**ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ**
**ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**
**ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΝΤΟΥΓΙΑΣ** **ΠΑΡΑΣΧΟΣ ΜΕΛΙΔΗΣ**

**ΞΑΝΘΗ 2023**

# Ενότητα 1: Απαρίθμηση μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Σημαντική στην μικροβιολογική ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Παρόλο τους περιορισμούς που υπάρχουν κατά την εφαρμογή διαφόρων μεθοδολογιών εκτίμησης του μικροβιακού πληθυσμού, η καταμέτρηση αυτού προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού σε διάφορα περιβάλλοντα και περιβαλλοντικούς χειρισμούς.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του πληθυσμού διακρίνονται σε άμεσους και έμμεσους. Στους άμεσους περιλαμβάνονται κύρια η μικροσκόπηση και η μέθοδος μέτρησης αποικιών, ενώ στους έμμεσους περιλαμβάνονται η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού μέσω προσδιορισμού της αναπνευστικής δραστηριότητας (μέτρηση κατανάλωσης οξυγόνου ή απελευθέρωση $CO_2$ κατά τον μεταβολισμό μικτού πληθυσμού), η μέτρηση του ATP που συνδέεται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, καθώς και ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας βιοκαταλυτών που απαντώνται σε μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών, ώστε να αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα της βιομάζας (π.χ. προσδιορισμός της ενεργότητας διαφόρων κλάσεων εστερασών και γλυκοσιδασών). Οι μέθοδοι έμμεσου προσδιορισμού του μικροβιακού πληθυσμού στηρίζονται στην αποδοχή ότι όσο μεγαλύτερος μικροβιακός πληθυσμός υπάρχει, τόσο μεγαλύτερη αναπνευστική ή ενζυμική δραστηριότητα μετράται, αν και η παραδοχή αυτή δεν βρίσκει πάντα αποδοχή. Έτσι, δείγματα δυσκόλως αποδομούμενα είναι δυνατόν να αποικιστούν ικανοποιητικά από μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών με μικρή ενζυμική ενεργότητα, π.χ. από ακτινομύκητες, ή είναι δυνατή η ύπαρξη μεγάλου πληθυσμού μικροαερόφιλων στελεχών με μικρή αναπνευστική δραστηριότητα.

Σε αυτή την ενότητα θα δοθεί έμφαση στους άμεσους τρόπους προσδιορισμού του μικροβιακού πληθυσμού, με ιδιαίτερη μνεία στην μέθοδο μέτρησης αποικιών.

## 1. Μέθοδος μέτρησης αποικιών.

Πραγματοποιείται εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού βάσει της ανάπτυξης μεμονωμένων κυττάρων (ή συσσωματωμάτων αυτών) που προέρχονται από περιβαλλοντικό δείγμα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, σχηματίζοντας μετά από επώαση αντίστοιχο αριθμό αποικιών. Ο μικροβιακός πληθυσμός στην περίπτωση αυτή εκφράζεται ως cfu (colony forming units-μονάδες / αριθμός σχηματιζόμενων αποικιών) ανά μονάδα όγκου (ml, 100 ml ή L) ή μάζας (g ή Kg) δείγματος. Επισημαίνεται ότι ο εξοπλισμός, τα διαλύματα και τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα, η δε διαδικασία πραγματοποιείται υπό αποστειρωμένες συνθήκες (το μόνο που δεν έχει αποστειρωθεί είναι το προς ανάλυση δείγμα).

## 1.1. Η πρακτική της «1/10» αραίωσης-δημιουργία πρώτου αιωρήματος.

Στερεά δείγματα ή δείγματα με μεγάλο ιξώδες υφίστανται ανάμειξη με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να προκύψει αιώρημα κυττάρων, που κατόπιν θα επιστρωθεί ή θα ενσωματωθεί σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Συνήθως προτιμάται ανάμιξη 10 g δείγματος με 90 ml διαλύτη (ή 100 g δείγματος με 900 ml διαλύτη), αλλά μπορεί να αναμειχθούν και 10 g δείγματος με 100 ml διαλύτη (ή 100 g δείγματος με 1000 ml διαλύτη). Σε εδαφικά δείγματα συνήθως χρησιμοποιείται ανάμιξη 10 g δείγματος με 95 ml διαλύτη (ή 100 g δείγματος με 950 ml διαλύτη). Ανεξαρτήτως ποια από τις παραπάνω αναμείξεις θα πραγματοποιηθεί, η διαδικασία αυτή είναι γνωστή και ως «1 προς 10» αραίωση (1/10 ή $10^{-1}$). Η ομογενοποίηση του δείγματος με το διαλύτη γίνεται με ειδικά blenders, mixers, shakers, καθώς και ομογενοποιητές τύπου stomacher.

