

ΕΚΦΕ ΛΕΥΚΑΔΑΣ

9 ΜΑΙΟΥ 2015



**Βασικά στοιχεία της
μικροβιολογίας του νερού**

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. Δημήτριος Χ. Λάζαρης
Βιολόγος – Ιχθυολόγος
Εκπαιδευτικός Μέσης Εκπαίδευσης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	3
ΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	4
Σύντομη περιγραφή του μικροσκοπίου.....	5
Πως χρησιμοποιούμε το μικροσκόπιο	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	9
Πρωτόζωα.....	10
Μύκητες	10
Βακτήρια.....	11
Ιοί.....	12
Εισαγωγή στην ρύπανση και μόλυνση των υδάτων	12
Μικροβιολογική ποιότητα υδάτινων πόρων	13
Τρόποι αντιμετώπισης μόλυνσης.....	16
Ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην απολύμανση.....	17
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	18
Όργανα και συσκευές μικροβιακών καλλιιεργειών	19
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ	22
ΑΣΚΗΣΗ 1. Μικροσκοπική παρατήρηση μόνιμου παρασκευάσματος βακτηρίων	22
ΑΣΚΗΣΗ 2. Καλλιέργεια Βακτηρίων	24
ΑΣΚΗΣΗ 3. Απομόνωση E. coli και Enterococcus	30
Βιβλιογραφία	31
Ένθετο	32

Πρόλογος

Η ανάπτυξη της Βιολογικής επιστήμης και η επέκταση της γνώσης γύρω από τα φαινόμενα της ζωής βασίζονται στην άμεση παρατήρηση που λαμβάνει χώρα σε ένα πείραμα. Η Βιολογία ως δυναμική επιστήμη επιδιώκει να μελετήσει την δομή και λειτουργία των οργανισμών σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο καθώς επίσης και τις σχέσεις των οργανισμών με το περιβάλλον τους. Σε σχολικό επίπεδο ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η συμβολή της Βιολογίας στην πρακτικο-βιωματική γνώση κατά την μαθησιακή διαδικασία η οποία βοηθά τους μαθητές να κατανοήσουν τις βασικές έννοιες της Βιολογίας, να αποκτήσουν σημαντικές δεξιότητες (εμπειρία στην χρήση οργάνων και συσκευών, γνώσεις σε βασικές εργαστηριακές τεχνικές) και καθώς επίσης να γνωρίσουν την συμβολή της πειραματικής έρευνας στην ανάπτυξη της επιστήμης της Βιολογίας.

Το περιεχόμενο του σεμιναρίου έχει διαμορφωθεί ώστε να εξυπηρετεί δύο σκοπούς: να παρέχει βασικές γνώσεις στους συναδέλφους γύρω από τον μικρόκοσμο των οργανισμών με απλουστευμένες ορολογίες για καλύτερη αφομοίωση και κατανόηση και να τους εξοικειώσει με βασικές εργαστηριακές τεχνικές Βιολογίας που χρησιμοποιούνται και στο σχολείο.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υπεύθυνο του ΕΚΦΕ του νομού Λευκάδας κο **Χόρτη Σπύρο** που μου δίνει την δυνατότητα συμμετοχής στην επιμόρφωση συναδέλφων μου και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του για την διεξαγωγή του σεμιναρίου.

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Χ. ΛΑΖΑΡΗΣ
Διδάκτωρ Φυσιολογίας
Βιολόγος - Ιχθυολόγος

ΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



Το **μικροσκόπιο** είναι ένα εργαλείο που βοηθά να δούμε μικρά αντικείμενα, που με γυμνό μάτι είναι αόρατα, είναι δηλαδή μικρότερα του 0,1mm. **Με το οπτικό μικροσκόπιο μπορούμε να δούμε μικρά αντικείμενα μεγέθους 1000μm - 0,1μm.** Για μικρότερα αντικείμενα χρησιμοποιούμε άλλους τύπους μικροσκοπιών. *Τι θα μπορούσαμε να ορίσουμε σήμερα ως μικροσκόπιο; Οποιαδήποτε συσκευή που μπορεί να δώσει καλύτερη διακριτική ικανότητα από το ανθρώπινο μάτι που είναι 0,2 mm.* Τέτοιες συσκευές είναι εκτός από τα κλασικά πλέον οπτικά και ηλεκτρονικά μικροσκόπια και διάφορες διατάξεις ψηφιοποίησης εικόνας,

πολλές από τις οποίες έχουμε στο σπίτι μας, όπως ένας σαρωτής ή μια ψηφιακή φωτογραφική μηχανή υψηλής ανάλυσης.


Η καλή μικροσκόπηση εξαρτάται από τρεις παράγοντες

- την **διακριτική ικανότητα** του μικροσκοπίου (η "ικανότητα" του μικροσκοπίου να δείχνει δύο πολύ κοντινά σημεία ως δύο καθαρά ξεχωριστά σημεία),
- την **μεγέθυνση** του μικροσκοπίου (δείχνει πόσες φορές μπορεί το μικροσκόπιο να μεγεθύνει το είδωλο του αντικειμένου) και
- την **αντίθεση** ανάμεσα στα μέρη του αντικειμένου (τα μέρη του αντικειμένου γίνονται διακριτά δηλαδή ορατά όταν υπάρχει επαρκής αντίθεση μεταξύ τους ενώ σε περίπτωση που οι βιολογικές δομές είναι πολύ διαφανείς, η αντίθεση ενισχύεται με την χρήση χρωστικών)

Σύντομη περιγραφή του μικροσκοπίου

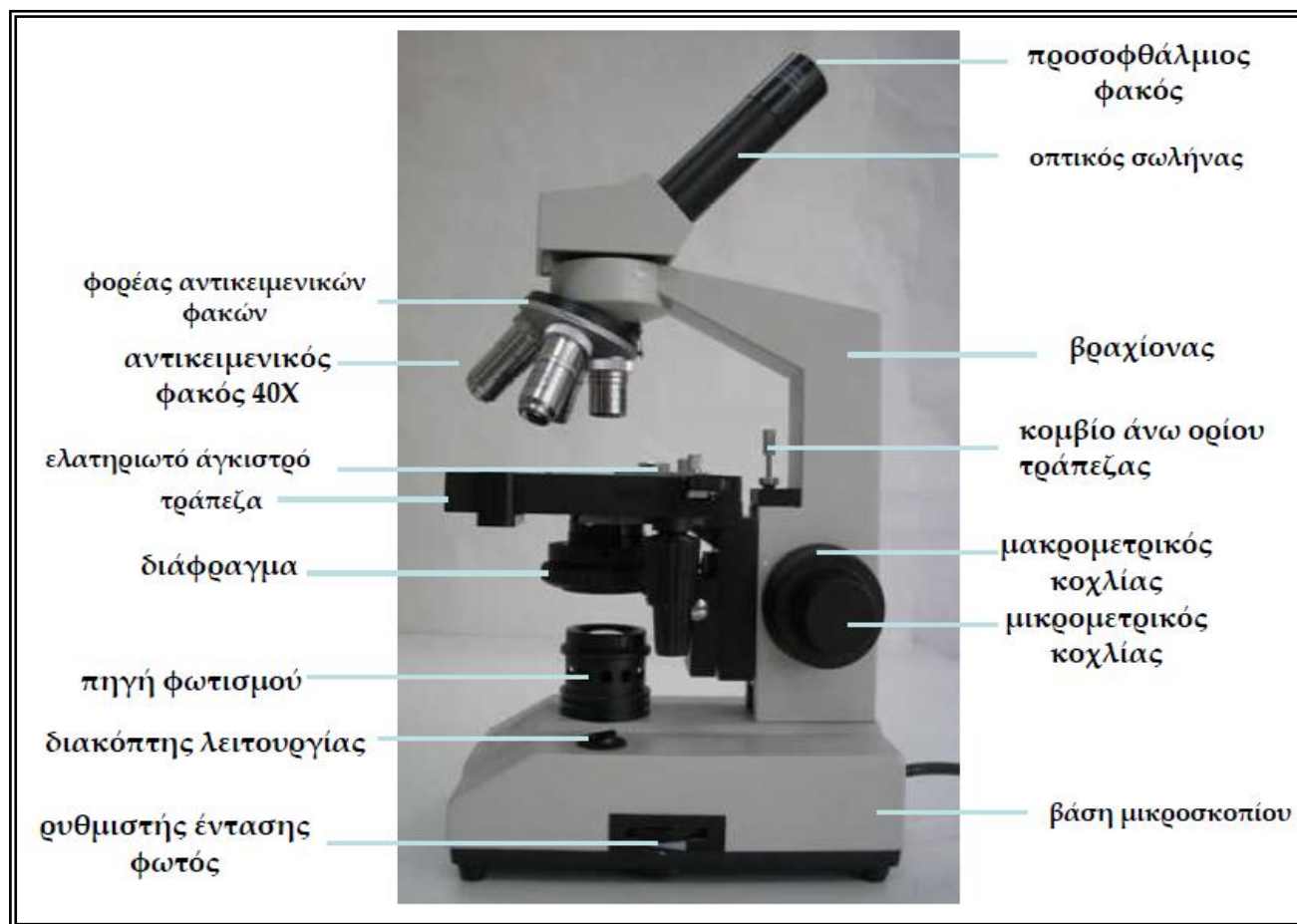
- **Προσοφθάλμιο σύστημα (10X)**. Ρόλος του είναι η μεγέθυνση του ειδώλου του αντικειμένου.
- **Αντικειμενικοί φακοί (4X, 10X, 40X, 100X)**. Μεγεθύνουν και αναλύουν το είδωλο του αντικειμένου. Είναι προσαρμοσμένοι σε περιστρεφόμενη βάση, ώστε ο χρήστης να τους αλλάζει εύκολα.

Κλίμακα μικροσκοπίου



Μεγέθυνση μικροσκοπίου	Μεγάλη υποδιαίρεση	Μικρή υποδιαίρεση
<i>X40</i>	<i>111μ</i>	<i>22μ</i>
<i>X100</i>	<i>44μ</i>	<i>8,9μ</i>
<i>X400</i>	<i>11μ</i>	<i>2,2μ</i>

- **Τράπεζα εργασίας**. Τοποθετούμε πάνω σ' αυτήν το παρασκεύασμα. Περιλαμβάνει ειδικούς βραχίονες για τη στήριξη της αντικειμενοφόρου και κοχλίες για την μετακίνηση της αντικειμενοφόρου πλάκας.
- **Σύστημα φωτισμού**. Χρησιμεύει στο να φωτίζει το αντικείμενο. Περιλαμβάνει λυχνία αλογόνου (6V, 20W), συγκεντρωτικό σύστημα φακών που εστιάζει το φως στο παρασκεύασμα, υποδοχή για φίλτρα και διάφραγμα που ρυθμίζει το εύρος της φωτεινής δέσμης.
- **Κοχλίες εστίασης**. Είναι δύο: ο **μακρομετρικός** για την ανεύρεση του αντικειμένου και ο **μικρομετρικός** για την βελτίωση της εικόνας.



