

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 2

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΔΡΑΙΩΣΕΩΝ**

ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

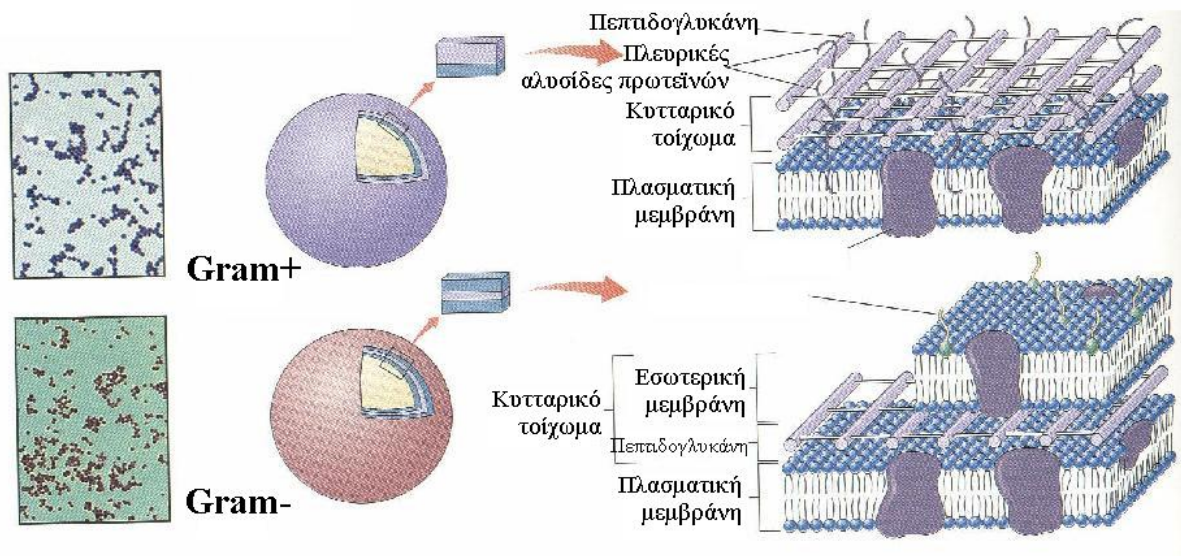
Τα βακτήρια είναι οι μικρότεροι οργανισμοί με κυτταρική δομή. Πρόκειται για προκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν αποικίσει και τα πιο ακραία περιβάλλοντα και κατέχουν μια πολύ σημαντική θέση στην ανακύκλωση της ύλης ενός οικοσυστήματος ως αποικοδομητές οργανικής ύλης. Είναι απαραίτητοι για την παραγωγή μιας πλειάδας τροφίμων, όπως το ψωμί, το κρασί, η μύρα, το τυρί, καθώς και για την παραγωγή των βιοτεχνολογικών προϊόντων.

Τα βακτήρια απαντώνται ως **απομονωμένα κύτταρα** (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*), **αλυσίδες κυττάρων** (*Streptococci*) και σε **μορφή ινιδίων** (*Simonsiella*) (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Τύποι βακτηριακών κυττάρων.

Τα βακτηριακά κύτταρα περιβάλλονται από ένα **κυτταρικό τοίχωμα** δομημένο από πρωτεΐνες, λιπίδια και πολυσακχαρίτες. Σε πολλά βακτήρια το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλεται από περισσότερα στρώματα πολυσακχαριτών τα οποία σχηματίζουν μια βλενώδη **κάψουλα**. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ιδιαίτερα ισχυρό για να αντιστέκεται στη διαφορά της οσμωτικής πίεσης στο εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου. Την ισχύ του αυτή την οφείλει στην **πεπτιδογλυκάνη**, ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών και υδατανθράκων. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί περίπου το 95% του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ στα αρνητικά κατά Gram μόνο το 5% (Εικ.2).