## 1.2. Επιλογή διαλύτη προς ομογενοποίηση.

Ανάλογα με το είδος του δείγματος, χρησιμοποιείται και κατάλληλος διαλύτης. Ο διαλύτης πρέπει να προσομοιάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος. Επιπλέον, η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από την ομάδα των μικροοργανισμών που θέλουμε να απαριθμήσουμε. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι οι εξής:

1) φυσιολογικός ορός (0.85% w/v NaCl)
2) Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (συνήθως pH 7). Για την παρασκευή του χρησιμοποιείται διάλυμα 0.061 M $Na_2HPO_4$-0.039 M $NaH_2PO_4$.
3) Διάλυμα πεπτόνης 0.1% w/v.

Τα διαλύματα αλάτων χρησιμοποιούνται συνήθως όταν ο αναλυτής είναι έμπειρος, αφού η παραμονή τραυματισμένων, από τη διαδικασία, κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε θανάτωση μέρους του πληθυσμού, και υποεκτίμηση του πληθυσμού. Από την άλλη πλευρά, αραιό διάλυμα πεπτόνης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας συντελεί στην ανάκαμψη τραυματισμένων κυττάρων, αν και μεγάλος χρόνος εκτέλεσης της διαδικασίας καταμέτρησης των αποικιών μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση του πληθυσμού λόγω διπλασιασμού των κυττάρων. Η χρησιμοποίηση νερού πρέπει να αποφεύγεται, γιατί προκαλεί σπαργή των κυττάρων. Επίσης πιο υπέρτονα από το δείγμα διαλύματα δεν χρησιμοποιούνται, διότι η χρήση τους συνοδεύεται από φαινόμενα πλασμόλυσης. Για την εκτίμηση αλοανθεκτικών και σακχαροανθεκτικών/σακχαρόφιλων μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται συνήθως διαλύματα 15% και 20% w/v σε NaCl και σακχαρόζη αντίστοιχα. Για την απαρίθμηση του καλλιεργήσιμου αναερόβιου μικροβιακού φορτίου χρησιμοποιούνται διαλύτες με αναγωγικές ιδιότητες, π.χ. διάλυμα κυστεΐνης ή θειογλυκολικού άλατος.

### 1.2.3. Διαδοχικές αραιώσεις.

Σε περιπτώσεις που το προς ανάλυση δείγμα περιέχει υψηλό μικροβιακό πληθυσμό, απαιτείται αραίωση. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι ο ίδιος με εκείνο που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση - «1/10» αραίωση. Συνήθως προτιμόνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, όπου πραγματοποιείται σε κάθε αραίωση υποδεκαπλασιασμός του μικροβιακού πληθυσμού. Σε δείγματα με υψηλό μικροβιακό πληθυσμό είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διαδοχικές αραιώσεις βήματος 1/100. Σκοπός των αραιώσεων είναι να προκύψει ικανός αριθμός μετρήσιμων αποικιών σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Είναι γενικά αποδεκτός ο κανόνας των 30-300 αποικιών, δηλαδή μέτρηση των αποικιών στην αραίωση εκείνη που ο αριθμός των αποικιών είναι μεταξύ 30 έως 300 - για πάνω από 300 αποικίες δεν είναι δυνατή η καταμέτρηση, αφού καλύπτεται το τρυβλίο πλήρως από βιομάζα, ενώ για κάτω από 25-30 αποικίες μειώνεται η αξιοπιστία της μετρήσεως, π.χ., αν δύο κύτταρα θανατωθούν κατά τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων και μετρηθούν 18 αντί για 20 αποικίες, το σφάλμα είναι της τάξεως του 10%.

### 1.2.3. Εμβολιασμός αιωρήματος κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υλικό.

Για δείγματα όπου δεν είναι γνωστό το αρχικό μικροβιακό φορτίο, απαιτείται επίστρωση ή ενσωμάτωση κατάλληλης ποσότητας αιωρήματος κυττάρων από την κάθε αραίωση. Για επίστρωση σε τρυβλίο Petri χρησιμοποιείται 0.1-0.5 ml (σπανίως 1 ml) από κάθε αραίωση. Αν επιλεχθεί η μέθοδος της ενσωμάτωσης σε τρυβλίο, χρησιμοποιείται συνήθως 1 ml. Ακολουθεί η περιγραφή των δύο τρόπων εμβολιασμού:

Α) Επίστρωση κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υλικό.