Πώς χρησιμοποιούμε το μικροσκόπιο

1. Τοποθετούμε στην **τράπεζα του μικροσκοπίου** την **αντικειμενοφόρο πλάκα** με το παρασκεύασμα. Στην τράπεζα του μικροσκοπίου η αντικειμενοφόρος πλάκα πρέπει να είναι με την **καλυπτρίδα** προς τα επάνω.
2. Θα πρέπει να προσέξουμε το αντικείμενο, που θα παρατηρήσουμε, να βρίσκεται επάνω ακριβώς από την οπή που έχει η τράπεζα.
3. Ασφαλίζουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα επάνω στην τράπεζα χρησιμοποιώντας το ειδικό για το σκοπό αυτό **πίεστρο** που βρίσκεται στη δεξιά πλευρά της τράπεζας.
4. Ανοίγουμε τη **φωτεινή πηγή** του μικροσκοπίου.
5. Γυρίζουμε τον **περιστρεφόμενο δίσκο** προκειμένου να τοποθετήσουμε σε θέση μικροσκόπησης τον πιο μικρό αντικειμενικό φακό (αυτόν που δίνει την πιο μικρή μεγέθυνση). Προσέχουμε ώστε να τοποθετήσουμε το φακό με ακρίβεια στον οπτικό άξονα.
6. Μετακινούμε την τράπεζα πολύ αργά επάνω ή κάτω και προσεκτικά χρησιμοποιώντας τον **μακρομετρικό κοχλία** του μικροσκοπίου για να τοποθετήσουμε μέσα στο οπτικό πεδίο μας το αντικείμενο παρατηρώντας από τον **προσοφθάλμιο φακό**. Για μεγαλύτερη ευκρίνεια του παρασκευάσματος κινούμε το **μικρομετρικό κοχλία** με πολύ απαλές κινήσεις για εστίαση.

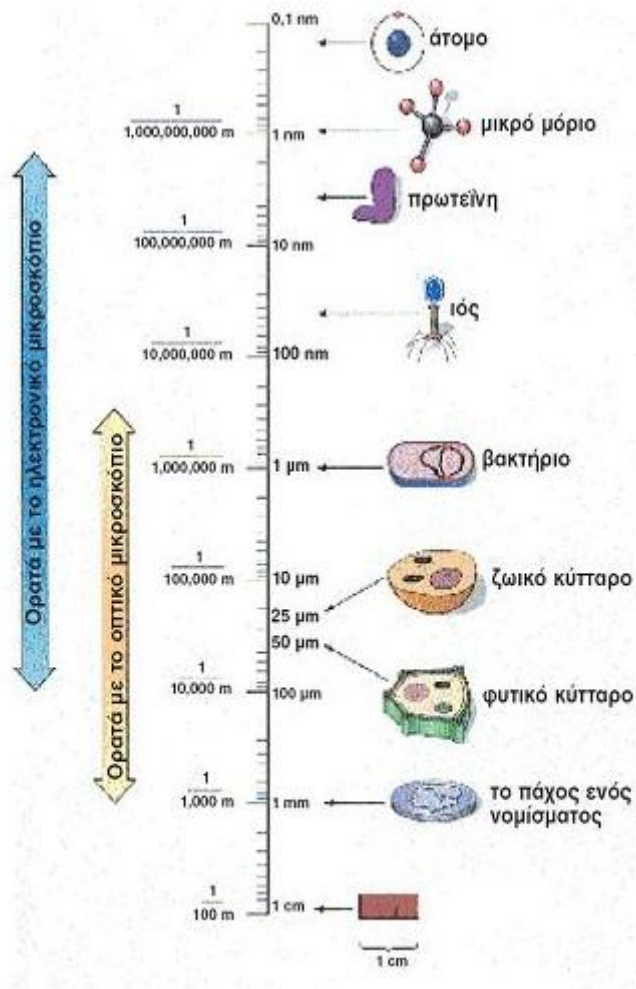
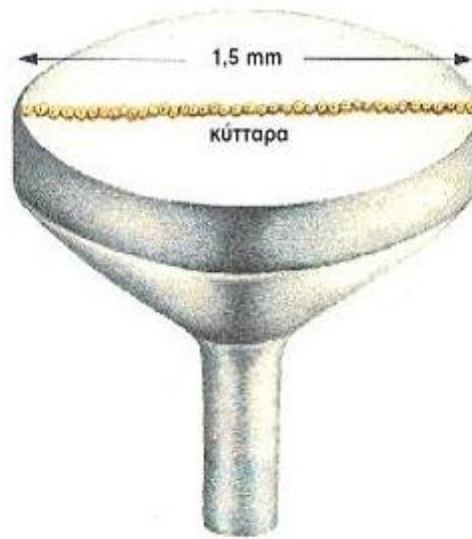
7. Στην περίπτωση που δε βρίσκουμε το αντικείμενο στο οπτικό μας πεδίο μετακινούμε αργά και προσεκτικά την αντικειμενοφόρο πλάκα επάνω στην τράπεζα παρατηρώντας από τον προσοφθάλμιο φακό.

8. Μόλις εντοπίσουμε το αντικείμενο, στερεώνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα στην τράπεζα χρησιμοποιώντας το πίεστρο που βρίσκεται στο αριστερό της μέρος. Ίσως χρειαστεί να εστιάσουμε και πάλι με τη βοήθεια του μικρομετρικού κοχλία.

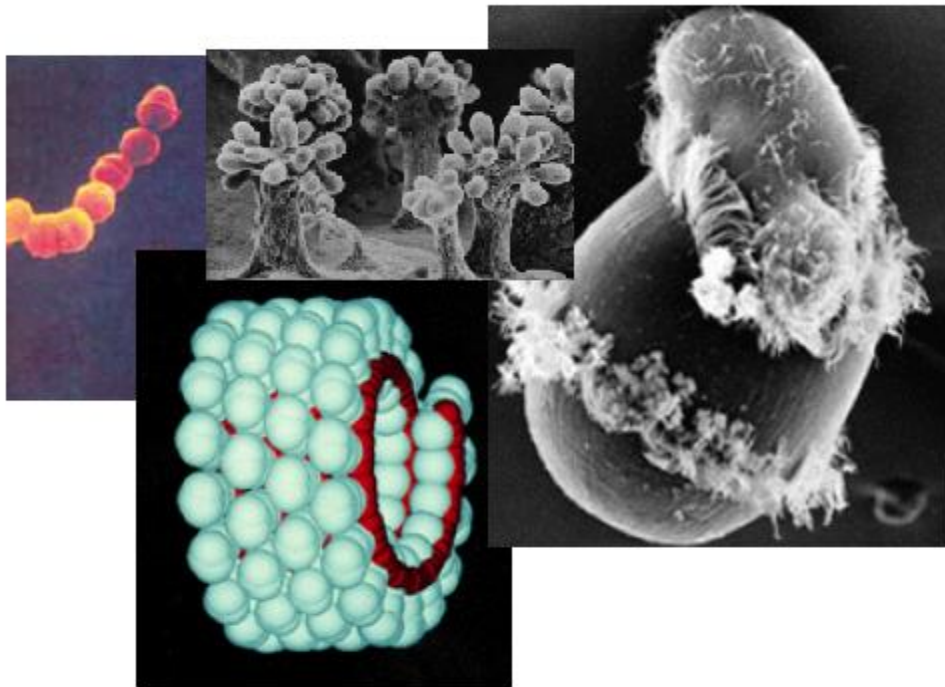
9. Στην περίπτωση που το οπτικό πεδίο είναι είτε πολύ φωτεινό είτε πολύ σκοτεινό, **ρυθμίζουμε το φωτισμό με το διάφραγμα.**

11. Αν χρειαστεί να παρατηρήσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια το τμήμα του παρασκευάσματος φέρνουμε στη θέση μικροσκόπησης το φακό με την αμέσως μεγαλύτερη μεγέθυνση. Εστιάζοντας και πάλι χρησιμοποιώντας μόνον το μικρομετρικό κοχλία.

12. **Όταν τελειώσουμε τις παρατηρήσεις μας,** σβήνουμε τη φωτεινή πηγή, αφαιρούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα από το μικροσκόπιο και αφήνουμε το μικροσκόπιο με τον πιο μικρό φακό του **στη θέση μικροσκόπησης.**



ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ



Οι **μικροοργανισμοί** είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί που δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι διότι έχουν μέγεθος μικρότερο από 0,1 mm. Υπάρχουν σε όλα τα περιβάλλοντα όπως στο έδαφος, στο νερό, στον αέρα, σε διάφορα υποστρώματα (τρόφιμα, αντικείμενα κλπ) καθώς επίσης μπορούν να συμβιώνουν ή να παρασιτούν σε άλλους οργανισμούς. Μπορεί να έχουν ευεργετικό ρόλο (να χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο για παραγωγή χρήσιμων ουσιών σε διάφορους τομείς όπως υγεία και διατροφή) ή να είναι επιβλαβείς (να προκαλούν ασθένειες). Αν και εξαιρετικά μικροί, οι μικροοργανισμοί έχουν μια εξαιρετική ποικιλία σε μορφές και μεγέθη. Διακρίνονται σε 4 βασικές ομάδες:

- **πρωτόζωα** (ευκαρυωτικοί οργανισμοί),
- **μύκητες** (ευκαρυωτικοί οργανισμοί),
- **βακτήρια** (προκαρυωτικοί οργανισμοί),
- **ιοί** (ακυτταρικές ή μη αυτοτελείς μορφές ζωής).