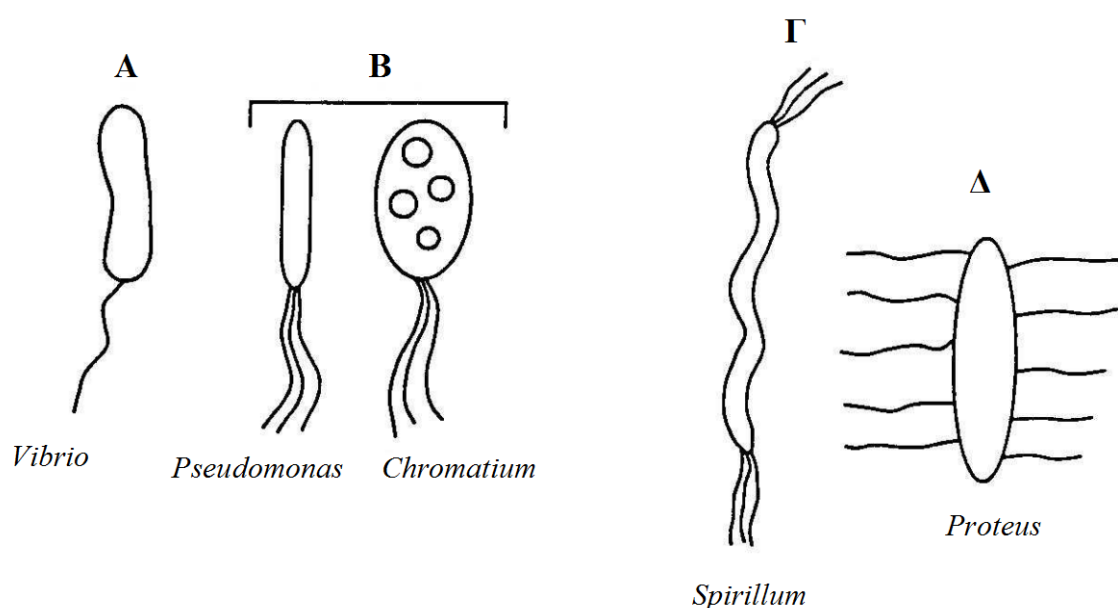


Εικόνα 2. Πρότυπο που δείχνει τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών και των θετικών κατά Gram βακτηρίων.

Ως προκαρυωτικοί οργανισμοί, τα βακτήρια στερούνται εσωτερικών μεμβρανικών δομών και οι διαδικασίες της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης επιτελούνται από την κυτταρική μεμβράνη. Εγκολπώσεις της κυτταρικής μεμβράνης σχηματίζουν τα φωτοσυνθετικά οργανίδια, **τα χρωματοφόρα**. Στα χρωματοφόρα βρίσκονται και οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των βακτηρίων, **οι βακτηριοχλωροφύλλες και τα καροτενοειδή**. Σε ανάλογες μεμβρανικές εγκολπώσεις βρίσκεται εγκατεστημένη και η συσκευή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα βακτήρια δεν έχουν σχηματισμένο πυρήνα, με τον πυρηνικό φάκελο να περικλείει το χρωμοσωμικό υλικό του κυττάρου. Αντιθέτως, το DNA βρίσκεται απλά συγκεντρωμένο με μια πλευρά του κυτταροπλάσματος και ονομάζεται **πυρηνοειδές**. Τα ελεύθερα ριβοσώματα είναι το κυρίαρχο οργανίδιο του κυτταροπλάσματος των βακτηριακών κυττάρων.

Πολλά βακτήρια διαθέτουν ένα κινητήριο σύστημα από μαστίγια. Ο τρόπος με τον οποίο τα μαστίγια είναι κατανομημένα στο βακτηριακό κύτταρο είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος

και χρησιμοποιείται για τη συστηματική τους κατάταξη (Εικ.3). Τα μαστίγια μπορεί να είναι τοποθετημένα στους πόλους του βακτηρίου (**πολική τοποθέτηση**) ή στις πλευρές (**πλευρική τοποθέτηση**). Στην πολική τοποθέτηση διακρίνουμε την **μονοπολική** ή **διπολική** και την **μονότριχη** (ένα μαστίγιο) ή **πολύτριχη** (περισσότερα από ένα μαστίγια). Τα βακτήρια που φέρουν περισσότερα από ένα μαστίγια στις πλευρές τους ονομάζονται **περίτριχα**. Επίσης, μερικά αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι εφοδιασμένα με άλλες εξωτερικές κατασκευές, τα **ινίδια**, ο ρόλος των οποίων περιορίζεται στη σύνδεση των κυττάρων κατά τη σύζευξη.



Εικόνα 3. Διαφορετικοί τρόποι κατανομής των μαστιγίων στα βακτήρια. Α. μονοπολική μονότριχη, Β. μονοπολική πολύτριχη, Γ. διπολική πολύτριχη και Δ. περίτριχη.

Στη διάρκεια της άσκησης θα έχετε την ευκαιρία να εξερευνήσετε τον κόσμο των βακτηρίων μέσα από μια ηλεκτρονική βάση δεδομένων. Αυτή η ηλεκτρονική συλλογή αφορά κυρίως γνωστά βακτήρια σε διάφορες μορφές και σχήματα.

Στην ενότητα “Bacteria Forms” θα βρείτε βακτήρια με διαφορετικά σχήματα.

Στην ενότητα “Bacteria Microanatomy” θα βρείτε εικόνες σχετικές με το τοίχωμα και την κάψουλα των βακτηρίων, την κατά Gram χρώση, τα μαστίγια και τα ενδοσπόρια που σχηματίζουν.