Αρχικά παρασκευάζεται το κατάλληλο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Συνήθως προετοιμάζεται κάποιο γενικής συστάσεως θρεπτικό υπόστρωμα όπως τα PCA-Plate Count Agar, NA-Nutrient Agar και TSA-Tryptic Soy Agar για βακτήρια. Στην περίπτωση των ζυμών χρησιμοποιούνται τα MEA-Malt Extract Agar και PDA-Potato Dextrose Agar. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και εκλεκτικά υποστρώματα που επιτρέπουν την απαρίθμηση συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών. Από κάθε αραίωση, λαμβάνεται ασηπτικά εμβόλιο 0.1-0.5 ml που τοποθετείται στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος και επιστρώνεται πλησίον της φλόγας σε θάλαμο νηματικής ροής, με τη βοήθεια μίας αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου. Η αποστείρωση της ράβδου πραγματοποιείται με εμβάπτιση αυτής σε διάλυμα αιθανόλης 70% v/v και καύση στην οξειδωτική φλόγα του λύχνου. Η επίστρωση πραγματοποιείται με συνεχείς κυκλικές κινήσεις μέχρι πλήρους απορρόφησης του αιωρήματος από το στερεό θρεπτικό μέσο.

Β) Ενσωμάτωση κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Παρασκευάζεται το κατάλληλο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Όπως προηγουμένως, προετοιμάζεται κάποιο γενικής συστάσεως θρεπτικό υπόστρωμα όπως τα PCA-Plate Count Agar, NA-Nutrient Agar και TSA-Tryptic Soy Agar για βακτήρια. Στην περίπτωση των ζυμών χρησιμοποιούνται τα MEA-Malt Extract Agar και PDA-Potato Dextrose Agar. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και εκλεκτικά υποστρώματα που επιτρέπουν την απαρίθμηση συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών. Μετά από αποστείρωση, το στερεό θρεπτικό μέσο κρατείται σε υδατόλουτρο στους 45$^{o}$C (ώστε να είναι σε υγρή κατάσταση). Από κάθε αραίωση, λαμβάνεται ασηπτικά εμβόλιο 1 ml που μεταφέρεται στο εσωτερικό κενού τρυβλίου Petri. Ακολουθεί προσθήκη στερεού θρεπτικού υποστρώματος μέχρι πλήρους καλύψεως του εμβολίου με ελαφριά ανακίνηση. Μετά την πήξη του θρεπτικού υποστρώματος, τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο προς ανάπτυξη των αποικιών. Αποικίες εμφανίζονται σε όλη την έκταση του θρεπτικού υποστρώματος, ενώ σε περιπτώσεις που επιθυμείται η μελέτη αναερόβιων μικροοργανισμών είναι δυνατή η προσθήκη ενός επιπλέον στρώματος στερεού υποστρώματος μετά την πήξη του πρώτου.

Η θερμοκρασία του υποστρώματος δεν πρέπει να ξεπερνάει τους 45$^{o}$C, αφού υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να προκαλέσουν θανάτωση μέρους της μεσόφιλης μικροχλωρίδας. Ο τρόπος αυτός εμβολιασμού αντενδείκνυται σε περίπτωση απαρίθμησης του ψυχρότροφου πληθυσμού, αφού μπορεί να προκαλέσει θερμοκρασιακό σοκ και θανάτωση μεγάλου μέρους της ψυχρότροφης μικροχλωρίδας, καθώς και σε περιπτώσεις εκτίμησης του θερμόφιλου/υπερθερμόφιλου πληθυσμού, όπου η μεν τοποθέτηση των τρυβλίων σε θερμοκρασία δωματίου προκαλεί θερμοκρασιακό σοκ, η δε παραμονή του θρεπτικού υποστρώματος σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 45$^{o}$C δεν επιτρέπει την πήξη του.

### 1.2.4. Συνθήκες επώασης.

Για τη μεσόφιλη μικροχλωρίδα πραγματοποιείται επώαση σε θερμοκρασίες μεταξύ 30-37$^{o}$C, ενώ, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ένα γενικής συστάσεως θρεπτικό υπόστρωμα και επώαση σε μεσόφιλες συνθήκες, έχουμε εκτίμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (Ο.Μ.Χ). Συνήθως για την μικροβιολογική εκτίμηση της ποιότητας του νερού επιλέγεται η καταμέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού στους 22 και 37$^{o}$C.

### 1.2.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδου μέτρησης αποικιών

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι:

Α) συσσωματώματα κυττάρων οδηγούν σε υποεκτίμηση του πληθυσμού
Β) πολλά κύτταρα θανατώνονται κατά την διαδικασία
Γ) τα θρεπτικά υποστρώματα, αν και γενικής συστάσεως, δεν ικανοποιούν τις απαιτήσεις όλων των καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών
Δ) δεν επιτρέπει η μέθοδος τον ικανοποιητικό προσδιορισμό του πληθυσμού πολυκύτταρων μικροοργανισμών, όπως π.χ. μυκήτων, αφού κονίδια αυτών,

αρθροσπόρια και τμήματα υφών μπορούν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση του πληθυσμού
Ε) το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί έχουν διαφορετικά όρια θερμοκρασίας, pH, αλατότητας κλπ για ανάπτυξη καθώς και διαφορετικές απαιτήσεις σε οξυγόνο
ΣΤ) οι μικροοργανισμοί που καλλιεργούνται αποτελούν κατά εκτίμηση μόνο το 1% του συνολικού πληθυσμού αυτών

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την απομόνωση καθαρών στελεχών μικροοργανισμών.