Πρωτόζωα. Τα πρωτόζωα είναι **μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί**. Τα περισσότερα αναπαράγονται μονογονικά με διχοτόμηση. Κινούνται είτε σχηματίζοντας



ψευδοπόδια όπως η **αμοιβάδα** (του διπλανού σχήματος) είτε με τις βλεφαρίδες ή τα μαστίγια που διαθέτουν. Πολλά από αυτά τρέφονται από άλλους μικροοργανισμούς ή με διαλυμένες ουσίες του περιβάλλοντός τους. Υπάρχουν πολλές ομάδες **παθογόνων πρωτόζωων** όπως το **πλασμώδιο** που μεταδίδεται από τα κουνούπια και προκαλεί **ελονοσία**, το **τρυπανόσωμα** που μεταδίδεται από τη μύγα τσετσέ και προκαλεί την **ασθένεια του ύπνου**, η **ιστολυτική αμοιβάδα** που προκαλεί την

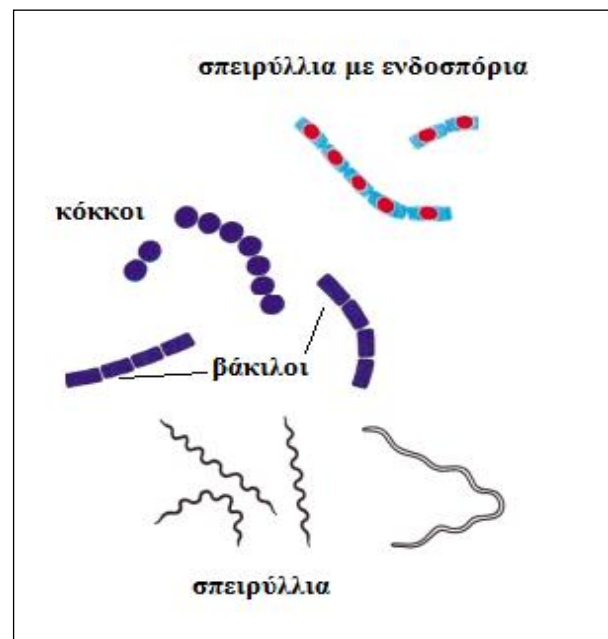
αμοιβαδοειδή δυσεντερία κλπ.

Μύκητες. Πρόκειται για **ευκαρυωτικούς μονοκύτταρους** (πχ ζύμες) ή **πολυκύτταρους οργανισμούς** (πχ μούχλα). Οι περισσότεροι αποτελούνται από απλούστερες νηματοειδείς δομές, τις **υφές**. Αναπαράγονται μονογονικά με **διχοτόμηση** ή **εκβλάστηση**. Επίσης σχηματίζουν **σποριάγγεια** που παράγουν σπόρους με τους οποίους διαδίδονται μέσω του αέρα στα τρόφιμα και σε άλλα περιβάλλοντα (έδαφος, νερό). Ζουν ως **ελεύθεροι** οργανισμοί τρεφόμενοι από οργανικό υλικό που αποσυντίθεται ή **παρασιτούν** σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς

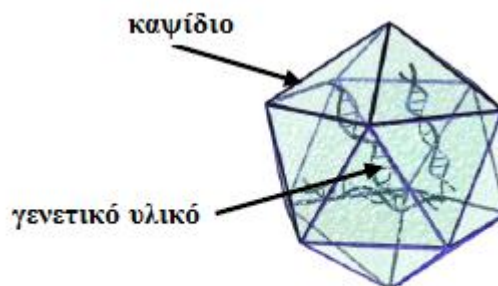


προκαλώντας σοβαρές ασθένειες (πχ τα **δερματόφυτα** προσβάλλουν το τριχωτό της κεφαλής και τις μεσοδακτύλιες περιοχές των ποδιών). Υπάρχουν βέβαια και **ευεργετικά** ή **αβλαβή στελέχη** (πχ ο μύκητας του γένους *Penicillium* παράγει το αντιβιοτικό πενικιλίνη και ο μύκητας του γένους *Agaricus* χρησιμοποιείται για βρώση).

Βακτήρια. Είναι **προκαρυωτικοί, μονοκύτταροι οργανισμοί**, δηλαδή δε διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα και μεμβρανώδη οργανίδια. Συνήθως σχηματίζουν αθροίσματα, τις **αποικίες**. Το σχήμα τους μπορεί να είναι ελικοειδές (**σπειρύλλια**), σφαιρικό (**κόκκοι**) ή ραβδοειδές (**βάκιλοι**). Το γενετικό τους υλικό (DNA) έχει την μορφή ενός και μοναδικού χρωμοσώματος που βρίσκεται κατά κανόνα σε μια συγκεκριμένη περιοχή την **πυρηνική περιοχή** (ή **πυρηνοειδές**). Συχνά διαθέτουν, επιπλέον, μικρότερα μόρια γενετικού υλικού, τα **πλασμίδια** που τους προσδίδουν **ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά**. Τα κύτταρά τους περιβάλλονται από ένα **κύτταρικό τοίχωμα**. Επίσης ορισμένα στελέχη φέρουν ένα επιπλέον προστατευτικό περιβλημα την **κάψα**. Άλλα βακτήρια διαθέτουν **βλεφαρίδες** ή **μαστιγία**. Σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως ακραίες τιμές θερμοκρασιών ή παρουσία ακτινοβολιών, πολλά βακτήρια μετατρέπονται σε ανθεκτικές μορφές, τα **ενδοσπόρια**. Τα ενδοσπόρια είναι αφυδατωμένα κύτταρα με ανθεκτικά τοιχώματα και χαμηλούς μεταβολικούς ρυθμούς. Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος ξαναγίνουν ευνοϊκές, τα ενδοσπόρια βλαστάνουν δίνοντας το καθένα ένα βακτήριο. Πολλά από τα βακτήρια ευθύνονται για σοβαρές ασθένειες (πχ σύφιλη, πνευμονία, χολέρα κλπ).



ΙΟΙ. Έχουν το μικρότερο μέγεθος από τις άλλες ομάδες μικροοργανισμών και σχετικά απλή δομή. Αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα με χαρακτηριστική γεωμετρία, το **καψίδιο**, μέσα στο οποίο προφυλάσσεται το γενετικό τους υλικό που είναι είτε **DNA** είτε **RNA**. Ορισμένοι ιοί διαθέτουν και ένα επιπλέον περίβλημα, το **έλυτρο**, το οποίο είναι **λιποπρωτεϊνικής φύσης**. Οι ιοί για να πολλαπλασιαστούν χρειάζονται τους μηχανισμούς των κυττάρων - ξενιστών τους (οργανίδια και διάφορα ένζυμα) και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως **υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα**. Στις ιώσεις, τα νοσήματα δηλαδή που προκαλούνται από ιούς, περιλαμβάνονται απλές διαταραχές της υγείας, όπως είναι το κρυολόγημα ή η γρίπη, αλλά και σοβαρότερες, όπως είναι η πολιομυελίτιδα ή το AIDS.



Εισαγωγή στην ρύπανση και μόλυνση των υδάτων

Το υδατικό δυναμικό του πλανήτη μας (1,4 τρισεκατομμύρια κυβικά χιλιόμετρα) είναι απόλυτα συνυφασμένο με την ύπαρξη της ζωής σε όλες τις μορφές του και αποτελεί κοινή περιουσία διάθεσης για τον καθένα μας. Σύμφωνα με εκτιμήσεις η πλειονότητα του νερού είναι το θαλασσινό νερό, περίπου το 97,4%. Από το υπόλοιπο το περισσότερο (2% περίπου) είναι σε στερεή κατάσταση (πάγος). Λιγότερο επομένως από το 1% είναι διαθέσιμο γλυκό νερό.

Το νερό ως χημική ένωση είναι ακίνδυνο αρκεί όμως να μην είναι μολυσμένο (παθογόνοι μικροοργανισμοί ή προϊόντα τους) και ρύπους (επικίνδυνες χημικές ουσίες ή μέταλλα). Κάθε χρόνο τουλάχιστον 5.000.000 άνθρωποι, κυρίως γυναίκες και παιδιά, χάνουν την ζωή τους από λοιμώξεις που οφείλονται στην πόση ρυπασμένου ή μολυσμένου νερού. Σύμφωνα με τον ορισμό που υιοθετεί ο ΟΗΕ, "**Ρύπανση** θεωρείται η εισαγωγή από τον άνθρωπο στο περιβάλλον άμεσα ή έμμεσα ουσιών και ενέργειας με αποτέλεσμα βλαπτικές συνέπειες στους ζώντες οργανισμούς, κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, παρεμπόδιση των δραστηριοτήτων που γίνονται στη θάλασσα, στις λίμνες και στα ποτάμια (συμπεριλαμβανομένης και της αλιείας), υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων προς χρήση και για ψυχαγωγικούς σκοπούς". Οι κυριότεροι ρυπαντές των υδάτων μπορούν να καταταγούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- 1. Παθογόνοι μικροοργανισμοί** (βακτήρια, πρωτόζωα, παρασιτικοί σκώληκες και ιοί που προέρχονται από ακατέργαστα ή μερικώς κατεργασμένα απόβλητα ή λύματα ανθρώπων και ζώων).
- 2. Απόβλητα απαιτούντα οξυγόνο** (οργανικές ουσίες που βιοαποικοδομούνται από τους μικροοργανισμούς παρουσία οξυγόνου).

3. **Ανόργανες ενώσεις** (βαρέα μέταλλα όπως πχ Cu, Zn, Pb, Cd, Co, Ni, Cr από γεωργικές δραστηριότητες, υφαλοχρώματα, νερά έκπλυσης δρόμων από βροχές, απορρυπαντικά, οικιακά λύματα, διάφορα χρώματα, κ.ά.).
4. **Υδρογονάνθρακες** (πετρελαιοειδή).
5. **Συνθετικές οργανικές ενώσεις** (απορρυπαντικά, τα ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα, προωθητικά, παραπροϊόντα κατεργασίας πετρελαίου).
6. **Αιωρούμενα στερεά** (σωματίδια δυσδιάλυτων υλικών που προέρχονται από τη φυσική αποσάθρωση του εδάφους, την εξαλλοίωση των πετρωμάτων, από εξορύξεις αλλά και από τα υγρά απόβλητα).
7. **Ραδιενεργά υλικά** (στερεά που απομένουν κατά την εξόρυξη του ουρανίου, έκλυση ραδιοϊσοτόπων κατά τις δοκιμές των πυρηνικών όπλων, χρήση των ραδιενεργών υλικών για παραγωγή ενέργειας για θεραπευτικές, βιομηχανικές και λοιπές εφαρμογές, ατυχήματα στους πυρηνικούς αντιδραστήρες).
8. **Απορρίμματα** (σκουπίδια πάσης φύσεως όπως πχ πλαστικές και γυάλινες φιάλες, κατεστραμμένα αντικείμενα, κουτιά, κ.ά.).
9. **Θερμότητα** (απόβλητα εργοστασίων παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας, διυλιστηρίων).

Μικροβιολογική ποιότητα υδάτινων πόρων

Εδώ και πολλά χρόνια τα ύδατα αποτελούν αποδέκτες εκκρίμάτων ανθρώπων ή θερμόαιμων ζώων και μπορούν να είναι αιτίες ενοχλητικών έως και σοβαρών ασθενειών για τον άνθρωπο. Τα εκκρίματα αυτά κυρίως περιλαμβάνουν περιπτώματα που θεωρούνται γενικά ως ο μεγαλύτερος κίνδυνος για την υγεία του ανθρώπου, καθώς είναι πιο πιθανόν να περιέχουν εντερικούς παθογόνους οργανισμούς. Επίσης τα ζώα μπορεί να λειτουργήσουν ως δεξαμενή για μια ποικιλία εντερικών παθογόνων οργανισμών.



