



10

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

Ομάδα 15

4^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΥΚΗΤΩΝ

Ημερομηνία : 27 Μαρτίου 2018

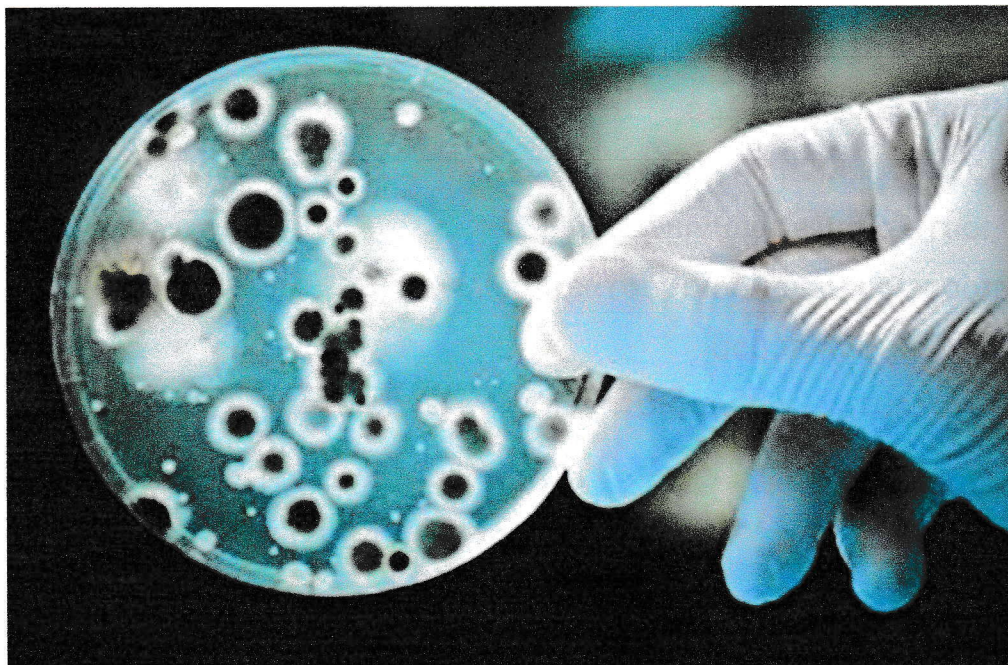
Μέλη: Ευαγγέλου Παναγιώτης

Αυξεντίου Λουκής

Ολύμπιος Πέτρος

Χατζηθανασίου Χρύσω

Κανναβιάς Χρύσανθος



Εισαγωγή

Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι η απομόνωση και η καλλιέργεια μυκήτων με την μέθοδο της τεχνικής επιφανειακής διασποράς. Ως μύκητες ορίζουμε τους ετεροτροφους ευκαριωτικούς οργανισμούς που βρίσκονται σε αφθονία στο έδαφος και συμβάλουν στην διάσπαση της οργανικής ύλης ενώ παράλληλα συμμετέχουν στο κύκλο των θρεπτικών συστατικών. Στο πείραμα μας έγινε αραίωση ενός δείγματος χώματος που περιείχε εκατομμύρια μύκητες. Επιπλέον τοποθετήσαμε τους μύκητες αυτούς σε τρυβλία εμπλουτισμένα με θρεπτικό υλικό (Rose Bengal). Αναλυτικότερα στο θρεπτικό υλικό που έχει εισάχθηκε στρεπτομυκίνη προς αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων, τα οποία θα μπορούσα να επηρεάσουν την καλλιέργεια.

Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν τα ακόλουθα:

- 31,5 gr χώματος
- Εργαστηριακός ζυγός
- Τρυβλία με άγαρ (pentone-yeast)
- Αποστειρωμένο νερό
- Στρεπτομυκίνη
- Αποστειρωμένη κωνική φιάλη
- Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Κρίκοι εμβολιασμού
- Υδατόλουτρο, για να διατηρείται το άγαρ στους 45°C

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 περιεχομένη 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 αποστερημένο σιφώνιο στο σωλήνα που περιέχει τα 9 ml νερού και έτσι έχουμε 10^{-2} gr ανά ml. Τέλος με τον ίδιο τρόπο δημιουργούμε της ~~αραιώσεων~~ συγκεντρώσεις 10^{-3} , 10^{-4} και 10^{-5} gr χώματος ανα ml. Ακολούθως προετοιμάζουμε δυο διαφορετικά τρυβλία για κάθε μια από τις διαλύσεις 10^{-4} και 10^{-5} στα όποια τοποθετούμε θρεπτικό υλικό (Rose Bengal) με στρεπτομυκίνη. Στην συνέχεια τοποθετούμε τα τρυβλία Petri γυρισμένα ανάποδα σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία δωματίου για μια εβδομάδα, ούτως ώστε να εξετάσουμε προσεκτικά όλα τα τρυβλία με αποτέλεσμα να παρατηρήσουμε διαφορές ως προς το μέγεθος και το σχήμα των αποικιών. Τέλος μετρήσαμε τον αριθμό των αποικιών σε κάθε τρυβλίο, εξάγαμε τον μέσο ορό για κάθε διύλιση και υπολογίσαμε το CFU/ ml αρχικού δείγματος καθώς και το CFU/gr ξηρού χώματος.

Αποτελέσματα

Αφού παρατηρήσαμε τα τρυβλία διαπιστώσαμε ένα μεγάλο αριθμό μυκήτων. Το τρυβλίο με αραιώση 10^{-4} gr χώματος ανά ml περιείχε 65 αποικίες βακτηρίων ενώ το άλλο τρυβλίο με αραιώση 10^{-5} gr χώματος ανά ml μετρήσαμε 6 αποικίες βακτηρίων. Ακολούθως παρατήσαμε πολλά κοινά

στοιχειά μεταξύ των δυο καλλιεργειών ως προς το μέγεθος και το σχήμα τους. Είχαν σφαιρικό σχήμα, γυαλιστερή και λεία επιφάνεια καθώς και κίτρινο, άσπρο, πράσινο 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: $\theta g = (21,5 - 6,8) / 6,8 = 2,16$

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

$\theta g = (10 - d) / d$, όπου $\theta g = 2,16$ άρα

$$2,16 = (10 - d) / d \Rightarrow$$

$$2,16 * d = 10 - d \Rightarrow$$

$$2,16 * d + d = 10 \Rightarrow$$

$$(2,16 + 1) * d = 10 \Rightarrow$$

$$3,16 * d = 10 \Rightarrow$$

$$d = 10 / 3,16 \Rightarrow d = 3,16 \text{ gr}$$

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

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

- τρυβλίο διαλλείματος 10^{-4} : 65 αποικίες

Άρα :

$$\text{CFUs / ml} = [65 \cdot (1/10^{-4})] = 65 \cdot 10^4 \text{ ανά ml}$$

- τρυβλίο διαλλείματος 10^{-5} : 6 αποικίες

Άρα :

$$\text{CFUs / ml} = [6 \cdot (1/10^{-5})] = 6 \cdot 10^5 \text{ ανά ml}$$

- τρυβλίο διαλλείματος 10^{-4} : 65 αποικίες

Άρα :

$$\text{CFUs/ gr} = [65 \cdot (1/10^{-4})] / 3,16 \text{ gr}$$

$$\text{CFUs/ gr} = 2,05 \cdot 10^5$$

- τρυβλίο διαλλείματος 10^{-5} : 6 αποικίες

Άρα :