Στην ενότητα “Eubacteria” θα βρείτε μια συλλογή γνωστών βακτηρίων όπως το *Lactobacillus* που είναι υπεύθυνο για τη γαλακτική ζύμωση, το *Streptomyces* που παράγει το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και το *Treponema* που προκαλεί σύφιλη.

Προσδιορισμός του αριθμού των βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

Αυτή η μέθοδος προσδιορισμού βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε βακτηριακό κύτταρο σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης δίνει μια αποικία θυγατρικών κυττάρων, που είναι ορατή με γυμνό μάτι. Είναι δυνατόν, λοιπόν, να χρησιμοποιηθεί η ιδιότητα αυτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων που βρίσκονται σε ένα δείγμα. Για να εφαρμοστεί η μέθοδος αυτή με επιτυχία πρέπει ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται σε ένα τριβλίο να είναι προσιτός σε αρίθμηση. Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος πριν την επίστρωση σε τριβλία με άγαρ.

Πειραματικό μέρος

Για το χειρισμό των βακτηρίων είναι απαραίτητη η διατήρηση ασηπτικών συνθηκών στον πάγκο εργασίας, η οποία επιτυγχάνεται με την παρουσία ενός λύχνου Bunsen.

Αριθμήστε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες.

Ετοιμάστε ασηπτικά μια σειρά 5 δοκιμαστικών σωλήνων με 4,5ml αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο στον καθένα (χρησιμοποιήστε την ίδια πιπέττα αλλά περνάτε τη από τη φλόγα κάθε φορά).

Προσθέστε με πιπέττα 0,5ml αιωρήματος βακτηρίων στο σωλήνα 1. Αναμιξτε το περιεχόμενο καλά με κτύπημα του σωλήνα με το δάκτυλό σας.

Στη συνέχεια μεταφέρετε 0,5ml από το σωλήνα 1 στο σωλήνα 2. Αναμιξτε καλά και επαναλάβετε την ίδια διαδικασία από το σωλήνα 2 στο σωλήνα 3, από το σωλήνα 3 στο σωλήνα 4, και από το σωλήνα 4 στο σωλήνα 5. Στο σωλήνα 5 το αρχικό αιώρημα βακτηρίων έχει αραιωθεί κατά 100.000 φορές.

Αριθμήστε 5 τριβλία με θρεπτικό άγαρ που θα σας δοθούν από το 1-5. Αρχίζοντας από το σωλήνα 5 προσθέστε 0,1ml στο τριβλίο 5 και συνεχίστε το ίδιο μέχρι το σωλήνα 1 και το τριβλίο 1. Ακολουθεί επίστρωση του δείγματος στο τριβλίο με τη μικροβιολογική ράβδο. Τα τριβλία σας θα επωαστούν στους 37°C.

Στο επόμενο εργαστήριο, μετρήστε τις αποικίες που σχηματίστηκαν στα τριβλία σας και υπολογίστε τον αριθμό των βακτηρίων που υπήρχε σε κάθε ml του αρχικού αιωρήματος. Σαν πρώτο βήμα, υπολογίστε τον αριθμό των βακτηρίων ανά ml για την κάθε αραιώση διαιρώντας τον αριθμό των αποικιών που μετρήσατε στη συγκεκριμένη αραιώση με τον όγκο του αιωρήματος βακτηρίων που επιστρώσατε. Στη συνέχεια, υπολογίστε τον αριθμό των βακτηρίων ανά ml αρχικής καλλιέργειας πολλαπλασιάζοντας αυτό που βρήκατε με το συντελεστή αραιώσης. Συμπληρώστε τον Πίνακα 1.

Συγκεντρώστε τα αποτελέσματα από όλες τις ομάδες του εργαστηρίου και υπολογίστε το μέσο όρο για κάθε αραιώση. Πόσο αποκλίνουν οι δικές σας τιμές από το μέσο όρο; Που αποδίδεται αυτή την απόκλιση;

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ

Όνοματεπώνυμο.....Ημερομηνία.....

1. Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα.

Αρ. Σωλήνα	Συντελεστής αραιώσης	Αρ. Αποικιών	Αρ. Βακτηριών/ml
Αρχικό αιώρημα			
1			
2			
3			
4			
5			

2. Συγκεντρώστε τα στοιχεία από όλες τις ομάδες του εργαστηρίου και υπολογίστε το μέσο όρο για κάθε αραιώση.

Αρ. Σωλήνα	Αρ. Βακτηριών/ml					
	1	2	3	4	5	6
Αρχικό αιώρημα						
1						
2						
3						
4						
5						