**1.2.6. Πειραματική διαδικασία.**

Αρχικά το προς εξέταση δείγμα υφίσταται 1/10 αραίωση. Έστω ότι έχουμε 10 ml υγρού βιομηχανικού αποβλήτου που αναμειγνύεται με 90 ml διαλύτη π.χ. φυσιολογικό ορό. Εδώ ο πληθυσμός αραιώθηκε κατά 10 φορές, δηλαδή αποτελεί την $10^{-1}$ αραίωση. Στην συνέχεια, από το σωλήνα της $10^{-1}$ αραίωσης παίρνουμε 1 ml και το μεταφέρουμε σε νέο σωλήνα που περιέχει 9 ml φυσιολογικού ορού. Ο μικροβιακός πληθυσμός έχει τώρα αραιωθεί κατά 100 φορές σε σχέση με το αρχικό δείγμα και αποτελεί την $10^{-2}$ αραίωση. Αν η ίδια διαδικασία πραγματοποιηθεί στο σωλήνα της $10^{-2}$ αραίωσης, θα έχουμε την $10^{-3}$ αραίωση. Συνήθως φτάνουμε έως $10^{-7}$ ή $10^{-8}$ για βιομηχανικά δείγματα (αν και ο πληθυσμός είναι μικρότερος). Στην περίπτωση του ανάμεικτου υγρού απαιτούνται αραιώσεις έως την $10^{-10}$ και επιλέγονται διαδοχικές αραιώσεις βήματος 1/100, αντί για διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Θα εξεταστεί δείγμα πόσιμου νερού ή υγρά απόβλητα ελαιουργείου, και αναλυτικά η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Παρασκευή 500 ml θρεπτικού υλικού PCA (Plate Count Agar).

Η σύσταση του PCA (pH 7) είναι η ακόλουθη:
0.5% w/v πεπτόνη
0.25% w/v εκχύλισμα ζύμης
0.1% w/v γλυκόζης
1.7% w/v άγαρ
Μετά από αποστείρωση ακολουθεί προσθήκη του υλικού σε τρυβλία Petri.

2) Παρασκευή 200 ml διαλύματος 0.1% w/v πεπτόνης. Σε κωνική φιάλη θα τοποθετηθούν 90 ml, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα θα διοχετευθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες (9 ml σε κάθε σωλήνα).

3) Αποστείρωση ακρορύγχιων μικροπιπετών.

4) Ανάμιξη 10 ml δείγματος σε 90 ml διαλύματος 0.1% w/v πεπτόνης (“1/10” αραίωση)

5) Πραγματοποίηση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων (1 ml σε 9 ml αραιού διαλύματος πεπτόνης) έως την $10^{-7}$ αραίωση.

6) Εμβολιασμός με επίστρωση 0.2 ml από κάθε αραίωση σε θρεπτικό υλικό PCA (Σχήμα 1)

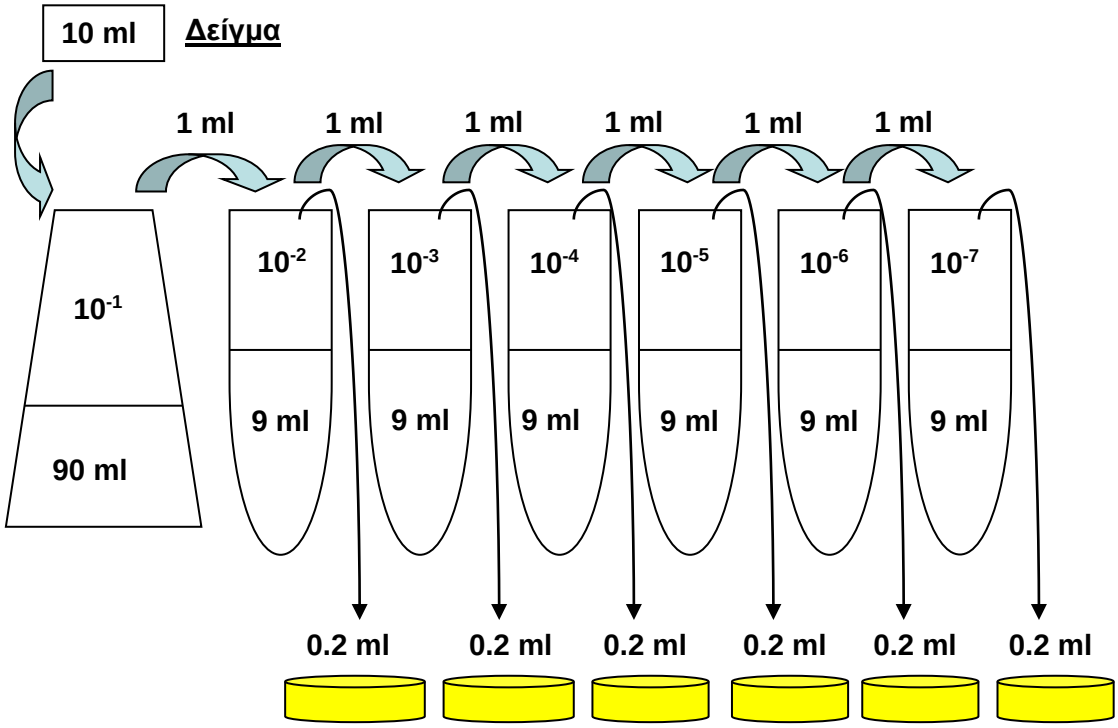
7) Επώαση στους 37$^{o}$C.

