



Πολυτεχνείο Κρήτης- Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, 2^ο Εξάμηνο

10

Ομάδα 15

2^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Ημερομηνία : 06 Μαρτίου 2018

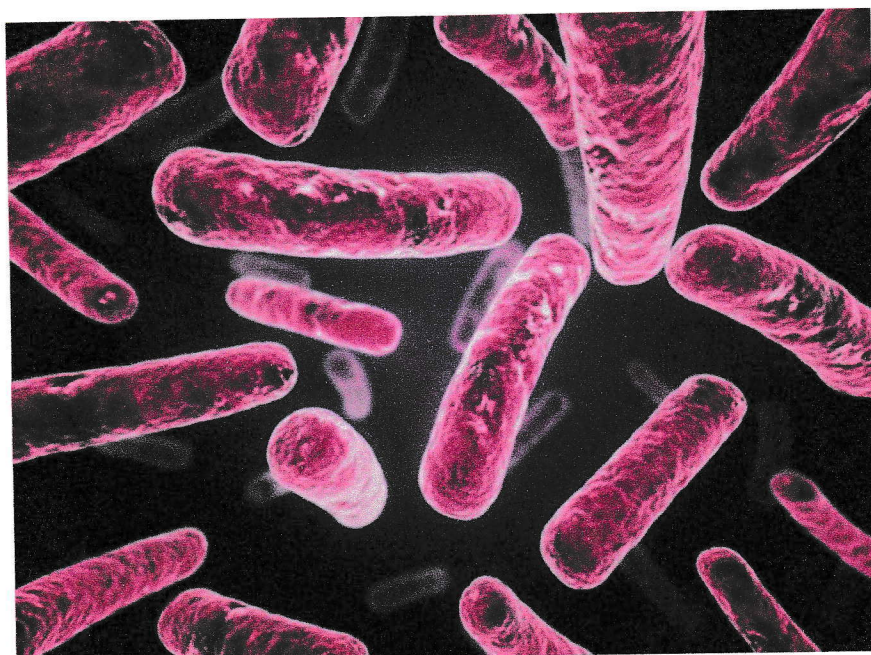
Μέλη: Ευαγγέλου Παναγιώτης

Αυξεντίου Λουκής

Ολύμπιος Πέτρος

Χατζηαθανασίου Χρύσω

Κανναβιάς Χρύσανθος



Εισαγωγή

Ο σκοπός της εργαστηριακής ασκήσεως είναι η απομόνωση και η καλλιέργεια βακτηρίων με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και της επιφανειακής διασποράς. Τα βακτήρια είναι απλοί, μονοκύτταροι, προκαρυωτικοί οργανισμοί με μέγεθος της τάξης 1 μm . αναλυτικότερα τα βακτήρια διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, τα gram(+) και τα gram(-). Οι οποίες διακρίνονται ανάλογα με το αποτέλεσμα μιας χρωστικής αντίδρασης. Τα βακτήρια είναι οι αφθονότεροι οργανισμοί στην επιφάνεια του εδάφους. Το σχήμα τους μπορεί να είναι ραβδοφόρο, σφαιρικό ή σπειροειδές.

Υλικά

- 38,2 gr χώματος
- Εργαστηριακός ζυγός
- Τρυβλία με άγαρ (pentone-yeast)
- Αποστειρωμένο νερό
- Αιθυλική αλκοόλη
- Αποστειρωμένη κωνική φιάλη
- Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Κρίκοι εμβολιασμού
- Αποστειρωμένο σιφώνιο

