

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Στόχοι της εργαστηριακής άσκησης

Να μπορούν οι μαθητές και οι μαθήτριες:

- Να εφαρμόσουν τεχνικές της Μικροβιολογίας για να καλλιεργήσουν μικροοργανισμούς σε στερεό θρεπτικό υλικό.
- Να διερευνήσουν την παρουσία μικροοργανισμών σε διάφορα υλικά – χώρους.
- Να συσχετίσουν την άσκηση με τους κανόνες καθημερινής υγιεινής.

Θεωρητικό υπόβαθρο

Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σχεδόν παντού, στο περιβάλλον, στο σώμα μας, σε κάθε αντικείμενο που βρίσκεται γύρω μας. Παρόλο που δεν μπορούμε να δούμε τα μεμονωμένα κύτταρα των μικροοργανισμών με γυμνό μάτι, έχουμε τη δυνατότητα να συλλέξουμε και να καλλιεργήσουμε στο εργαστήριο τους περισσότερους από αυτούς, ιδιαίτερα τα βακτήρια και τους μύκητες.

Οι μικροοργανισμοί που τυχόν υπάρχουν σε ένα δείγμα, στις κατάλληλες συνθήκες, πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν αποικίες σε στερεό θρεπτικό υλικό. Μια αποικία είναι διακριτή με γυμνό μάτι, προέρχεται από διαδοχικές διαιρέσεις ενός κυττάρου και έχει χαρακτηριστική μορφολογία για τους διάφορους μικροοργανισμούς. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών μιας αποικίας είναι στις περισσότερες περιπτώσεις μια πολύπλοκη διαδικασία και περιλαμβάνει συγκεκριμένες χρώσεις και βιοχημικούς ελέγχους.

Στη φύση οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ετερογενείς πληθυσμούς. Για τη μελέτη ενός μικροοργανισμού απαιτείται η ανάπτυξή του σε καθαρή καλλιέργεια, δηλαδή καλλιέργεια που περιέχει ένα και μόνο είδος. Αν ένας μεικτός πληθυσμός καλλιεργηθεί σε στερεό θρεπτικό υλικό, θα αναπτυχθούν αποικίες. Δεν θα αναπτυχθούν όλοι οι μικροοργανισμοί του πληθυσμού γιατί κάθε θρεπτικό υλικό υποστηρίζει την ανάπτυξη ορισμένων μόνο μικροοργανισμών. Η κάθε αποικία προέρχεται από ένα και μοναδικό κύτταρο. Έτσι, αν λάβουμε κύτταρα από μία αποικία και τα μεταφέρουμε σε νέο θρεπτικό υλικό θα έχουμε θεωρητικά μια καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού.

Η καλλιέργεια μικροβίων είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την επιστήμη και την ιατρική. Αν έχεις πονόλαιμο για παράδειγμα, ένας γιατρός μπορεί να πάρει δείγμα από την επιφάνεια του φάρυγγα με μια αποστειρωμένη μπατονέτα, να το καλλιεργήσει σε κατάλληλες συνθήκες, ώστε να μάθεις ποιος τύπος μικροοργανισμού προκάλεσε τον πονόλαιμο.

Εκτιμώμενη διάρκεια άσκησης

- Μία διδακτική ώρα για την προετοιμασία των τρυβλίων και αναμονή μίας ημέρας μέχρι να πήξει καλά το θρεπτικό υλικό.
- Μία διδακτική ώρα για τη λήψη των δειγμάτων και την επίστρωση των τρυβλίων.
- 3-6 ημέρες για την επώαση μέχρι την παρατήρηση των τρυβλίων.

- Μία διδακτική ώρα για την καταγραφή του πειραματικού αποτελέσματος.
- Μία διδακτική ώρα για την επεξεργασία των δραστηριοτήτων στην τάξη.

