-οειδή) και η φυλή (tribe) την κατάληξη -eae (-εια).

- π.χ. Τάξη – Eubacteriales - Ευβακτηριακά
- Οικογένεια – Enterobacteriaceae - Εντεροβακτηριοειδή
- Φυλή – Salmonelleae - Σαλμονέλλεια
- Γένος – Salmonella - Σαλμονέλλα
- Είδος – typhosa - τύφου

Τα μικρόβια λαμβάνουν δύο ονόματα, από τα οποία το πρώτο υποδηλώνει το γένος και το δεύτερο το είδος. Το πρώτο γράμμα του γένους γράφεται κεφαλαίο, ενώ το είδος γράφεται με μικρά γράμματα: π.χ. *Staphylococcus aureus* – Σταφυλόκοκκος χρυσίζων, *Shigella dysenteriae* – Σιγκέλλα της δυσεντερίας.

Εκτός του επισήμου ονόματος πολλά μικρόβια είναι γνωστά και αναφέρονται με τα ονόματα τα οποία έλαβαν κατά την πρώτη περιγραφή τους και τα οποία επικράτησαν.

Ενίοτε γίνεται χρήση του όρου *στέλεχος*. Τούτο δεν αποτελεί υποβαθμίδα του είδους, αλλά αντιπροσωπευτική καλλιέργεια μικροβίου γνωστής ή ιστορικά διατηρηθείσας προέλευσης.

Την Ιατρική Μικροβιολογία ενδιαφέρουν από τα Ευκαρυωτικά, τα Πρωτόζωα και οι Μύκητες και από τα Προκαρυωτικά οι Σχιζομύκητες, τα Μυκοπλάσματα και οι Ρικέτσιες. Την ενδιαφέρουν επίσης οι Ιοί και οι Βακτηριοφάγοι. Στα Πρωτόζωα, τους Σχιζομύκητες, τις Ρικέτσιες, τους Ιούς και λιγότερο στα Μυκοπλάσματα περιλαμβάνονται οι κυριότεροι παθογόνοι παράγοντες για τον άνθρωπο.

Στους μύκητες περιλαμβάνονται αίτια κυρίως δερματικών και σπανιότερα γενικευμένων λοιμώξεων. Οι βακτηριοφάγοι χρησιμεύουν κυρίως για την ταξινόμηση των μικροβίων σε διάφορους «Βακτηριοφαγικούς τύπους», εφόσον βέβαια το μικρόβιο προσβάλλεται από φάγους. Η μέθοδος είναι χρήσιμη για επιδημιολογικούς σκοπούς.

Εκτός αυτών στο περιεχόμενο της μελέτης της Μικροβιολογίας περιλαμβάνονται και τα πρίονς (prions). Τα prions είναι μόρια ανώμαλης πρωτεΐνης, η οποία μπορεί να αναπαράγεται χωρίς την παρουσία νουκλεϊνικών οξέων. Ο όρος prions προήλθε από τα αρχικά γράμματα των αγγλικών λέξεων PR-oteïnaceous και vir-ION, για να χαρακτηρίσει τη διπλή φύση του μορίου ως πρωτεϊνούχου με ιδιότητες ιού.

Τα prions είναι αιτιολογικοί παράγοντες διαφόρων νόσων του ανθρώπου και των ζώων. Τέτοια νοσήματα στον άνθρωπο είναι η νόσος Creutzfeldt-Jacob και η νόσος Kuru. Στα πρόβατα προκαλούν τη νόσο Scrapie και την σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (νόσο των τρελλών αγελάδων).

Μορφολογική μελέτη του μικροβιακού κυττάρου

Η μορφολογική μελέτη του μικροβιακού κυττάρου γίνεται:

1. Με το σύνθετο μικροσκόπιο, όπου χρησιμοποιείται κοινό φως. Με το μικροσκόπιο είναι δυνατή η διάκριση μικροβίων μεγέθους 0,2 μm. Με τη χρησιμοποίηση φωτός μικρότερου μήκους κύματος, όπως οι υπεριώδεις ακτίνες, μπορεί να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου και να γίνουν ορατά σωματίδια διαμέτρου 0,1 μm.