Οι παθογόνοι μικροβιακοί παράγοντες που εμπλέκονται συνήθως στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών είναι βακτήρια, ιοί και πρωτόζωα (με βάση τους παρακάτω πίνακες).

Σημαντικά **Βακτήρια** του Πόσιμου Νερού

	Σημασία για την υγεία	Κύρια οδός έκθεσης	Αντοχή στο νερό	Αντοχή στο χλώριο	Σχετική μολυσματική δόση
Campylobacter jejuni, C.coli	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΙΚΡΗ	ΜΙΚΡΗ	ΜΕΣΗ
Παθογόνο E.coli	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΕΣΗ	ΜΙΚΡΗ	ΥΨΗΛΗ
Salmonella typhi	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΕΣΗ	ΜΙΚΡΗ	ΥΨΗΛΗ
άλλες salmonellae	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΑΚΡΑ	ΜΙΚΡΗ	ΥΨΗΛΗ
Vibrio cholera	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΙΚΡΗ	ΜΙΚΡΗ	ΜΕΣΗ
Shigella spp.	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΙΚΡΗ	ΜΙΚΡΗ	ΥΨΗΛΗ
Yersinia enterocolitica	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΑΚΡΑ	ΜΙΚΡΗ	ΥΨΗΛΗ ?
Legionella	ΜΕΣΗ	ΑΝΑΠΝ	Μ.ν.Π	ΜΕΣΗ	ΥΨΗΛΗ
Pseudomonas aeruginosa	ΜΕΣΗ	ΕΠΑΦΗ, *	Μ.ν.Π	ΜΕΣΗ	ΥΨΗΛΗ ?
Aeromonas	ΜΕΣΗ	ΣΤΟΜΑ, ΕΠΑΦΗ	Μ.ν.Π	ΜΙΚΡΗ	ΥΨΗΛΗ ?
Mycobacterium	ΜΕΣΗ	ΑΝΑΠΝ, ΕΠΑΦΗ	Μ.ν.Π	ΥΨΗΛΗ	? ?

Σημαντικοί **Ιοί** του Πόσιμου Νερού

	Σημασία για την υγεία	Κύρια οδός έκθεσης	Αντοχή στο νερό	Αντοχή στο χλώριο	Σχετική μολυσματική δόση
Adenoviruses	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ, ΑΝΑΠΝ, ΕΠΑΦΗ	?	ΜΕΣΗ	ΜΙΚΡΗ
Enteroviruses	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΑΚΡΑ	ΜΕΣΗ	ΜΙΚΡΗ
Ηπατίτιδα Α	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	?	ΜΕΣΗ	ΜΙΚΡΗ
Έντερικά μεταδιδόμενη ηπατίτιδα non-A non-B ιοί, ηπατίτιδα Ε	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	?	?	ΜΙΚΡΗ
Norwalk virus	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	?	?	ΜΙΚΡΗ
Rotavirus	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	?	?	ΜΕΣΗ
Μικροί στρογγυλοί ιοί	ΜΕΣΗ	ΣΤΟΜΑ	?	?	ΜΙΚΡΗ ?

Σημαντικά Πρωτόζωα του Πόσιμου Νερού

	Σημασία για την υγεία	Κύρια οδός έκθεσης	Αντοχή στο νερό	Αντοχή στο χλώριο	Σχετική μολυσματική δόση
<i>Entamoeba histolytica</i>	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΕΣΗ	ΥΨΗΛΗ	ΜΙΚΡΗ
<i>Giardia intestinalis</i>	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΕΣΗ	ΥΨΗΛΗ	ΜΙΚΡΗ
<i>Cryptosporidium parvum</i>	ΥΨΗΛΗ	ΣΤΟΜΑ	ΜΑΚΡΑ	ΥΨΗΛΗ	ΜΙΚΡΗ ?
<i>Acanthamoeba</i>	ΜΕΣΗ	ΕΠΑΦΗ, ΑΝΑΠΝ	Μ.ν.Π	ΥΨΗΛΗ	?
<i>Naegleria</i>	ΜΕΣΗ	ΕΠΑΦΗ	Μ.ν.Π	ΜΕΣΗ	ΜΙΚΡΗ
<i>Balantidium coli</i>	ΜΕΣΗ	ΣΤΟΜΑ	?	ΜΕΣΗ	ΜΙΚΡΗ ?

Μ.ν.Π = Μπορεί να Πολλαπλασιαστεί

* = κατάποση από άτομα με μειωμένη ανοσία

? = άγνωστο ή αβέβαιο

Οι ασθένειες που μπορεί να προκαλέσουν κυμαίνονται από ελαφρά γαστρεντερίτιδα έως σοβαρή διάρροια, δυσεντερία, ηπατίτιδα, τυφοειδή πυρετό. Η μόλυνση του πόσιμου νερού με κοπρανώδους προέλευσης ρύπους είναι μία μόνο πιθανή οδός μετάδοσης τέτοιων ασθενειών από έναν άνθρωπο σε άλλον ή από ζώα στον άνθρωπο. Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί συνήθως προκαλούν ασθένειες όχι από την στοματική οδό αλλά όταν το νερό που τα περιέχει χρησιμοποιείται για πλύσιμο ή για αναψυχή που περιλαμβάνει επαφή με το νερό. Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να προκαλέσουν μόλυνση με την αναπνοή, όταν ευρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση σε σταγονίδια νερού σαν αυτά που παράγονται στους καταιονιστήρες (ντουζ), στα συστήματα ύγρανσης των κλιματιστικών και στα συστήματα άρδευσης με καταιονισμό.

Υπάρχουν επίσης ορισμένοι οργανισμοί που υπάρχουν φυσικά στο υδάτινο περιβάλλον, και γενικά δεν θεωρούνται παθογόνοι, αλλά περιστασιακά μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες. Όταν τέτοιοι οργανισμοί υπάρχουν στο πόσιμο νερό μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα σε άτομα που έχουν τοπικά ή γενικά μειωμένο το φυσικό μηχανισμό άμυνας του οργανισμού. Τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να είναι πολύ ηλικιωμένα ή πολύ νεαρά άτομα, ασθενείς που παίρνουν θεραπεία αναστολής της ανοσίας και άτομα που πάσχουν από AIDS. Νερό που χρησιμοποιείται για πόση ή καθαριότητα και περιέχει τους οργανισμούς αυτούς σε μεγάλο αριθμό μπορεί να προκαλέσει διάφορες μολύνσεις στα άτομα αυτά. Τέτοιοι οργανισμοί είναι *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Legionella*, *Aeromonas*. Ορισμένοι από αυτούς τους οργανισμούς, όπως οι *Legionella* και *Aeromonas* μπορεί να προσβάλλουν και απολύτως υγιή άτομα όταν έχουν την ευκαιρία να αναπτυχθούν σε εξαιρετικά μεγάλο αριθμό μέσα στο νερό.

Επειδή η απομόνωση και ο προσδιορισμός των παθογόνων βακτηριδίων, παρασίτων και ιών που υπάρχουν στο νερό είναι χρονοβόρα και πιθανόν επικίνδυνη, χρησιμοποιούνται κατάλληλοι οργανισμοί δείκτες για τον εντοπισμό πιθανών εντερικών παθογόνων. Οι δείκτες αυτοί είναι:

1. Ολικά κολοβακτηριοειδή (*total coliforms*). Τα βακτήρια αυτά δεν προέρχονται μόνο από τα κόπρανα των ανθρώπων και των ζώων αλλά και από το περιβάλλον όπως το χώμα και τα φυτά.

2. Κολοβακτηρίδια κοπράνων (*fecal coliforms*). Έχουν προέλευση τον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων και η *Escherichia coli* (κολοβακτηρίδιο) συνιστά ένα τυπικό μέλος της ομάδας αυτής των μικροοργανισμών.

3. Στρεπτόκοκκοι κοπράνων (*fecal streptococci*). Πρόκειται για μια ομάδα μικροοργανισμών που αποτελείται από είδη που βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων. Περιλαμβάνει τα είδη *Streptococcus bovis*, *S. avium*, *S. gallinarum*, *S. equinus*, αλλά και τα είδη *S. faecium* & *S. faecalis* που συναντώνται συχνότερα στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Οι στρεπτόκοκκοι κοπράνων που ανήκουν στα είδη *S. gallinarum*, *S. equinus*, *S. faecium* & *S. Faecalis* συνιστούν μια υποομάδα που ονομάζεται εντερόκοκκοι.

4. Εντερόκοκκοι (*enterococci*). Απομονώνονται από κόπρανα ανθρώπων και ζώων. Ο *E. faecalis* βρίσκεται φυσιολογικά στο παχύ έντερο και στην ουρογεννητική οδό. Η κατανομή του *E. faecium* είναι παρόμοια με αυτή του *E. faecalis*, αλλά απαντάται λιγότερο συχνά.

Οι δείκτες αυτοί επελέγησαν γιατί είναι γενικά παρόντες στο νερό που περιέχει παθογόνα, επιζούν περισσότερο στο νερό, είναι ακίνδυνοι και αναπτύσσονται, απομονώνονται και προσδιορίζονται εύκολα.

Τρόποι αντιμετώπισης μόλυνσης

Η παρουσία των διαφόρων μικροοργανισμών στο υδάτινο μέσον πολλές φορές ευνοείται από το ουδέτερο pH του νερού, την παρουσία οργανικής και ανόργανης ύλης (φώσφορος, άζωτο) που μπορούν να αποτελέσουν θρεπτικά υποστρώματα για την βιοσύνθεση και ανάπτυξη τους. Επειδή το μέγεθος των μικροοργανισμών είναι πολύ μικρό, πολλές φορές δεν απομακρύνονται από το νερό με τις διάφορες τεχνικές φυσικοχημικών διεργασιών (καθίζηση, διήθηση) και έτσι δεν διασφαλίζεται πλήρως η ποιότητα των υδάτων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την **απολύμανση** (= διαδικασία κατά την οποία μειώνεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών σε ανεκτικά επίπεδα και δεν

επιηρεάζονται τα όρια ποσιμότητας του νερού). Τα μέσα της απολύμανσης ανάλογα τη φύση τους διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στα μη χημικά και στα χημικά όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΜΗ ΧΗΜΙΚΑ ΜΕΣΑ	ΧΗΜΙΚΑ ΜΕΣΑ	
	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ΜΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ
υπεριώδης ακτινοβολία	αέριο χλώριο	μεθυλενοδιθειοκυάνιο
αποστειρωτική διήθηση	υποχλωριώδες νάτριο	διβρωμονιτριλοπροπιοναμίδιο
θερμότητα	διοξείδιο του χλωρίου	ισοθειαζολόνες
ραδιενεργός ακτινοβολία	βρώμιο	
	ιώδιο	
	υπεροξείδιο του υδρογόνου	
	όζον	

Ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην απολύμανση

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις βασικές ομάδες με βάση την ανθεκτικότητά τους στα μέσα απολύμανσης οι οποίοι είναι (σε φθίνουσα σειρά):

- σπόρια βακτηρίων,
- πρωτόζωα,
- ιοί,
- βακτήρια.