8) Μέτρηση αποικιών μετά από 24 ώρες, και υπολογισμοί.

Για τους υπολογισμούς ισχύει η σχέση:

**N=n/d**, όπου **N είναι τα cfu ανά ml (για υγρό) ή g (για στερεό) αρχικού δείγματος, n ο αριθμός των αποικιών** στο τρυβλίο που εμβολιάστηκε με αιώρημα και μετρήθηκε. Η **αραίωση d** ισούται με **τον όγκο του εμβολίου** επί **την αραίωση** όπου παραλήφθηκε το εμβόλιο.

Η παραπάνω διαδικασία πρέπει να πραγματοποιείται εις τριπλούν, για αξιόπιστα αποτελέσματα.




**Σχήμα 1.** Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις.

# Ενότητα 2: Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη μικροοργανισμών.

## 2.1. Επίδραση της θερμοκρασίας.

Βάσει της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξής τους, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε ψυχρόφιλους, μεσόφιλους, θερμόφιλους και υπέρθερμόφιλους. Στις παραπάνω κατηγορίες η κατάληξη –φίλος σχετίζεται με το θερμοκρασιακό άριστο ανάπτυξης αυτών. Ως ψυχρόφιλοι ορίζονται μικροοργανισμοί που η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι μικρότερη των 20$^{o}$C, μεσόφιλοι ορίζονται εκείνοι που η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι μεταξύ 20-45$^{o}$C, θερμόφιλοι ορίζονται εκείνοι που η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι μεταξύ 45-80$^{o}$C, ενώ υπερθερμόφιλοι ορίζονται εκείνοι που η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι μεγαλύτερη των 80$^{o}$C και αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από Αρχαία. Οι ψυχρότροφοι (ή ψυχροανθεκτικοί) και θερμοανθεκτικοί είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί που το θερμοκρασιακό τους ελάχιστο και μέγιστο αντίστοιχα βρίσκεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 5-7$^{o}$C και υψηλότερες των 40-45$^{o}$C.

Για την απαρίθμηση ψυχρότροφων μικροοργανισμών χρησιμοποιείται ένα γενικής συστάσεως θρεπτικό υπόστρωμα, π.χ. PCA, και επώαση σε χαμηλές θερμοκρασίες (4-5$^{o}$C) για αρκετό χρονικό διάστημα (πλέον των 2 εβδομάδων). Για την απαρίθμηση θερμόφιλων μικροοργανισμών χρησιμοποιείται επίσης ένα γενικής συστάσεως θρεπτικό υπόστρωμα, π.χ. PCA, και επώαση στους 55$^{o}$C για χρονικό διάστημα 3 ημερών, όπου τα τρυβλία τοποθετούνται σε πλαστικές σακούλες με διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί, προς διατήρηση της υγρασίας του θρεπτικού μέσου.

Πειραματική διαδικασία.

Θα πραγματοποιηθεί χαρακτηρισμός του θερμοκρασιακού εύρους ανάπτυξης γνωστού στελέχους βακτηρίου, καθώς και της βέλτιστης θερμοκρασίας για ανάπτυξη. Η πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Παρασκευή 500 ml θρεπτικού υποστρώματος PCA. Η σύσταση του PCA (pH 7) είναι η ακόλουθη:
0.5% w/v πεπτόνη
0.25% w/v εκχύλισμα ζύμης
0.1% w/v γλυκόζης
1.7% w/v άγαρ

Το παρασκευασμένο υλικό αποστειρώνεται και μεταφέρεται σε τρυβλία Petri.

2) Εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού PCA των τρυβλίων με γνωστό στέλεχος βακτηρίου, με χρήση της μεθόδου των παραλλήλων γραμμών.

