

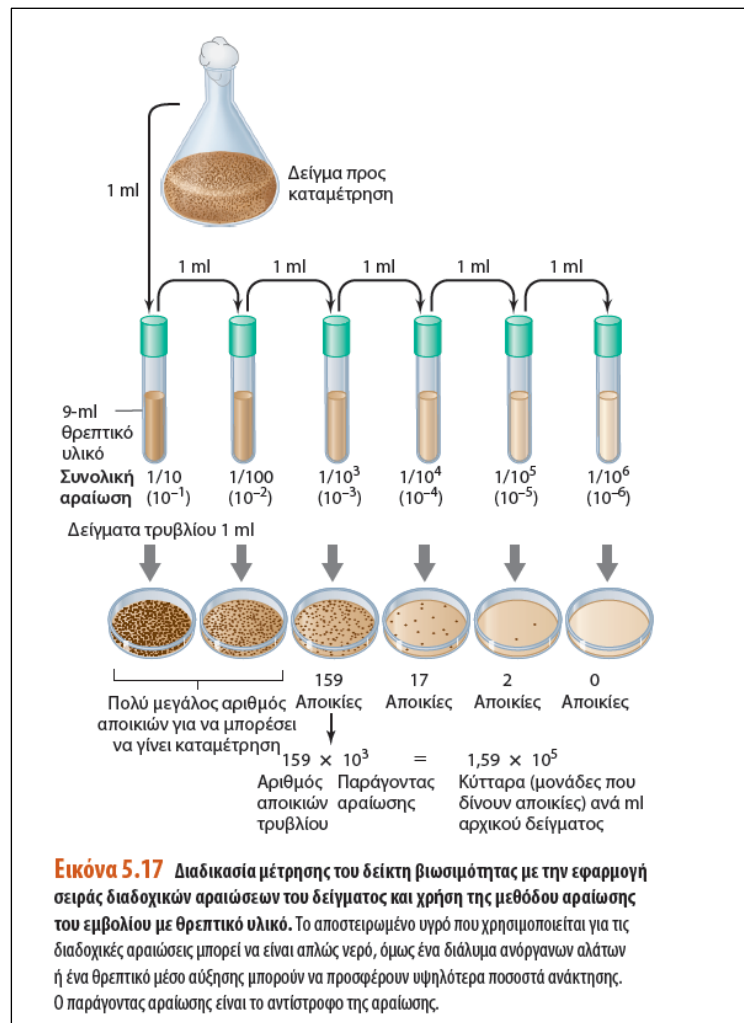
Άσκηση 4: Καλλιέργεια μικροοργανισμών από την υδάτινη στήλη

Με την ανάπτυξη της μεθοδολογίας των καλλιεργειών και της αναγνώρισης των μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι δυνατή η εκτίμηση μέρους της ποικιλότητας των μικροοργανισμών σε αυτά τα δείγματα. Η ικανότητα μελέτης της ποικιλότητας περιορίζεται από ένα θεμελιώδες εμπόδιο, την ανικανότητα καλλιέργειας φυσικών κοινοτήτων με την χρήση παραδοσιακών καλλιεργητικών τεχνικών. Η ανικανότητα αυτή δεν είναι χαρακτηριστικό των μικροοργανισμών αλλά των περιορισμένων συνθηκών που αναγκαστικά επιλέγονται από τους επιστήμονες. Υπολογίζεται ότι οι παραδοσιακές τεχνικές αποκαλύπτουν λιγότερο από το 0,1% που υπάρχουν σε ένα τυπικό φυσικό δείγμα (π.χ. θαλασσινό νερό).

Με την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών (απομόνωση DNA; Εργαστήριο 5 και αλληλούχηση DNA εργαστήρια 6-7), διευκολύνθηκε η αναγνώριση της φυλογενετικής θέσης των μικροοργανισμών και η εύρεση στοιχείων του μεταβολισμού τους είτε άμεσα με αλληλούχηση όλων των γονιδίων (μεταγονιδιωματική) ή έμμεσα με μελέτη των rRNA γονιδίων και εύρεση της φυλογενετικής θέσης και των κοντινότερων συγγενών. Η χρήση των μοριακών τεχνικών παρακάμπτει τις δυσκολίες καλλιέργειας των μικροοργανισμών, αφού η απομόνωση του γενετικού υλικού γίνεται από το αρχικό δείγμα.

Οι καλλιεργητικές προσεγγίσεις, ενώ δεν μπορούν να αναλύσουν σε βάθος τη βιοποικιλότητα, αυξάνουν την ικανότητα μας να προσδιορίζουμε το εύρος των γενετικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών. Με το όρο 'καλλιέργεια' των μικροοργανισμών εννοούμε την απομόνωση και δυνατότητα αύξησης των μικροοργανισμών μετά την απομάκρυνση από το φυσικό τους περιβάλλον. Γενικά είναι δύσκολο να ανακτήσουμε ζωντανούς οργανισμούς από ένα περιβαλλοντικό δείγμα εδάφους ή νερού. Οι λόγοι για αυτό είναι η φυσική ναρκοβίωση αλλά και οι ακατάλληλες συνθήκες για αύξηση (π.χ. άγνωστη βέλτιστη θερμοκρασία ή pH, άγνωστες απαιτήσεις σε θρεπτικά).

Με την χρήση της μεθόδου διαδοχικών αραιώσεων είναι δυνατή η αύξηση πολλών ετερότροφων μικροοργανισμών από φυσικά οικοσυστήματα (Εικ. 5.17). Για την καταμέτρηση μικροοργανισμών από τη θάλασσα, που είναι και ο στόχος του εργαστηρίου, θα χρησιμοποιήσουμε δύο διαδοχικές αραιώσεις (1/10 και 1/100) και θα μελετήσουμε την αύξηση μικροοργανισμών σε Marine agar, το οποίο είναι ένα θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει τα θρεπτικά στοιχεία τα οποία είναι απαραίτητα για την αύξηση πολλών θαλάσσιων μικροοργανισμών αλλά και τα άλατα που περιέχονται στο θαλασσινό νερό.



Πρακτικό μέρος

Υλικά και μέθοδοι

Θαλασσινό νερό

Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Αποστειρωμένες πιπέτες των 1 και 5 ml

Τρυβλία petri με Marine Agar

Πύργος διήθησης/αντλία κενού

Φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2 μ m

Θα σας δοθεί δείγμα θαλασσινού νερού από το οποίο θα πραγματοποιήσετε, σε δοκιμαστικούς σωλήνες, διαδοχικές αραιώσεις 1/10 και 1/100 χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα θα επιστρώσετε 50 και 100 μ l σε έτοιμα τρυβλία με Marine agar.

Η επώαση θα γίνει σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (26 °C και θερμοκρασία δωματίου) για 48 ώρες.

Από το υπόλοιπο νερό θα διηθήσετε περίπου 150 ml υπό κενό και θα κρατήσετε το φίλτρο στην κατάψυξη για την πραγματοποίηση της απομόνωσης DNA στο επόμενο εργαστήριο.