Εργαλεία και Υλικά

Για την πραγματοποίηση της εργαστηριακής άσκησης θα χρειαστούν:

Εργαλεία

- Ηλεκτρικό μάτι
- Χύτρα ταχύτητας (εναλλακτικά αυτόκαυστο)
- Λύχνος Bunsen
- Ζυγός
- Θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα
- Μικρός μαγνήτης
- Αποστειρωμένες πιπέτες

Υλικά

- Θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (PCA) σε σκόνη
- Τρυβλία αποστειρωμένα
- Απεσταγμένο νερό
- Κωνική φιάλη
- Αποστειρωμένος διασπορέας ή αποστειρωμένη κεκαμμένη ράβδος για τη διασπορά εναιωρήματος στην επιφάνεια αποστειρωμένου τρυβλίου

Σημείωση

Γενικά το θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια μικροοργανισμών πρέπει να περιέχει:

- μία πηγή άνθρακα, συνήθως ένα σάκχαρο.
- μία πηγή αζώτου,
- ανόργανα άλατα, συμπεριλαμβανομένων των ιχνοστοιχείων,
- υδατοδιαλυτές βιταμίνες.

Προτείνεται η χρήση του θρεπτικού υλικού Plate Count Agar (PCA), το οποίο περιέχει:

- προϊόντα ενζυμικής διάσπασης καζεΐνης και τρυπτόνης ως πηγή αμινοξέων, αζώτου, άνθρακα, βιταμινών και αλάτων,
- εκχύλισμα ζύμης κυρίως ως πηγή βιταμινών του συμπλέγματος B,
- γλυκόζη ως υδατάνθρακα και πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, και
- άγαρ, πολυσακχαρίτης από φύκη που προκαλεί πήξη του θρεπτικού υλικού σε $T < 40^{\circ}\text{C}$.

Εναλλακτικά μπορεί να φτιαχτεί ένα θρεπτικό υλικό που περιέχει:

- 0,3% w/v εκχύλισμα κρέατος (κύβος ζωμού) ως πηγή προϊόντων διάσπασης πρωτεϊνών, υδατανθράκων, ανοργάνων αλάτων και βιταμινών,
- 0,5% w/v πεπτόνη που είναι πλούσια σε πεπτίδια και αμινοξέα, και

- 1,5-2% άγαρ. Εάν το σχολικό εργαστήριο δεν μπορεί να προμηθευτεί άγαρ λόγω κόστους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μη αρωματισμένη ζελατίνη σε σκόνη σε συγκέντρωση περίπου 15% w/v.

Πειραματική διαδικασία

Βήμα 1º: Προετοιμασία στερεού θρεπτικού υλικού

Αν χρησιμοποιηθεί το θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (PCA) ακολουθούμε τις οδηγίες χρήσης του, σύμφωνα με τις οποίες ζυγίζουμε 11,75g σκόνης ανά 500ml απεσταγμένου νερού τα οποία εισάγουμε σε κωνική φιάλη (διαφορετικά, προσαρμόζουμε το πρωτόκολλο στη χρήση των εναλλακτικών υλικών). Αναδεύουμε ελαφρώς, βάζουμε έναν μικρό μαγνήτη μέσα στη φιάλη και τοποθετούμε σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα για καλύτερη ανάδευση. Πωματίζουμε τη φιάλη με αλουμινόχαρτο και την εισάγουμε στη χύτρα για αποστείρωση.

Συμβουλή

Υπολογίζουμε περίπου 25ml υγρού θρεπτικού υλικού για κάθε τρυβλίο. Η φιάλη προς αποστείρωση να γεμίζει περίπου ως το 1/3.

Βήμα 2: Αποστείρωση (121°C για 20min)

Γεμίζουμε τη χύτρα ταχύτητας με νερό περί το 1/5. Τοποθετούμε την κωνική φιάλη με το θρεπτικό υλικό μέσα στη χύτρα και την κλείνουμε. Την τοποθετούμε στο αναμμένο μάτι και περιμένουμε μέχρι να σφυρίξει. Χαμηλώνουμε το μάτι και την αφήνουμε για 20 λεπτά. Έπειτα την απομακρύνουμε από το μάτι και περιμένουμε να αδειάσει από ατμό για να την ανοίξουμε όσο είναι ακόμα ζεστή.