3) Τοποθέτηση των τρυβλίων σε διαφορετικούς επωαστικούς θαλάμους, ρυθμιζόμενους στις εξής θερμοκρασίες: 5, 10, 15, 20, 30, 37, 40 και 45$^{o}$C.

4) Παρατήρηση της ανάπτυξης καθημερινώς, καταγραφή του θερμοκρασιακού εύρους ανάπτυξης, καθώς και της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης (βάσει του χρόνου εμφάνισης της βιομάζας).

## 2.2. Επίδραση του pH.

Βάσει της pH ανάπτυξής τους, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε οξεόφιλους, ουδετερόφιλους και βασεόφιλους. Στις παραπάνω κατηγορίες η κατάληξη –φίλος σχετίζεται με το βέλτιστο pH ανάπτυξής τους. Οξεόφιλοι ονομάζονται οι μικροοργανισμοί που το βέλτιστο pH για ανάπτυξή είναι μικρότερο του pH 5, ουδετερόφιλοι ονομάζονται εκείνοι που το βέλτιστο pH για ανάπτυξη είναι μεταξύ pH 5 έως 9, ενώ βασεόφιλοι είναι εκείνοι που το βέλτιστο pH για ανάπτυξη είναι μεγαλύτερο του pH 9. Βασεοανθεκτικοί και οξεοανθεκτικοί είναι ουδετερόφιλοι μικροοργανισμοί που το μέγιστο και ελάχιστο pH για ανάπτυξη είναι πάνω από pH 9 και κάτω από pH 5-5.5 αντίστοιχα.

Πειραματική διαδικασία

Θα πραγματοποιηθεί χαρακτηρισμός του εύρους pH για ανάπτυξη γνωστού στελέχους βακτηρίου, καθώς και υπολογισμός του βέλτιστου pH για ανάπτυξη. Η πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Παρασκευή των παρακάτω θρεπτικών υποστρωμάτων (100 ml έκαστο, σε κωνική φιάλη των 250 ml) που όλα αποτελούνται από 1% w/v γλυκόζης, 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 5% w/v πεπτόνης, και 0.1 mM $MgSO_4$ καθώς και:

Α) 0.06 M κιτρικού οξέος-0.04 M κιτρικού νατρίου, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος pH 4.
Β) 0.035 M κιτρικού οξέος -0.065 M κιτρικού νατρίου, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος pH 5.
Γ) 0.013 M $Na_2HPO_4$-0.087 M $KH_2PO_4$, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος pH 6.
Δ) 0.061 M $Na_2HPO_4$-0.039 M $NaH_2PO_4$, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος pH 7.
Ε) 0.095 M $Na_2HPO_4$-0.005 M $KH_2PO_4$, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος pH 8.
ΣΤ) 0.1 M $NaHCO_3$-1 mM $K_2HPO_4$, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος pH 9.
Ζ) 0.075 M $Na_2CO_3$-0.025 M $NaHCO_3$-1 mM $K_2HPO_4$, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος pH 10.2.

Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώνονται.

2) Εμβολιασμός των διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων με γνωστό στέλεχος βακτηρίου.

3) Τοποθέτηση των εμβολιασμένων καλλιεργειών σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στους 30$^{o}$C.

4) Παρατήρηση της ανάπτυξης καθημερινώς, καταγραφή του εύρους pH για την ανάπτυξη του στελέχους (θολότητα καλλιέργειας), καθώς και του βέλτιστου pH για ανάπτυξη (με μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm).

**2.3. Επίδραση της αλατότητας.**

Το διαθέσιμο στους μικροοργανισμούς νερό εκφράζεται με την ενεργότητα του ύδατος $a_w$ που θεωρητικά λαμβάνει τιμές μεταξύ 0 και 1. Η πλειονότητα των μικροοργανισμών αναπτύσσεται σε $a_w$ μεταξύ 0.99 και 0.91, ενώ για περιβάλλοντα με $a_w$<0.91 (περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας και υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων δεσμεύουν μόρια νερού) παρατηρείται ανάπτυξη οσμώφιλων μικροοργανισμών, όπως αλόφιλων βακτηρίων και αρχαίων, καθώς και σακχαρόφιλων ζυμών. Για $a_w$<0.60 δεν παρατηρείται ζωή.

Βάσει της ανάπτυξης σε περιβάλλοντα διαφορετικής αλατότητας, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε αλοανθεκτικούς και αλόφιλους. Οι αλοανθεκτικοί αναπτύσσονται καλύτερα απουσία άλατος, αλλά ανάπτυξη παρατηρείται και σε συγκεντρώσεις άλατος έως 20% w/v. Οι αλόφιλοι απαιτούν άλας για την ανάπτυξη τους, και διακρίνονται σε ηπίως, μετρίως και εξαιρετικά αλόφιλους, ανάλογα με το αν η βέλτιστη συγκέντρωση NaCl για ανάπτυξη είναι μεταξύ 1-6%, 6-15% και 15-30% w/v αντίστοιχα.