2. Με το μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου. Κατά τη μικροσκόπηση σε σκοτεινό πεδίο, στο σύστημα συγκέντρωσης των ακτίνων τίθεται διάφραγμα που εμποδίζει τις φωτεινές ακτίνες να εισέρχονται απευθείας στον οφθαλμό. Μόνο ακτίνες αντανakλώμενες επί σωματιδίων ευρισκομένων στο εξεταζόμενο παρασκεύασμα εισέρχονται στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου. Με αυτόν τον τρόπο σωματίδια τα οποία δεν διακρίνονται με τη συ-

νήθη μικροσκοπήση, διότι έχουν δείκτη διαθλάσεως όμοιο περίπου προς το περιβάλλον υγρό, καθίστανται ορατά. Όταν δεν υπάρχουν σωματίδια, δεν εσέρχεται φως στον αντικειμενικό φακό και το πεδίο εμφανίζεται σκοτεινό.

3. Με το μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεως. Σε αυτό με προσθήκη στο κοινό μικροσκόπιο ειδικού οπτικού συστήματος, διαφορές στη φάση του κύματος του φωτός, οι οποίες επισυμβαίνουν με τη διόδου του από ουσίες διαφορετικής οπτικής πυκνότητας, καθίστανται ορατές ως διαφορές της έντασης του φωτός. Η μικροσκοπήση με αντίθεση φάσεως είναι χρήσιμη για τη μελέτη αχρώων ζώντων μικροβίων, πρωτοζώων ή κυττάρων.

4. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, στο οποίο ως πηγή φωτός χρησιμοποιείται ακτίνα ηλεκτρονίων, αντί δε φακών ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καθίστανται ορατοί οι ιοί, διαμέτρου 0,01-0,2 μm. Υπάρχουν 2 είδη ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (transmission) και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (scanning).

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται επίσης για τη μελέτη της λεπτής υφής του μικροβιακού σώματος. Οι τεχνικές οι οποίες εφαρμόζονται για τη μελέτη των ιών με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εκτίθενται στο Κεφάλαιο Ζ'.

Η εξέταση των Σχιζομυκήτων με το σύνθετο μικροσκόπιο γίνεται σε πρόσφατα (νωπά), αχρωμάτιστα παρασκευάσματα ή μετά από χρώση των μικροβίων με διάφορες χρωστικές.

Πρόσφατα παρασκευάσματα. Χρησιμεύουν για τη μελέτη της μορφολογίας και της κινητικότητας των μικροβίων. Το προς μελέτη μικρόβιο από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και το υλικό καλύπτεται με καλυπτρίδα. Η παρατήρηση της κινητικότητας των μικροβίων μπορεί να γίνει καλύτερη με την εξέταση παρασκευασμάτων αιωρούμενης σταγόνας. Ορισμένα μικρόβια, όπως π.χ. οι Σπειροχαίτες, καθίστανται ορατά μόνο με μικροσκοπήση σε σκοτεινό πεδίο.

Χρωματισμένα παρασκευάσματα. Η παρατήρηση των μικροβίων και η μελέτη της μορφολογίας τους επιτυγχάνεται καλύτερα μετά από ξήρανση και μονιμοποίηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα και χρώση με διάφορες χρωστικές. Η μονιμοποίηση γίνεται με θέρμανση, ή με χημικά μέσα. Μετά την ξήρανση, το παρασκεύασμα μονιμοποιείται με ταχεία δίοδο επάνω από φλόγα. Για τη μονιμοποίηση με χημικά μέσα χρησιμοποιείται τετροξειδίο του οσμίου ή ειδικά μονιμοποιητικά διαλύματα όπως τα διαλύματα Bouin και Schaudinn.

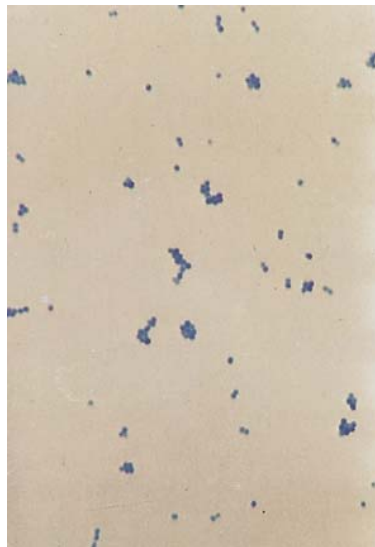
ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ. Οι περισσότερες είναι παράγωγα της ανιλίνης και διαιρούνται σε βασικές και όξινες. Οι βασικές χρωστικές είναι οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες στη Μικροβιολογία. Αυτές είναι μονοδύναμα όξινα άλατα βασικών χρωστικών.