Μέθοδος

Τεχνική Διαδοχικών Αραιώσεων

Αρχικά τοποθετήσαμε μια προζυγισμένη ποσότητα χώματος στο φούρνο στους 107 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Αφού ζυγίσαμε το χώμα μετά την από την ξήρανση υπολογίσαμε την περιεχόμενη υγρασία. Ακόλουθος τοποθετήσαμε 95 ml αποσταγμένου νερού σε κωνική φιάλη και 9 ml σε 4 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Διαλύουμε τα 10 gr νωπού χώματος σε 95 ml αποσταγμένου νερού και έτσι έχουμε το 10^{-1} gr χώματος ανά ml. Το αναδεύουμε για 10 λεπτά, πριν ακόμη το χώμα κατακαθίσει και στην συνέχεια παίρνουμε 1 ml από το διάλυμα μας με αποστειρωμένο σιφώνιο στο σωλήνα που περιέχει τα 9 ml νερού και έτσι έχουμε 10^{-2} gr ανά ml. Τέλος με τον ίδιο τρόπο δημιουργούμε της συγκεντρώσεις 10^{-3} , 10^{-4} και 10^{-5} gr χώματος ανα ml.

Τεχνική Επιφανειακής Διασποράς

Αρχικά ετοιμάζουμε τρεις καλλιέργειες, μία για κάθε διάλυμα (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Αφού αναδεύσουμε καλά τα τρία διαλύματα, μεταφέρουμε δύο φορές 0,1ml από κάθε διάλυμα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διάλυση κατά ένα παράγοντα του 10. Έπειτα παίρνουμε 0,1 ml από τα διαλύματα με συγκέντρωση 10^{-4} και 10^{-5} , χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο σιφώνιο, και το τοποθετούμε σε τρυβλία με rentone yeast αγάρ. Ακολούθως, απλώνουμε το διάλυμα σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, χρησιμοποιώντας κρίκους εμβολιασμού.

Αφού ετοιμάσουμε τα δύο τρυβλία, τα τοποθετούμε αντεστραμμένα σε επωαστικό θάλαμο, σε θερμοκρασία δωματίου, για περίοδο μιας εβδομάδας. Με το πέρας μιας εβδομάδας, εξετάζουμε προσεκτικά όλα τα τρυβλία και παρατηρούμε τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αποικιών. Ακολούθως, μετρούμε τον αριθμό των αποικιών σε κάθε τρυβλίο, βρίσκουμε το μέσο όρο για κάθε διάλυση και υπολογίζουμε το CFU/ml αρχικού δείγματος (Colony Forming Units), λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα των 0.1ml που μεταφέρθηκε στην επιφάνεια του κάθε τρυβλίου.

Αποτελέσματα

Αφού παρατηρήσαμε τα τρυβλία διαπιστώσαμε ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων. Το τρυβλίο με αραιώση 10^{-4} gr χώματος ανά ml περιείχε 211 αποικίες βακτηρίων ενώ το άλλο τρυβλίο με αραιώση 10^{-5} gr χώματος ανά ml μετρήσαμε 128 αποικίες βακτηρίων. Ακολούθως παρατήσαμε πολλά κοινά στοιχεία μεταξύ των δυο καλλιιεργειών ως προς το μέγεθος και το σχήμα τους. Είχαν σφαιρικό σχήμα, γυαλιστερή και λεία επιφάνεια καθώς και κίτρινο χρώμα.

Βαρομετρική Περιεχόμενη Υγρασία είναι η περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία και συγκεκριμένα είναι η μάζα του νερού ανά μονάδα μάζας ξηρού χώματος. Προκύπτει από τον τύπο:

$$\theta g = \frac{(m - d)}{d}$$

m: μάζα του νωπού χώματος

d: μάζα του χώματος μετά την αποξήρανση

Με βάση τον παραπάνω τύπο: $\theta g = (28,2 - 7,3) / 7,3 = 2,86$

Για 10 gr νωπού χώματος ,τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, θα έχουμε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο το εξής :

$$\theta g = (10 - d) / d , \text{ όπου } \theta g = 2,86 \text{ άρα}$$

$$2,86 = (10 - d) / d \Rightarrow$$

$$2,86 * d = 10 - d \Rightarrow$$

$$2,86 * d + d = 10 \Rightarrow$$

$$(2,86 + 1) * d = 10 \Rightarrow$$

$$3,86 * d = 10 \Rightarrow$$

$$d = 10 / 3,86 \Rightarrow d = 2,59 \text{ gr}$$

Colony Forming Units (CFUs)= Αριθμός αποικιών στο τρυβλίο * παράγοντες αραιώσης

Στη συνέχεια υπολογίζεται το CFU/gr ξηρού χώματος για το συνολικό αριθμό των βακτηρίων.