**Πειραματική διαδικασία**

Θα πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του εύρους της συγκέντρωσης NaCl, καθώς και της βέλτιστης συγκέντρωσης σε NaCl για την ανάπτυξη γνωστού στελέχους βακτηρίου. Η πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Παρασκευή των παρακάτω θρεπτικών υποστρωμάτων (100 ml έκαστο, σε κωνική φιάλη των 250 ml) που περιέχουν 2.5% w/v πεπτόνης, 0. 5% w/v εκχύλισμα ζύμης και 1.7% w/v άγαρ, καθώς και:

Α) 0% w/v NaCl (χωρίς αλάτι), για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος αλατότητας 0%
Β) 3% w/v NaCl, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος αλατότητας 3%
Γ) 5% w/v NaCl, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος αλατότητας 5%
Δ) 10% w/v NaCl, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος αλατότητας 10%
Ε) 15% w/v NaCl, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος αλατότητας 15%

ΣΤ) 20% w/v NaCl, για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος αλατότητας 20%

Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώνονται και μεταφέρονται σε τρυβλία Petri.

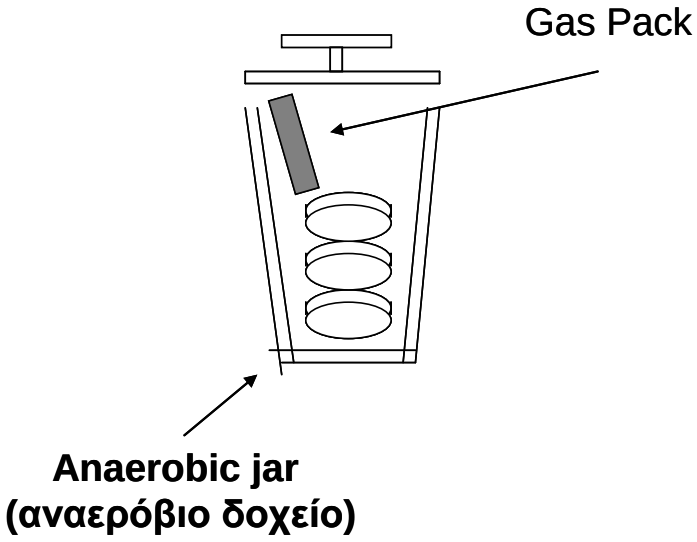
2) Ακολουθεί εμβολιασμός των παραπάνω θρεπτικών υποστρωμάτων με γνωστό στέλεχος βακτηρίου, με χρήση της μεθόδου των παραλλήλων γραμμών.

3) Τοποθέτηση των τρυβλίων (εμβολιασμένων καλλιεργειών) σε επωαστικό θάλαμο στους 30$^{o}$C.

4) Παρατήρηση της ανάπτυξης καθημερινώς, καταγραφή του εύρους της αλατότητας για ανάπτυξη, καθώς και της βέλτιστης συγκέντρωσης NaCl για ανάπτυξη (βάσει του χρόνου εμφάνισης της βιομάζας).

## 2.4. Επίδραση της συγκέντρωσης οξυγόνου.

Οι μικροοργανισμοί, βάσει των απαιτήσεών τους σε οξυγόνο, διακρίνονται σε υποχρεωτικά αερόβιους, μικροαερόφιλους, δυνητικά (προαιρετικά) αναερόβιους, και υποχρεωτικά αναερόβιους. Οι υποχρεωτικά αερόβιοι απαιτούν οξυγόνο για την επιβίωση και ανάπτυξή τους, ενώ το οξυγόνο είναι δηλητήριο για τους υποχρεωτικά αναερόβιους μικροοργανισμούς. Οι μικροαερόφιλοι ζουν κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, ενώ οι δυνητικά αναερόβιοι αναπτύσσονται τόσο παρουσία όσο και απουσία οξυγόνου. Επίσης, ως αεροανθεκτικοί χαρακτηρίζονται οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν παρουσία οξυγόνου, χωρίς να το χρησιμοποιούν ως τελικό ηλεκτρονιακό δέκτη.
Για την κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών βάσει των απαιτήσεών τους σε οξυγόνο, χρησιμοποιούνται συστήματα για αναερόβιους μικροοργανισμούς που αποτελούνται από ένα δοχείο που κλείνει ερμητικά (anaerobic jar) και δεν επιτρέπει την είσοδο οξυγόνου, και κασετίνες με υλικά πληρώσεως (γνωστές ως GasPack) που κατακρατούν το οξυγόνο σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ο υπό εξέταση μικροοργανισμός εμβολιάζεται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, και μαζί με την κασετίνα με το υλικό πληρώσεως (Gas Pack) που διαβρέχεται, τοποθετούνται στο ειδικό δοχείο (anaerobic jar) όπου και σφραγίζονται. Μέσα στο πρώτο ημίωρο δεσμεύεται το οξυγόνο, και εκλύεται $CO_2$ και $H_2$, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αναερόβιες συνθήκες. Το υλικό πληρώσεως αποτελείται από $NaBH_4$, $NaHCO_3$ και άλας του κιτρικού οξέος. Τέτοια συστήματα χρησιμοποιούνται και για την ανάπτυξη μικροαερόφιλων μικροοργανισμών, όπου το χρησιμοποιούμενο υλικό πληρώσεως (ίδιας συστάσεως αλλά διαφορετικής αναλογίας) οδηγεί σε ατμόσφαιρα που περιέχει 5-15% οξυγόνο και 5-12% $CO_2$.