Οι βασικές χρωστικές αποτελούνται από έγχρωμο κατιόν και από άχρωμο ανιόν. Οι όξινες αντιθέτως διαθέτουν έγχρωμο ανιόν και άχρωμο κατιόν. Κατά τη χρώση των μικροβίων το έγχρωμο κατιόν της χρωστικής συνδέεται με τα πυρηνικά οξέα τα οποία υπάρχουν στο σώμα των μικροβίων και τα οποία διαθέτουν ανιόντα υπό τη μορφή φωσφορικών ομάδων αρνητικά φορτισμένων.

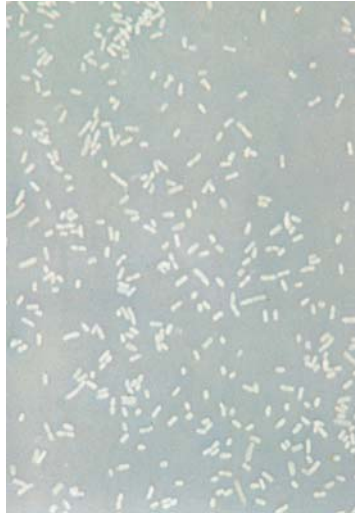
Χρωστικές ουσίες χρήσιμες στη Μικροβιολογία είναι το κυανούν του μεθυλενίου, η βασική φουξίνη, το κρυσταλλικό ιώδες, το ιώδες της γεντιανής, το ιώδες του μεθυλίου, η σαφρανίνη κλπ.

Οι χρωστικές χρησιμοποιούνται υπό μορφή διαφόρων υδατικών ή οιοπνευματικών διαλυμάτων. Στις χρωστικές προστίθεται και πρόστυμμα όπως π.χ. η φαινόλη στο διάλυμα της φαινικούχου φουξίνης. Για τη χρώση των μικροβίων το διάλυμα της χρωστικής αφήνεται να δράσει ορισμένο χρόνο και μετά το παρασκεύασμα αποπλύνεται με νερό προς απομάκρυνση της περισσειας της χρωστικής.

Η χρώση με μία μόνο χρωστική καλείται «**απλή χρώση**». Η χρώση κατά



Εικόνα Α-5. Απλή θετική χρώση (κυανούν μεθυλενίου).



Εικόνα Α-6. Αρνητική χρώση.

την οποία χρησιμοποιούνται περισσότερες της μιας χρωστικές καλείται «**σύνθετη χρώση**». Σύνθετες χρώσεις είναι η χρώση κατά Gram, η χρώση κατά Giemsa για αιματολογικά παρασκευάσματα, η χρώση κατά Ziehl-Neelsen για οξυάντοχα βακτηρίδια, οι χρώσεις κατά Albert και κατά Neisser για Κορνοβακτηρίδια κ.ά.

Θετική χρώση καλείται εκείνη κατά την οποία χρωματίζεται το μικρόβιο αλλά όχι το περιβάλλον (Εικ. Α-5).

Αρνητική χρώση είναι εκείνη κατά την οποία χρωματίζεται το περιβάλλον και τα μικρόβια παραμένουν αχρωμάτιστα. Τέτοιες αρνητικές χρώσεις είναι η χρώση με σινική μελάνη και η χρώση με νιγροσίνη (Εικ. Α-6).

Απλή χρώση. Από τις απλούστερες και χρησιμότερες απλές χρώσεις είναι η χρώση με κυανό του μεθυλενίου κατά Löffler. Το διάλυμα της χρωστικής παρασκευάζεται με την ανάμειξη:

Κεκορεσμένου αλκοολικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 30 ml
KOH 0,01 % W/V 100 ml.

Το διάλυμα επιχύνεται στο παρασκεύασμα και αφήνεται εκεί επί 1'. Μετά τη χρώση το παρασκεύασμα αποπλύνεται με νερό.