Η σχετική αντίσταση στην απολύμανση σχετίζεται με την οργάνωση της κυτταρική τους δομής, στις αρχικές συγκεντρώσεις των απολυμαντικών ουσιών αλλά στην ευαισθησία τους στα διάφορα μέσα απολύμανσης. Σε πολλές περιπτώσεις τα βακτήρια υπερτερούν σε αριθμό των ιών και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών και για αυτό το λόγο τα βακτήρια περιλαμβάνονται τυπικά στους κανονισμούς της ποιότητας των νερών σαν ο μόνος δείκτης της μικροβιολογικής ποιότητας.

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ






Οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν, υπό εργαστηριακές συνθήκες, θα πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλες ελεγχόμενες συνθήκες που προωθούν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης τους. Οι βασικότεροι παράγοντες που λαμβάνουν χώρα είναι:


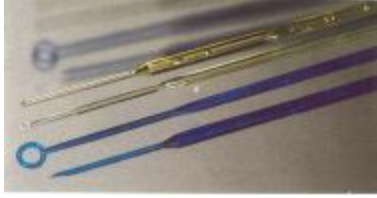
- τα **θρεπτικά υλικά**. Πρόκειται για μίγματα διαφόρων ουσιών που προσφέρουν τις ευνοϊκές συνθήκες για τη διατροφή και πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών *in vitro*. Από τη μεταβολική τους δραστηριότητα τα μικρόβια αλλοιώνουν το θρεπτικό υπόστρωμα και μεταβάλλουν την αρχική του όψη (θόλωση, διάσπαση σακχάρων, μεταβολή pH κλπ) λαμβάνοντας πολύτιμα στοιχεία για τις ιδιότητες γενικά της εκάστοτε ομάδας μικροοργανισμών.
- η **κατάλληλη θερμοκρασία**. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασίες από 20 έως 45° C. Για παράδειγμα, η *Escherichia coli*, (βακτήριο της μικροχλωρίδας του εντέρου μας) ζει άριστα σε θερμοκρασία 37° C.
- ο **ατμοσφαιρικός αέρας με παρουσία ή απουσία οξυγόνου**. Το οξυγόνο μπορεί να βοηθήσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών

Όργανα και συσκευές μικροβιακών καλλιιεργειών

Για την περάτωση βιολογικών και μικροβιολογικών ασκήσεων στο σχολικό περιβάλλον απαιτούνται διάφορα βασικά όργανα και συσκευές τα οποία είναι:

	<p>Ηλεκτρονικός Ζυγός. Χρησιμοποιούνται για την ακριβή ζύγιση θρεπτικών υλικών αντιδραστηρίων και άλλων υλικών.</p>
	<p>Υδατόλουτρο. Η συσκευή αυτή λειτουργεί για την διατήρηση δειγμάτων χημικού ή βιολογικού υλικού μέσα σε θερμαινόμενο νερό του οποίου ελέγχεται η θερμοκρασία ανάλογα με τα επιθυμητά επίπεδα.</p>
	<p>Μικροσκόπιο. Πρόκειται για το οπτικό όργανο που μεγεθύνει αντικείμενα που δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι μέσω του μεγεθυντικού του συστήματος.</p>

	<p>Τρυβλία petri. Είναι στρογγυλά (ή τετράγωνα πλαστικά δοχεία για την τοποθέτηση στερεού υποστρώματος ανάπτυξης μικροοργανισμών.</p>
	<p>Ποτήρια ζέσεως. Γυάλινα ποτήρια διαφόρων μεγεθών, με συγκεκριμένο όγκο, για την διάλυση χημικών ουσιών.</p>
	<p>Μεταλλικό τρίποδο με πλέγμα αμιάντου (αριστερά) και λύχνος Bunsen (δεξιά). Το μεταλλικό τρίποδο και το πλέγμα χρησιμεύουν για να στερεωθεί το ποτήρι ζέσεως με το διάλυμα ώστε να θερμανθεί από την φλόγα του λύχνου που θα βρίσκεται από κάτω.</p>
	<p>Αντικειμενοφόρες πλάκες. Ορθογώνια παραλληλόγραμμα, γυάλινα πλακάκια επάνω στα οποία επιστρώνονται τα βιολογικά δείγματα. Καλυπτρίδες. Πολύ λεπτές τετράγωνες γυάλινες πλάκες που καλύπτουν το βιολογικό δείγμα της αντικειμενοφόρου πλάκας.</p>
	<p>Σιφώνια Pasteur. Πλαστικοί σωλήνες με ευρύ άκρο (ελαστικό πουάρ) που βοηθά στην αναρρόφηση και λήψη υγρών δειγμάτων.</p>
	<p>Δοκιμαστικοί σωλήνες σε μεταλλικό στατώ. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες είναι κυλινδρικοί γυάλινοι σωλήνες καθορισμένης διαμέτρου στους οποίους τοποθετούνται διαλύματα ή υγρά θρεπτικά υποστρώματα και στερεώνονται με τα στατώ (μεταλλικοί ή πλαστικοί υποδοχείς για δοκιμαστικούς σωλήνες).</p>

	<p>Πλαστικοί υδροβολείς. Πλαστικές φιάλες αποιονισμένου νερού.</p>
	<p>Κρικοφόροι στυλεοί. Σύρματα από ειδικό μέταλλο ή λευκόχρυσο που καταλήγουν σε έναν κρίκο λήψης μικροβιακού δείγματος και εμβολιασμού θρεπτικών υλικών.</p>

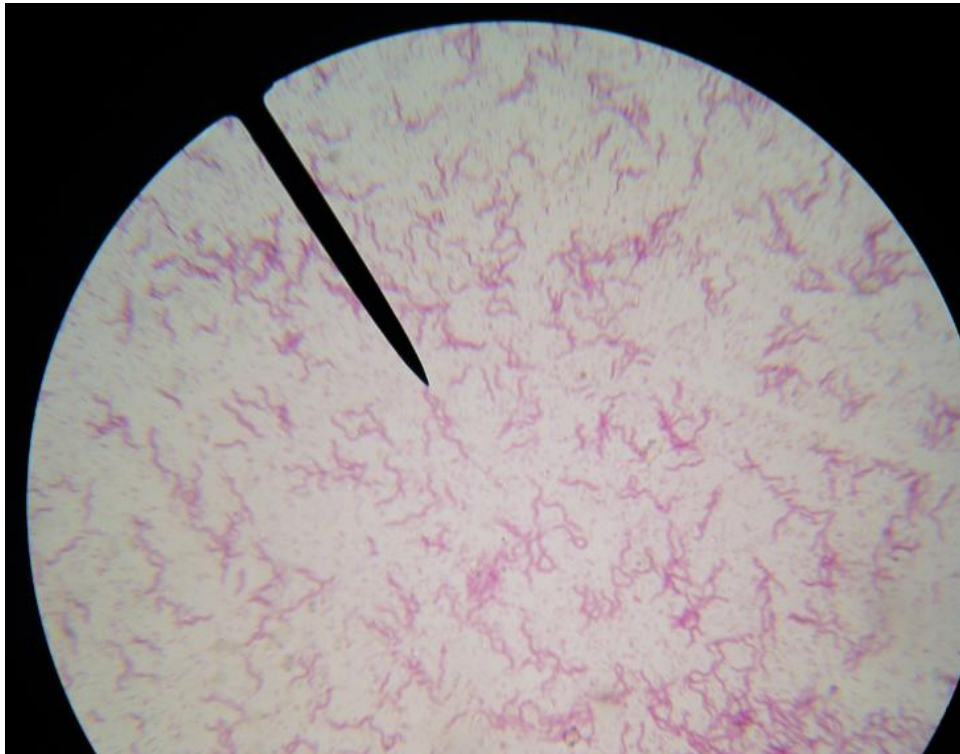
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΑΣΚΗΣΗ 1: Μικροσκοπική παρατήρηση μόνιμου παρασκευάσματος βακτηρίων