Βήμα 3: Επίστρωση τρυβλίων με θρεπτικό υλικό

Όσο είναι το θρεπτικό υλικό ζεστό (όχι όμως καυτό) και σε υγρή κατάσταση, γεμίζουμε με αυτό, ένα ένα τα τρυβλία κάτω από στείρες συνθήκες. Όταν τα τρυβλία κρυώσουν και στερεοποιηθεί το θρεπτικό υλικό, τότε είναι έτοιμα προς χρήση.

Συμβουλή

Η μεταφορά του θρεπτικού υλικού στα τρυβλία πραγματοποιείται κοντά σε φλόγα λύχνου Bunsen. Ο λύχνος Bunsen χρησιμοποιείται για τη δημιουργία στειρών συνθηκών στον πάγκο εργασίας.

Βήμα 4: Απομόνωση μικροοργανισμών από το ανθρώπινο σώμα

1. Άνοιξε ένα τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό και άγγιξέ το με τα δάχτυλά σου. Πρόκειται για το **τρυβλίο 1**.
2. Άνοιξε ένα δεύτερο τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό και άγγιξέ το με τα δάχτυλά σου, αφού προηγουμένως έχεις πλύνει τα χέρια σου με σαπούνι, χωρίς να τα σκουπίσεις. Πρόκειται για το **τρυβλίο 2**.
3. Επώασε τα τρυβλία σε θερμοκρασία δωματίου για 3 - 6 περίπου ημέρες μακριά από το ηλιακό φως, παρατηρώντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε καθημερινή βάση.
4. Μετά το τέλος της επώασης, παρατήρησε τη μορφολογία των αποικιών και μέτρησε τον αριθμό τους.

Βήμα 5: Απομόνωση μικροοργανισμών από τον αέρα

1. Άφησε ανοικτό ένα τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό ανοικτό για 30 min. Πρόκειται για το **τρυβλίο 3**.
2. Επώασε το τρυβλίο αυτό σε θερμοκρασία δωματίου για 3 - 6 περίπου ημέρες μακριά από το ηλιακό φως, παρατηρώντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε καθημερινή βάση.
3. Μετά το τέλος της επώασης, παρατήρησε τη μορφολογία των αποικιών και μέτρησε τον αριθμό τους.

Βήμα 6: Απομόνωση μικροοργανισμών από τις τροφές (γάλα)

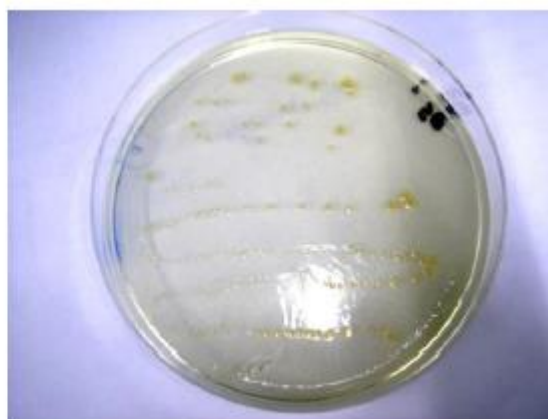
1. Μετέφερε 1 ml παστεριωμένου γάλακτος σε 9 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.
2. Αφού ανακινήσεις τη φιάλη, πάρε 0,2 ml και επίστρωσέ το με τη βοήθεια του διασπορέα ή της κεκαμμένης ράβδου σε ένα τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό. Πρόκειται για το **τρυβλίο 4**. Επώασε το τρυβλίο σε θερμοκρασία δωματίου για 3 - 6 περίπου ημέρες μακριά από το ηλιακό φως, παρατηρώντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε καθημερινή βάση.
3. Μετά το τέλος της επώασης, παρατήρησε τη μορφολογία των αποικιών και μέτρησε τον αριθμό τους.