Σύνθετες χρώσεις. Χρώση κατά Gram. Η χρώση αυτή εισήχθηκε στη Μικροβιολογία από τον Christian Gram το 1884. Έκτοτε χρησιμοποιείται με επιτυχία για το διαχωρισμό των μικροβίων στα δεχόμενα και στα μη δεχόμενα τη χρώση κατά Gram. Τα πρώτα καλούνται Gram θετικά και τα δεύτερα

Gram αρνητικά (Πίν. Α-1). Για τη χρώση αυτή οι εφαρμοζόμενες τεχνικές είναι πολλές. Βασικά όλες περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

Πίνακας Α-1. Ταξινόμηση των παθογόνων σχιζομυκήτων με τη χρώση Gram

Gram θετικοί	Gram αρνητικοί
Σταφυλόκοκκος	Γονόκοκκος
Στρεπτόκοκκος	Μηνιγγιτιδόκοκκος
Πνευμονιόκοκκος	Μπρανχιαμέλα η καταρροϊκή
Βάκιλλος του άνθρακα	Αιμόφιλος της ινφλουέντζας
Κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας	Μπορντετέλα του κοκκύτη
Κλωστηρίδιο του τετάνου	Βρουκέλλες
Κλωστηρίδιο της αλλαντίασης	Σαλμονέλλες
Κλωστηρίδια της αεριογόνου γάγγραινας	Σιγκέλλες
Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης	Πρωτεΐς
Ακτινομύκητες	Κολοβακτηρίδιο
	Κλεμπσιέλες
	Ψευδομονάδα
	Δονάκιο της χολέρας
	Υερσινία της πανώλους

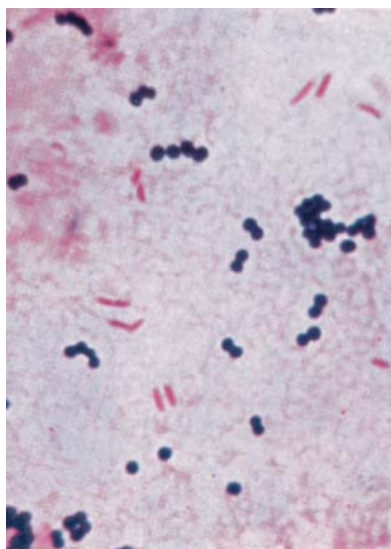
1) Χρώση των παρασκευασμάτων με μια βασική ιώδη χρωστική παράγωγο της παρα-ροζανιλίνης (ιώδες της γεντιανής, ιώδες του μεθυλίου ή χρυσταλλικό ιώδες), 2) Απόπλυση της πρώτης χρωστικής και προσθήκη αραιού διαλύματος ιωδίου (όπως το διάλυμα Lugol), 3) Αποχρωματισμό με οινόπνευμα ή ακετόνη ή με μείγμα ακετόνης και οινόπνευματος σε ίσα μέρη, μέχρις ότου όλη η χρωστική απομακρυνθεί από το παρασκεύασμα και 4) Μετάχρωση με άλλη χρωστική, όπως το αραιό διάλυμα φουξίνης ή σαφρανίνης οι οποίες έχουν χρώμα ερυθρό.

Μερικά από τα μικρόβια διατηρούν, παρά τον αποχρωματισμό με το οινόπνευμα ή την ακετόνη, την πρώτη ιώδη χρωστική και το κυανοϊνώδες χρώμα. Τα μικρόβια αυτά τα οποία χρωματίζονται ιώδη καλούνται **Gram θετικά**. Άλλα μικρόβια αποχρωματίζονται, δεν διατηρούν την ιώδη χρωστική και χρωματίζονται κατόπιν ερυθρά με τη δεύτερη χρωστική. Τα μικρόβια αυτά καλούνται **Gram αρνητικά**. Τα Gram αρνητικά μικρόβια, εφόσον η χρώση γίνει τεχνικά άρτια, χρωματίζονται πάντα ερυθρά. Αντιθέτως τα Gram θετικά μικρόβια δεν χρωματίζονται ενίοτε καλά και φαίνονται Gram αρνητικά, ιδιαίτερα

όταν προέρχονται από παλιές καλλιέργειες, οι οποίες περιέχουν νεκρά ή εκφυλισμένα μικρόβια. Για το λόγο αυτό για τη χρώση κατά Gram πρέπει να χρησιμοποιούνται παρασκευάσματα από νεαρές καλλιέργειες (Εικ. Α-7).