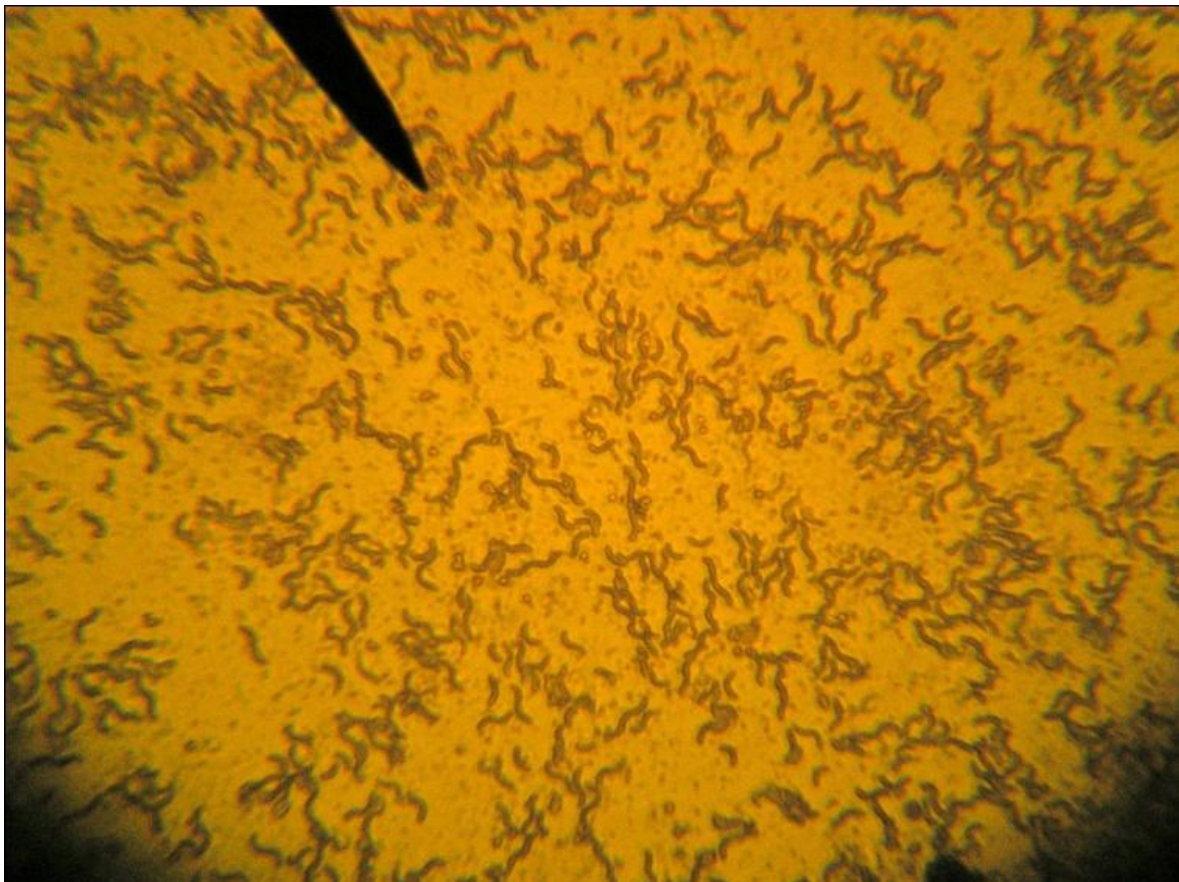
Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί (χωρίς πυρήνα) μικροοργανισμοί που ταξινομούνται στα βασίλεια των **ευβακτηρίων** και των **αρχαιοβακτηρίων**. Τα ευβακτήρια είναι το γνωστότερα: Ζουν στο χώμα και σε ζωντανούς οργανισμούς. Παίζουν μοναδικό και θεμελιώδη ρόλο στην συνολική διαχείριση των οργανικών και ανόργανων υλικών της βιόσφαιρας, ως αποικοδομητές, αλλά ευθύνονται και για αρκετές ασθένειες. Τα αρχαιοβακτήρια είναι ικανά να ζουν στις πλέον αντίξοες συνθήκες, όπως είναι το πολύ αλμυρό νερό, η ηφαιστειακή λάβα και οι θερμές όξινες ηφαιστειακές πηγές, αλλά και το όξινο αναερόβιο περιβάλλον του στομάχου.

Το βακτηριακό κύτταρο περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα το οποίο περιβάλλει την κυτταρική μεμβράνη. Το κυτταρόπλασμα του δεν παρουσιάζει κάποια εμφανή οργάνωση (δεν έχει μεμβρανώδη κυτταρικά οργανίδια). Αναπαράγεται με διχοτόμηση διαιρούμενο στα δύο και σε ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να διπλασιάζεται κάθε 20 λεπτά. Το σχήμα τους, η χημική και η γενετική τους σύσταση ποικίλουν ευρύτατα. Μπορεί να είναι σφαιρικά, ραβδοειδή ή σπειροειδή και να έχουν βλεφαρίδες ή μαστιγία. Μπορεί να χρησιμοποιούν το οξυγόνο (αερόβια) ή όχι (αναερόβια). Χρησιμοποιούν ως τροφή οποιαδήποτε οργανική ύλη, από ξύλο μέχρι πετρέλαιο. Επίσης χρησιμοποιούν και ανόργανες ουσίες, όπως CO₂, N₂, H₂S, κλπ.

Η τεχνική της χρώσης κατά Gram των βακτηρίων, επινοήθηκε από τον Δανό μικροβιολόγο Christian Gram (1853-1938). Βασίζεται στην ιδιότητα των βακτηρίων να συγκρατούν (Gram +) ή όχι (Gram -) μία μπλε χρωστική (το κρυσταλλικό ιώδες) μετά από μία ήπια κατεργασία χρωματισμού και αποχρωματισμού. Έτσι μετά την επίδραση της μπλε χρωστικής, τα (Gram +) δεν αποχρωματίζονται όταν επιδράσει επάνω τους οινόπνευμα ή ακετόνη, ενώ τα (Gram -) αποχρωματίζονται και αυτά στη συνέχεια χρωματίζονται κόκκινα από μία άλλη χρωστική (τη σαφρανίνη). Η συμπεριφορά τους αυτή οφείλεται στη σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Τα (Gram -) έχουν πιο πολύπλοκο τοίχωμα και γι' αυτό χρωματίζονται πιο δύσκολα. Η χρώση και η αναγνώριση απαιτούν εμπειρία.



Βακτήρια σάπιου νερού Μεγέθυνση: Χ400



Μόνιμο παρασκεύασμα: Βακτήρια Μεγέθυνση: Χ400

ΑΣΚΗΣΗ 2: Καλλιέργεια βακτηρίων

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου και προκαλούν διάφορες ασθένειες.

Η είσοδος ενός παθογόνου μικροοργανισμού στον οργανισμό ονομάζεται μόλυνση, ενώ η εγκατάσταση και ο πολλαπλασιασμός του λοίμωξη. Η παθογόνος δράση των μικροβίων οφείλεται σε διάφορες ουσίες (τοξίνες) που αυτά παράγουν και οι οποίες προκαλούν βλάβες στον άνθρωπο. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες οργανισμών (ιοί, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα). Πολλά από τα βακτήρια προκαλούν πολύ σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο.

Τα παθογόνα εκκρίματα του ανθρώπινου οργανισμού ενοφθαλμίζονται μέσα σε θρεπτικά υποστρώματα με ποικίλες μεθόδους, ανάλογα με την σύσταση αυτών.

Έτσι η σπορά δείγματος σε στερεό θρεπτικό υλικό, που βρίσκεται σε τρυβλία έχει σαν σκοπό την απομόνωση του παθογόνου μικροβίου, την ταυτοποίησή του και τον έλεγχο της ευαισθησίας του στα αντιβιοτικά (αντιβιογράμματα).

Η καλλιέργεια δειγμάτων μέσα σε ευθείες ή σε ευθείες και κεκλιμένες στήλες ελέγχει την κινητικότητα και τις βιοχημικές ιδιότητες των μικροβίων αντίστοιχα.

Η ανάπτυξη των μικροβίων μέσα στα θρεπτικά υποστρώματα απαιτεί κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας (37°C, σχετική υγρασία 50% για 18-48 ώρες μέσα σε επωαστικό κλίβανο) ή και ατμόσφαιρας (αερόβια επώαση, αναερόβια επώαση, επώαση παρουσία CO₂ μέσα σε ειδικούς επωαστικούς κλιβάνους αερίων ή φιάλες επώασης π.χ. Gas-Pak).

Απαιτούμενα όργανα:

1. Λύχνος υγραερίου, τρίποδας στήριξης, πλέγμα θέρμανσης, αναπτήρας
2. Δύο ποτήρια ζέσεως των 250ml
3. Έξι (6) αποστειρωμένα τρυβλία Petri, μαρκαδόρος
4. Ψηφιακή ζυγαριά
5. Ορθοστάτης, μεταλλικός δακτύλιος, διηθητικό χαρτί, ψαλίδι
6. Γυάλινη ράβδος ανάδευσης, πλαστικό κουταλάκι, θερμομονωτικό γάντι
7. Σύρμα (στυλεός) εμβολιασμού ή ανατομική βελόνα
8. Υδροβολέας με απεσταγμένο νερό ή εμφιαλωμένο νερό

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

1. Άγαρ^[1], (ή ζελέ)
2. Πειπτόνη^[2]
3. Κύβος ζωμού^[3]
4. Χώμα

[1] Άγαρ: παράγεται από ορισμένα φύκη της θάλασσας, τα ροδοφύκη. Δεν αποτελεί τροφή για τα μικρόβια, επειδή δεν διασπάται από τα ένζυμα τους. Χρησιμοποιείται σαν

στερεωτικό των θρεπτικών υλικών επειδή έχει την ιδιότητα να λιώνει στους 80°C και να πήζει σε θερμοκρασία κάτω των 45°C. Μοριακός τύπος άγαρ: (C₁₂H₁₈O₉)_x

[2] Πεπτόνες: είναι προϊόντα διάσπασης πρωτεϊνούχων ουσιών με πρωτεολυτικά ένζυμα. Παρασκευάζονται από διάφορους ζωικούς ιστούς, κυρίως από το κρέας, τα ψάρια, το γάλα, τα σπλάχνα σφαγίων ζώων. Είναι υδατοδιαλυτές και ανθεκτικές στη θέρμανση, δηλαδή δεν αλλοιώνονται με τη θέρμανση κάτω από 100°C.

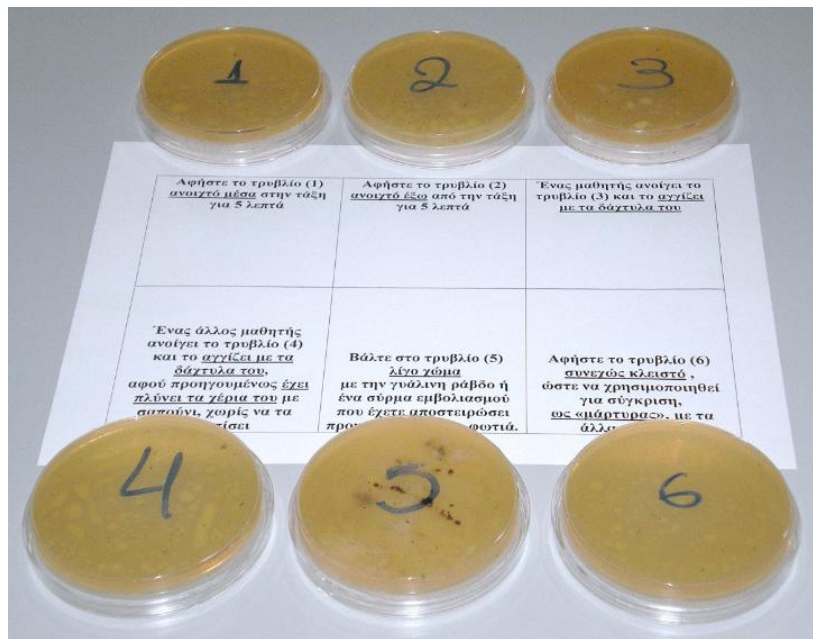
[3] Κύβος ζωμού (εκχύλισμα κρέατος): είναι το προϊόν που παίρνουμε από το βράσιμο κρέατος ή άλλων ιστών σε νερό και τη συμπίκνωση του ζωμού κάτω από ελαττωμένη πίεση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1) Παρασκευάστε το θρεπτικό υλικό ως εξής: Γεμίστε με περίπου 200ml απεσταγμένο (ή εμφιαλωμένο) νερό το ποτήρι ζέσεως των 250ml. Τοποθετήστε το ποτήρι ζέσεως πάνω από το λύχνο υγραερίου και αρχίστε την θέρμανση. Σε ζεστό νερό, περίπου στο σημείο βρασμού του, διαλύστε 3gr άγαρ, 3gr πεπτόνης και έναν κύβο ζωμού σιγά - σιγά υπό συνεχή ανάδευση. Αφήστε το μείγμα να βράσει για λίγα λεπτά. Πριν χρησιμοποιήσουμε το θρεπτικό υλικό απομακρύνουμε με διήθηση τα λίπη και τις πρωτεΐνες που πιθανόν υπάρχουν σ' αυτό.