- ~~αραιώσης~~ τρυβλίο διαλλείματος 10^{-4} : 211 αποικίες
Άρα :

$$\text{CFUs} / \text{ml} = [211 * (1/10^{-4})] = 211 * 10^4 \text{ ανά ml}$$

- ~~αραιώσης~~ τρυβλίο διαλλείματος 10^{-5} : 128 αποικίες
Άρα :

$$\text{CFUs} / \text{ml} = [128 * (1/10^{-5})] = 128 * 10^5 \text{ ανά ml}$$

- τρυβλίο διαλλείματος 10^{-4} : 211 αποικίες
Άρα :

$$\text{CFUs} / \text{gr} = [211 * (1/10^{-5})] / 2,59 \text{ gr}$$

$$\text{CFUs} / \text{gr} = 8,15 * 10^5$$

- τρυβλίο διαλλείματος 10^{-5} : 128 αποικίες
Άρα :

$$\text{CFUs} / \text{gr} = [128 * (1/10^{-6})] / 2,59 \text{ gr}$$

$$\text{CFUs} / \text{gr} = 4,94 * 10^6$$

$$\text{CFU/gr} = \text{Μέσος Όρος} = (8,15 \cdot 10^5 + 4,94 \cdot 10^6) / 2$$

$$= 2,87 \cdot 10^6$$

Συζήτηση

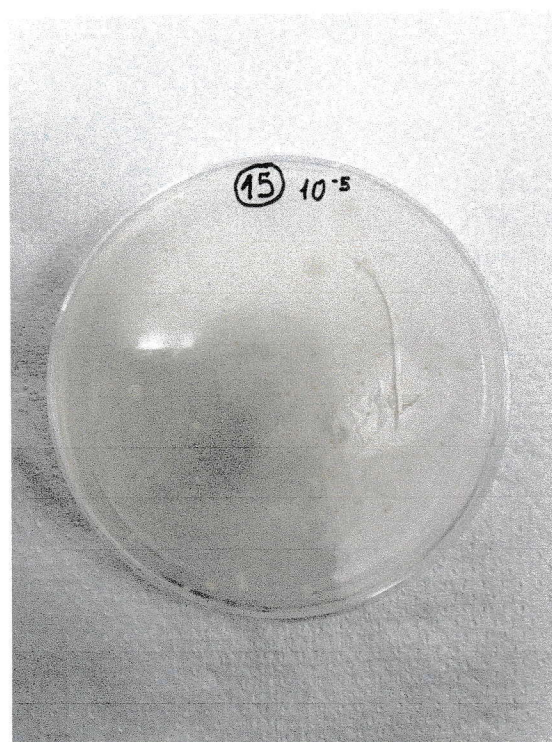
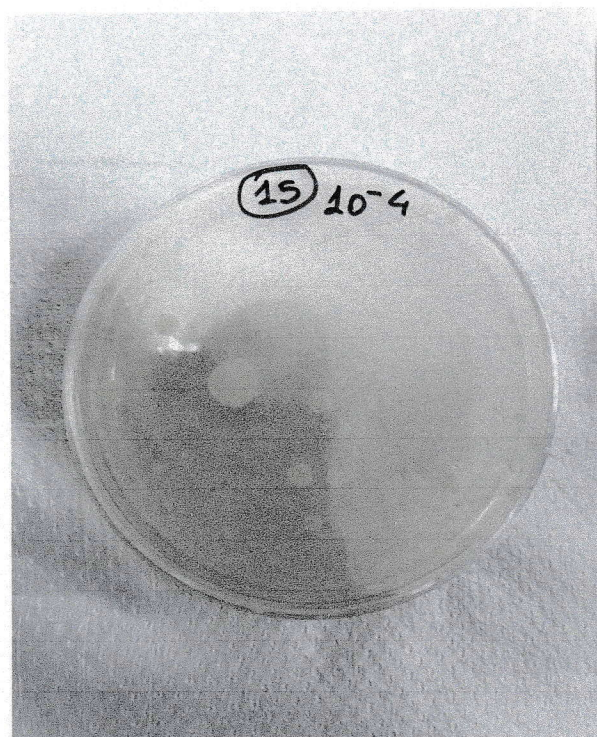
Μέσα από την εργαστηριακή άσκηση καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα. Αναλυτικότερα διαπιστώσαμε ότι τα δυο τρυβλία με της καλλιέργειες των βακτηρίων είχα κοινά χαρακτηρίστηκα όπως ήδη προαναφέραμε. Αυτό οφείλετε στο γεγονός ότι προέρχονται από το ίδιο διάλυμα. Η διάφορα μεταξύ των δυο τρυβλίων βρίσκεται στο αριθμό των αποικιών, συγκεκριμένα το τρυβλίο διαλύματος 10^{-4} μετρήθηκαν 211 αποικίες βακτηρίων ενώ στο τρυβλίο με αραιώση 10^{-5} 128 αποικίες βακτηρίων.