$$\text{CFUs/ gr} = [6 \cdot (1/10^{-5})] / 3,16 \text{ gr}$$

$$\text{CFUs/ gr} = 1,89 \cdot 10^5$$

Επομένως

~~Μέσος Όρος:~~ $\text{CFU/gr} = (2,05 \cdot 10^5 + 1,89 \cdot 10^5) / 2$

$$= 1,97 \cdot 10^5$$

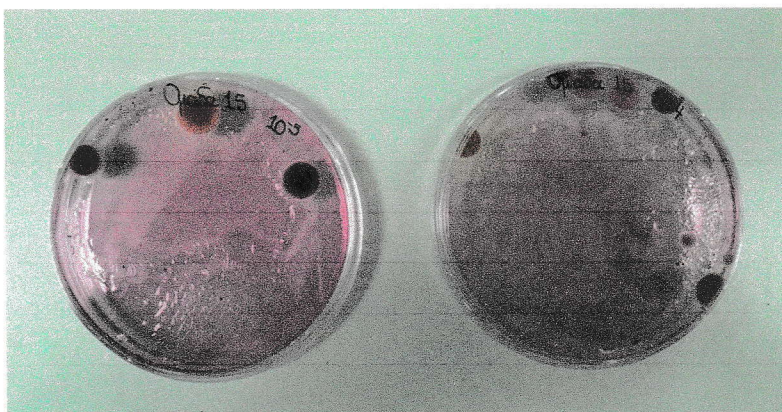
Συζήτηση

Μελετώντας τα τρυβλία οδηγηθήκαμε στα πιο κάτω συμπεράσματα. Παρατηρήσαμε καλλιέργειες μυκήτων με τα ίδια χαρακτηρίστηκα και στα δυο τρυβλία κάτι το οποίο οφείλετε στο ότι προέρχονται από το ίδιο αρχικό διάλυμα. Ακολούθως παρατηρήσαμε τις παρακάτω διαφορές. Στο πρώτο τρυβλίο (διάλυμα 10^{-4}) μετρήθηκαν 65 αποικίες ενώ στο δεύτερο τρυβλίο (διάλυμα 10^{-5}) μετρήθηκαν 6 αποικίες. Στο διάλυμα με συγκέντρωση 10^{-4} παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός αποικιών καθώς η συγκέντρωση χώματος είναι μεγαλύτερη.

Η βαρομετρική υγρασία των τρυβλίων, $[Θg=(m-d)/d]$, ισούται με 2,16, κάτι το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη υγρασίας στις καλλιέργειες. Λόγω της ύπαρξης υγρασίας, παρατηρούνται διαφορετικοί χρωματισμοί στις αποικίες. Το CFUs/gr για το διάλυμα 10^{-4} ανέρχεται σε $2.05 \cdot 10^5$ ενώ για το διάλυμα 10^{-5} ανέρχεται σε $1.89 \cdot 10^5$. Τέλος ο μέσος των δύο διαλυμάτων ανέρχεται σε $1,97 \cdot 10^5$.

Τα τελικά αποτελέσματα των αναλύσεων, αναφέρονται σε ξηρό έδαφος. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι η υγρασία του εδάφους διαφέρει ανάλογα με τη τοποθεσία αλλά και με τη χρονική περίοδο που λαμβάνονται τα δείγματα. Για αυτό το λόγο, η μελέτη γίνεται με δείγματα ξηρού χώματος, στα οποία η υγρασία και το μάζα παραμένουν σταθερά.

1) Το δείγμα χώματος που λήφθηκε, μπορεί να θεωρηθεί γόνιμο καθώς η παρουσία των μυκήτων συμβάλλει στην αποικοδόμηση των οργανικών ουσιών. Οι μύκητες έχουν την δυνατότητα να διασπούν σύνθετα οργανικά μόρια όπως λιγνίνη και κυτταρίνη, μόρια τα οποία δεν μπορούν να διασπαστούν από βακτήρια. Έτσι με τη διάσπαση των σύνθετων οργανικών μορίων, οι μύκητες και τα βακτήρια ανοργανοποιούν τις διάφορες οργανικές ουσίες που υπάρχουν στο έδαφος, ελευθερώνοντας θρεπτικά στοιχεία όπως άζωτο, φώσφορο και θείο καθώς και διοξείδιο του άνθρακα. Έτσι το έδαφος καθίσταται γόνιμο.



Βιβλιογραφία

1) Εφαρμοσμένη Οικολογία, Αποκατάσταση βιολογικών συστημάτων (Εδαφική Οικολογία), Αν. Καθηγητής John M. Halley, Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.