Βήμα 7: Απομόνωση μικροοργανισμών από το έδαφος

1. Ζύγισε 0,01g χώματος και εναιώρησέ το σε 100 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.
2. Πάρε με πιπέττα 0,2 ml από το εναιώρημα και επίστρωσέ το με τη βοήθεια του διασπορέα ή της κεκαμμένης ράβδου σε ένα τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό. Πρόκειται για το **τρυβλίο 5**.
3. Επώασε το τρυβλίο αυτό σε θερμοκρασία δωματίου για 3 - 6 περίπου ημέρες μακριά από το ηλιακό φως, παρατηρώντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε καθημερινή βάση.
4. Μετά το τέλος της επώασης, παρατήρησε τη μορφολογία των αποικιών και μέτρησε τον αριθμό τους.

Παρατηρήσεις

1. Στην παραπάνω πειραματική διαδικασία, έχουμε ένα τρυβλίο «μάρτυρα», δηλαδή ένα τρυβλίο που παραμένει συνεχώς κλειστό ώστε να χρησιμοποιηθεί για σύγκριση με τα άλλα τρυβλία. Πρόκειται για το **τρυβλίο 6**.
2. Οι αποικίες των βακτηρίων είναι συνήθως μικρού μεγέθους και διακρίνονται σαν στρογγυλοί υπόλευκοι κύκλοι. Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος είναι πιθανό να δημιουργηθούν και αποικίες από μύκητες, οι οποίες διακρίνονται από αυτές των βακτηρίων από τις υφές του μυκηλίου που μοιάζουν με ίνες βαμβακιού, τριχίδια ή βελούδο. Μπορεί να είναι λευκές ή έγχρωμες (γκριζωπές, πράσινες, μαύρες, ρόδινες κ.λπ.)
3. Τα βήματα 4, 5, 6 και 7 πραγματοποιούνται από διαφορετικές ομάδες μαθητών/τριών του τμήματος ταυτόχρονα.



Εικόνα 1: Αποικίες βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*. Πηγή: Πανεπιστήμιο Πατρών



(α)



(β)

Εικόνα 2: Αποικίες μυκήτων (α) *Aspergillus sp.* (β) *Penicillium sp.* Πηγή: Πανεπιστήμιο Πατρών

Φύλλο Εργασίας

Αποτελέσματα

Δραστηριότητα καταγραφής του πειραματικού αποτελέσματος

Κατάγραψε τις παρατηρήσεις σου στον πίνακα. Στην τελευταία στήλη συμπληρώνεις με ένα (+) αν υπάρχουν αποικίες μυκήτων στο τρυβλίο ή ένα (-) αν δεν υπάρχουν.

Αριθμός τρυβλίου	Αριθμός αποικιών βακτηρίων	Μέγεθος αποικιών βακτηρίων	Αποικίες μυκήτων
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Δραστηριότητα απάντησης ερωτήσεων

- Σελίδα | 6

-
-
5. Ποιος είναι ο λόγος για τον οποίο αποστειρώνουμε το διάλυμα του θρεπτικού υλικού;

.....

.....

.....

.....

.....

6. Γιατί συνηθίζεται να κλείνουμε τα τρυβλία κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας;

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Αγγελής ΓΔ., Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, 2007.

Κουρκουτάς Ι., Εργαστηριακές Ασκήσεις Μοριακής Μικροβιολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη 2010.

Ελένη Κάτανα, Βιολόγος – Υπ. ΕΚΦΕ Ν. Φιλαδέλφειας, Καλλιέργειες μικροοργανισμών με απλά υλικά.

Εργαστηριακός οδηγός Βιολογίας Β' Γενικής Παιδείας, ΙΤΥΕ Διόφαντος, 2021.

Εργαστηριακός οδηγός Βιολογίας Προσανατολισμού Θετικών Σπουδών και Σπουδών Υγείας Γ' Λυκείου, ΙΤΥΕ Διόφαντος, 2021.