Η διαφορετική συμπεριφορά των μικροβίων στη χρώση κατά Gram δείχνει την ύπαρξη βασικών χημικών διαφορών μεταξύ των κυττάρων των Gram θετικών και αρνητικών μικροβίων. Τούτο ενισχύεται από το γεγονός ότι μερικές φυσιολογικές ιδιότητες των Ευβακτηριακών συνδέονται με την αντίδραση τους στη Gram χρώση. Έτσι τα περισσότερα από τα Gram θετικά μικρόβια είναι πιο ευαίσθητα από τα Gram αρνητικά στις βασικές χρωστικές της ανιλίνης (όπως το κρυσταλλικό ιώδες) και σε μερικά αντιβιοτικά (π.χ. την πενικιλίνη) (Πίν. Α-2).

Οι έρευνες για τη χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων απέδειξαν πράγματι ότι υπάρχουν σταθερές και μεγάλες διαφορές στη χημική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στα Gram θετικά και αρνητικά μικρόβια. Η σημασία του κυτταρικού τοιχώματος στη χρώση κατά Gram έχει διευκρινισθεί μερικώς. Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram θετικών μικροβίων διαλύεται πλήρως από το ένζυμο λυσοζύμη. Εάν στα μικρόβια έπεται από κατάλληλες συνθήκες επιδράσει λυσοζύμη, το κυτταρικό τοίχωμα καταστρέφεται και απελευθερώνονται πρωτοπλάστες. **Πρωτοπλάστης** είναι ο σφαιρικός σχηματισμός ο οποίος δημιουργείται με τον αποχωρισμό του κυτταροπλάσματος Gram θετικού μικροβίου και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, από το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα. Οι πρωτοπλάστες αυτοί διατηρούν τη χρώση τους. Τούτο αποδεικνύει ότι το μικροβιακό κύτταρο και όχι το τοίχωμα δέχεται τη χρώση κατά Gram. Οι πρωτοπλάστες μπορεί να αποχρωματισθούν αμέσως με αιθυλική αλκοόλη. Έτσι τα μικρόβια όταν χάσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα χάνουν συγχρόνως και την ικανότητα να χρωματίζονται θετικά κατά Gram. Είναι φανερό λοιπόν ότι το τοίχωμα των Gram θετικών μικροβίων αποτελεί φραγμό ο οποίος εμποδίζει τον αποχρωματισμό του μικροβίου, δηλαδή την έξοδο του συμπλέγματος χρωστικής - ιωδίου. Τούτο δεν συμβαίνει στα Gram αρνητικά μικρόβια, το τοίχωμα των οποίων έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε λιπίδια. Αυτά εύκολα διαλύονται από την αλκοόλη - ακετόνη, οι οποίες εισδύουν και επιφέρουν τον αποχρωματισμό. (Βλέπε σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος).



Εικόνα A-7. Χρώση κατά Gram

Πίνακας A-2. Διαφορές Gram θετικών και Gram αρνητικών μικροβίων

Ιδιότητα	Gram (+)	Gram (-)
Ευαισθησία σε σουλφοναμίδες και πενικιλίνη	Μεγάλη	Πολύ μικρή
Αναστολή αναπτύξεως από βασικές χρωστικές (Κρυστ. ιώδες)	Μεγάλη	Πολύ μικρή
Ευαισθησία σε χαμηλή επιφανειακή τάση	Μεγάλη	Πολύ μικρή
Ευαισθησία σε ανιονικά απορρυπαντικά	Μεγάλη	Πολύ μικρή
Πέψη από τρυψίνη ή πειψίνη	Ανθεκτικά	Ευαίσθητα
Καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος από λυσοζύμη	Σε πολλά είδη	Απαιτείται προηγουμένως κατεργασία του τοιχώματος
Διάλυση από 1% NaOH	Ανθεκτικά	Ευαίσθητα
Λόγος RNA/DNA στο κύτταρο	8:1	Ίση αναλογία
Αρωματικά και περιέχοντα θείο αμινοξέα στο κυτταρικό τοίχωμα	Κανένα	Πολλά
Λιπίδια στο κυτταρικό τοίχωμα	Ελάχιστα	Πολλά
Ανθεκτικότητα σε νατραζίδιο	Μεγάλη	Πολύ μικρή