Συγκρίνοντας τα τρυβλία, αυτό με τον μικρότερο βαθμό διάλυσης παρατηρήσαμε ότι το CFU(αριθμός αποικιών) που είναι της τάξης μεγέθους της δύναμης του 10 μικρότερη από το άλλο τρυβλίο δηλαδή $8,15 \cdot 10^5 \text{gr}$ και $4,94 \cdot 10^6 \text{gr}$ αντίστοιχα. Αυτό απορρέει από τις διαφορετικές αραιώσεις των διαλυμάτων δηλαδή όσο πιο μικρή είναι η περιεκτικότητα τόσο πιο μικρός είναι ο αριθμός των αποικιών ανά γραμμάριο ξηρού χώματος. Τέλος ο μέσος των δύο διαλυμάτων ανέρχεται σε $2,87 \cdot 10^6$

Παράλληλα η βαρομετρική περιεχομένη υγρασία $\theta g = \frac{(m-d)}{d}$ των τρυβλίων είναι ίση με $\theta g = 2,86$ αυτό μας αποδεικνύει την ύπαρξη υγρασίας στις καλλιέργειες μας. Στα 10 gr χώματος που χρησιμοποιήσαμε σύμφωνα με τους υπολογισμούς μας τα 2,59 gr θα είναι η μάζα του χώματος μετά την αποξήρανση του. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως ότι τα τελικά αποτελέσματα αναφέρονται σε ξηρό έδαφος καθώς η περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία διαφέρει ανάλογα με την περιοχή και τις χρονική περίοδο λήψης του κάθε δείγματος.(1)

Τέλος, η παρουσία βακτηρίων στο έδαφος, το καθιστά γόνιμο καθώς τα βακτήρια αποικοδομούν οργανική ύλη όπως σάκχαρα, πρωτεΐνες και αμινοξέα απελευθερώνοντας στο έδαφος, θρεπτικά στοιχεία όπως άζωτο, φώσφορο

και θείο, καθώς και διοξείδιο του άνθρακα συμβάλλοντας έτσι στην ολοκλήρωση των φυσικών κύκλων του κάθε στοιχείου καθώς και στη συντήρηση και επιβίωση των φυτικών ειδών (2).



Βιβλιογραφία

1. Βουτσινάς, Γεράσιμος: «Βακτήρια: Ένας κόσμος με πολλά πρόσωπα», Περισκόπιο της Επιστήμης, (Μάιος 1997) τεύχος 206
2. Εφαρμοσμένη Οικολογία, Αποκατάσταση βιολογικών συστημάτων (Εδαφική Οικολογία), Αν. Καθηγητής John M. Halley, Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.