2) Στη συνέχεια και αφού αρχικά αριθμήσετε τα έξι κλειστά τρυβλία petri (στο κάτω μέρος τους με την βοήθεια ενός μαρκαδόρου - όπως φαίνεται στην παρακάτω φωτογραφία) τοποθετήστε σε αυτά το υγρό θρεπτικό υλικό. Η προσθήκη γίνεται γρήγορα (πιάνοντας το θερμό ποτήρι ζέσεως με τη βοήθεια ενός θερμομονωτικού γαντιού) ανασηκώνοντας λίγο το πλαστικό σκέπασμα των τρυβλίων, τα οποία και κρατάμε σκεπασμένα μέχρι να κρυώσει το θρεπτικό υλικό.

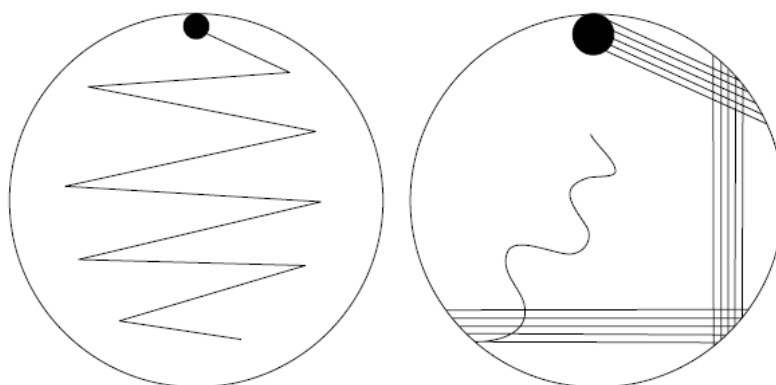
Ο ενδεδειγμένος τρόπος μετάγγισης του θρεπτικού υλικού στα τρυβλία petri είναι με αναμμένο τον λύχνο υγραερίου πάνω στον (καθαρισμένο προηγουμένως με οινόπνευμα) πάγκο εργασίας, δηλαδή κάτω από συνθήκες ασηψίας.



3) Στη συνέχεια κάντε τις εξής ενέργειες (εμβολιασμός) :

- ⇒ Αφήστε το τρυβλίο (1) ανοιχτό μέσα στην τάξη για 5 λεπτά.
- ⇒ Αφήστε το τρυβλίο (2) ανοιχτό έξω από την τάξη για 5 λεπτά.
- ⇒ Βάλτε στο τρυβλίο (3) λίγο ελαιόλαδο δείγματος Α νερού με το στυλεό εμβολιασμού ή την ανατομική βελόνα, αφού προηγουμένως την έχετε αποστειρώσει (ερυθροπυρώσετε) στον λύχνο υγραερίου.
- ⇒ Βάλτε στο τρυβλίο (4) λίγο ελαιόλαδο δείγματος Β νερού με το στυλεό εμβολιασμού ή την ανατομική βελόνα όπως προηγουμένως.
- ⇒ Βάλτε στο τρυβλίο (5) λίγο ελαιόλαδο δείγματος Γ νερού με το στυλεό εμβολιασμού ή την ανατομική βελόνα όπως προηγουμένως.
- ⇒ Αφήστε το τρυβλίο (6) συνεχώς κλειστό, ώστε να χρησιμοποιηθεί για σύγκριση με τα άλλα τρυβλία ως «μάρτυρας».

Δύο τρόποι με τον οποίο μπορούμε να εμβολιάσουμε ένα τρυβλίο, με το στυλεό εμβολιασμού ή την ανατομική βελόνα, φαίνεται στις παρακάτω εικόνες



4) Τοποθετήστε τα τρυβλία σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από το ηλιακό φως.

5) Μετά από 2-3 ημέρες παρατηρήστε σε ποιο από τα αριθμημένα τρυβλία έχουν εμφανιστεί αποικίες βακτηρίων (διακρίνονται σαν στρογγυλοί υπόλευκοι ή κίτρικοι κύκλοι). Εάν οι αποικίες έχουν αναπτυχθεί αρκετά μπορούμε να επιβραδύνουμε το ρυθμό ανάπτυξής τους τοποθετώντας τα τρυβλία μέσα στο ψυγείο. Συνεχίστε να καταγράφετε τις παρατηρήσεις σας για 1-2 εβδομάδες. Παρατηρείτε διαφορές ως προς τον αριθμό και το χρώμα των αποικιών στα διάφορα τρυβλία;

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος πιθανόν να δημιουργηθούν και αποικίες από μύκητες. Για να διακρίνετε τις αποικίες βακτηρίων από αυτές των μυκήτων, αναζητήστε την παρουσία υφών (νημάτων) στις αποικίες των μυκήτων.

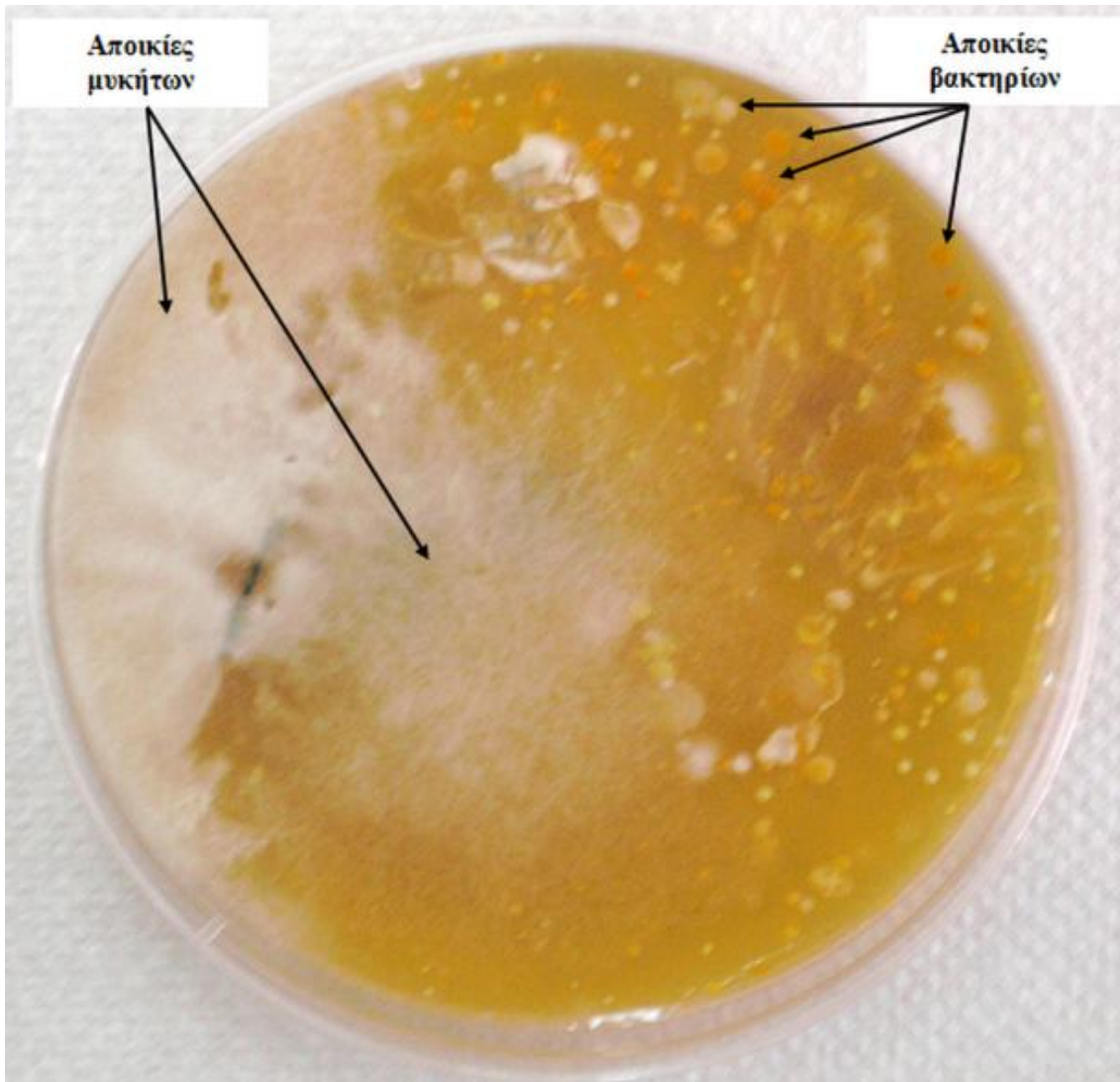
Σημειώσεις: Το θρεπτικό υλικό αποτελεί πηγή θρεπτικών ουσιών για τους μικροοργανισμούς. Διαφορετικοί μικροοργανισμοί χρειάζονται διαφορετικές ομάδες θρεπτικών ουσιών και σε διαφορετικές ποσότητες.

Οι κατηγορίες των θρεπτικών υλικών είναι δύο: η πρώτη, τα χημικώς καθορισμένα, που περιέχουν συγκεκριμένες ποσότητες ανόργανων ή οργανικών ουσιών υψηλής καθαρότητας σε συγκεκριμένη ποσότητα αποσταγμένου νερού. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα χημικώς μη καθορισμένα (σύνθετα) που περιέχουν ουσίες με υψηλή θρεπτική αξία.

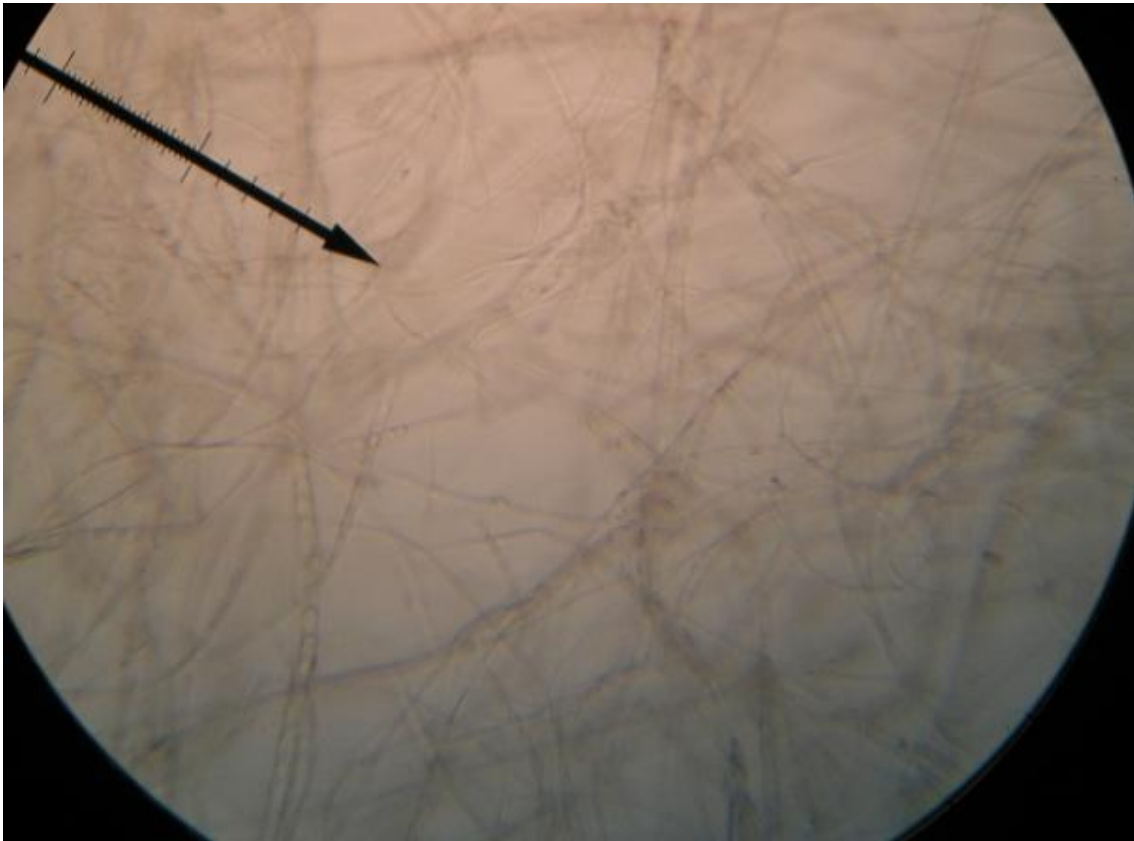
Εάν οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε μη χημικώς καθορισμένο θρεπτικό μέσον, εμφανίζονται αποικίες διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Σε αυτή τη περίπτωση, μπορούμε απλώς να παρατηρήσουμε τον αριθμό, τη μορφή ή το χρώμα των αποικιών που αναπτύσσονται (κυκλική, κυρτή, ακανόνιστου σχήματος, λοβοειδής κλπ) και να συμπεράνουμε ότι πρόκειται για διαφορετικά είδη βακτηρίων.

Για παράδειγμα στην καλλιέργεια που προέρχονται από την επαφή με άπλυτα χέρια, ο αριθμός των αποικιών περιμένουμε να είναι μεγαλύτερος από αυτόν που προκύπτει από την καλλιέργεια που ακουμπήσαμε τα πλυμένα χέρια.

Να επισημάνουμε ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος και στη συνέχεια της παρατήρησης πρέπει αποφεύγουμε το άσκοπο άνοιγμα των τρυβλίων και την επαφή με την επιφάνεια της καλλιέργειας.



Αποικίες βακτηρίων και μυκήτων



Αποικία μυκήτων στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση Χ400)

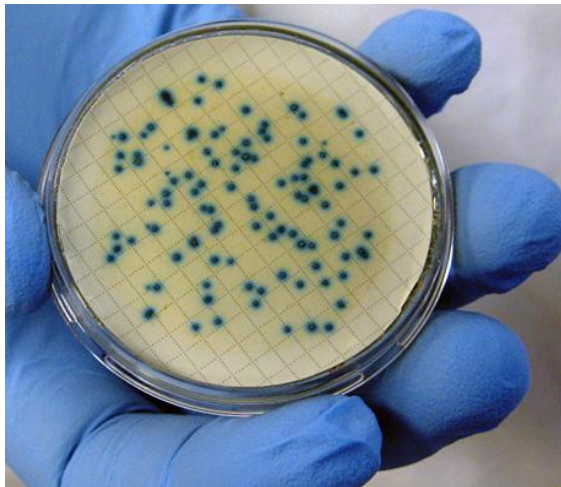
Απαντήστε στις παρακάτω ερωτήσεις:

1. Σε ποιο τρυβλίο αναπτύχθηκαν οι περισσότερες και σε ποιο οι λιγότερες αποικίες; Αιτιολογήστε τις απαντήσεις σας.
2. Ποια είναι η επίδραση του σαπουνιού στην ανάπτυξη των μικροβίων;
3. Ποιος είναι ο λόγος για τον οποίο βράζουμε για μερικά λεπτά το διάλυμα του θρεπτικού υλικού; Τι ρόλο παίζει ο κόβος του ζωμού στο θρεπτικό υλικό;

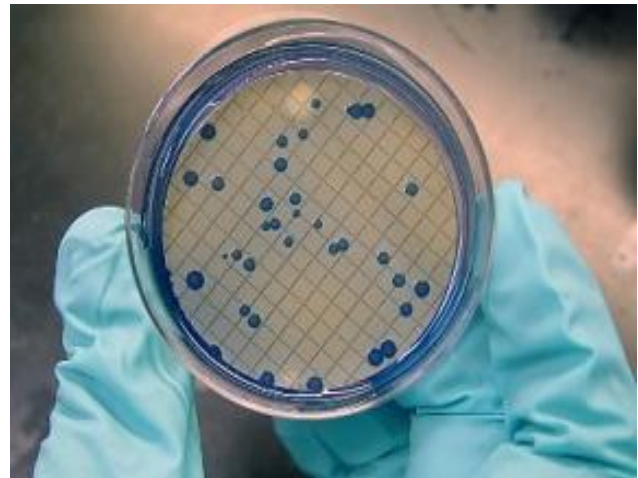
ΑΣΚΗΣΗ 3: Απομόνωση *E. coli* και *Enterococcus* από το νερό

Η απομόνωση των μικροβιακών δεικτών από το νερό περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- **Διήθηση του νερού με μεμβράνη** (0,45 μm, τύπος GN-6 Gelman Sciences) όπου για καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνει χώρα η διαδικασία υπό πίεση,
- **μεταφορά των φίλτρων σε τρυβλία petri** (50 mm) που περιέχουν εκλεκτικά υποστρώματα για τους δείκτες:
E. coli: mFc agar ή Mac Conkey's agar
Enterococcus: Enterococcus agar ή S & B agar (Slanetz & Batley medium),
- **επώαση**
E. coli: για 24 h στους 41,5 °C
Enterococcus: για 48 h στους 37 °C



Entereococcus



E. coli

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βανταράκης Α. (2010). *Μόλυνση του θαλασσινού νερού από παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπτώσεις για τη Δημόσια Υγεία*. Μον. Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας.

Βούτσινος Γ., Κοσμάς Κ., Καλκάνης Γ., Σούτσας Κ. (2014). *Διαχείριση Φυσικών Πόρων*. ΓΙΑ ΜΑΘΗΤΕΣ Β' ΤΑΞΗΣ ΓΕΝΙΚΟΥ ΛΥΚΕΙΟΥ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ. ΠΥΞΙΔΙΟ ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.

Δήμου Δ., Κουτσοτόλη Α., **Λάζαρης Δ.**, Αλαμάνος Ι., Μάϊπα Β. (2005). *Μικροβιακή ποιότητα των παράκτιων νερών κολύμβησης της Πάργας*. 4^ο Συνέδριο της Γερμανο - Ελληνικής Ακαδημίας Βιοϊατρικής Έρευνας, Ιωάννινα.

Ε.Κ.Φ.Ε. Ν. Ευρυτανίας. *Εργαστηριακή διδασκαλία των Φυσικών Μαθημάτων*.

Λάζαρης Δ. (2014). *Εργαστηριακές μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης της ποιότητας του νερού*. Σεμινάριο ΚΠΕ Καρπενησίου 21 & 22 Φεβρουαρίου 2014.

Ε.Κ.Φ.Ε. Ν. Αργολίδας. *Το οπτικό μικροσκόπιο. Χρήση και εφαρμογή*.

Κουτσοτόλη Α., Δήμου Δ., **Λάζαρης Δ.**, Βάσσοσ Δ., Αλαμάνος Ι., Μάϊπα Β. (2005). *Μικροβιακή ποιότητα των παροχών πόσιμου ύδατος στην Βορειο-δυτική Ελλάδα*. 4^ο Συνέδριο της Γερμανο - Ελληνικής Ακαδημίας Βιοϊατρικής Έρευνας, Ιωάννινα.

Λάζαρης Δ. (2011). *Μικροσκόπιο. Ιστορική αναδρομή και εξέλιξη. Η τεχνολογία στην εκπαιδευτική διαδικασία*. Σημειώσεις του μαθήματος Τεχνολογίας για τους μαθητές της Α' Λυκείου.

Λάζαρης Δ., Κουτσοτόλη Α., Δήμου Δ., Κότσης Α., Αλαμάνος Ι., Μάϊπα Β. (2005). *Επιτόπιες υγιεινολογικές επιθεωρήσεις και μικροβιολογικές εξετάσεις σημείων υδροδότησης στην Σαγιάδα*. 4^ο Συνέδριο της Γερμανο - Ελληνικής Ακαδημίας Βιοϊατρικής Έρευνας, Ιωάννινα.

Μαρίνης Ε., Βογιατζάκης Ε., Γκίκα Ε. (2011). *ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ Ι. Β' Τάξη 1^ο κύκλου*. Ειδικότητα Βοηθών Ιατρικών και Βιολογικών εργαστηρίων.

Μινόπετρος Κ. (2005). *Το οπτικό μικροσκόπιο του εργαστηρίου Φυσικών Επιστημών Ενιαίου Λυκείου*.

Οδηγός Εργαστηριακών Ασκήσεων Βιολογίας Γενικής Παιδείας Β' Τάξης Ε.Λ. (ΟΕΔΒ)

Παπαβασιλείου Ι. (1998). *ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑ (ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑ)*. Συμπλήρωμα μαθήματος Μικροβιολογίας Β' Τάξης 1^ο κύκλου.

Σκληβανιώτης Μ. *ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ*. ΔΕΥΑΠ.

Ε Ν Θ Ε Τ Ο