**Σχήμα 2.1. Σύστημα για την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών.**

Πειραματική διαδικασία

Θα πραγματοποιηθεί προσδιορισμός των απαιτήσεων στελέχους βακτηρίου σε οξυγόνο. Η πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Παρασκευή 500 ml θρεπτικού υποστρώματος PCA. Η σύσταση του PCA (pH 7) είναι η ακόλουθη:

0.5% w/v πεπτόνη
0.25% w/v εκχύλισμα ζύμης
0.1% w/v γλυκόζη
1.7% w/v άγαρ
Το παρασκευασμένο υλικό αποστειρώνεται και μεταφέρεται σε τρυβλία Petri.

2) Εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού με στέλεχος βακτηρίου, καθώς και με στέλεχος υποχρεωτικά αερόβιου βακτηρίου και δυνητικά αναερόβιου (ή καλύτερα υποχρεωτικά αναερόβιου), με χρήση της μεθόδου των παραλλήλων γραμμών.

3) Τοποθέτηση των τρυβλίων στο ειδικό δοχείο (anaerobic jar).

4) Διαβροχή του Gas Pack με 25 ml $H_2O$ (η ακριβής ποσότητα αναγράφεται στις οδηγίες του προμηθευτή).

5) Σφράγιση του δοχείου και τοποθέτηση σε επωαστικό θάλαμο στους 30$^{o}$C. Οι καλλιέργειες επωάζονται για αρκετό διάστημα.

6) Αξιολόγηση αποτελεσμάτων. Η μη ανάπτυξη του υποχρεωτικά αερόβιου μικροοργανισμού πιστοποιεί τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών, ενώ ο δυνητικά αναερόβιος ή ο υποχρεωτικά αναερόβιος μικροοργανισμός χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας.

# Ενότητα 3: Έλεγχος της μικροβιακής ανάπτυξης.

Για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης χρησιμοποιούνται φυσικοί ή χημικοί παράγοντες που προκαλούν είτε αναστολή της μικροβιακής αύξησης είτε πλήρη θανάτωση του μικροβιακού πληθυσμού. Οι παράγοντες που προκαλούν αναστολή της μικροβιακής αύξησης ονομάζονται μικροβιοστατικοί (βακτηριοστατικοί και μυκητοστατικοί στην περίπτωση των βακτηρίων και των μυκήτων αντίστοιχα), ενώ εκείνοι που προκαλούν θανάτωση του μικροβιακού πληθυσμού καλούνται μικροβιοκτόνοι (βακτηριοκτόνοι και μυκητοκτόνοι στην περίπτωση των βακτηρίων και των μυκήτων αντίστοιχα).

Αποστείρωση είναι η πλήρης θανάτωση του συνόλου του μικροβιακού πληθυσμού σε ένα δείγμα, που επιτυγχάνεται με θέρμανση, ψύξη, ακτινοβολία, με εφαρμογή μικροβιοκτόνων παραγόντων, ή με τεχνικές διήθησης. Παστερίωση είναι η θερμική διαδικασία που αποσκοπεί στη μείωση του μικροβιακού φορτίου σε ένα μέσο (δείγμα) καθώς και στη θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών.

*Σημαντικοί τρόποι αποστείρωσης*

1. Υγρή αποστείρωση: καλείται η παραμονή ενός δείγματος σε αυτόκαυστο πλέον των 15 min υπό πίεση 2.1 atm και θερμοκρασία 121$^{o}$C.
2. Ξηρή αποστείρωση: καλείται η παραμονή ενός δείγματος (κυρίως υάλινων και μεταλλικών σκευών ανθεκτικών σε υψηλές θερμοκρασίες) στους 160$^{o}$C για 2 h ή 170$^{o}$C για 1 h.
3. Αποτέφρωση: εφαρμόζεται θερμοκρασία μεγαλύτερη των 500$^{o}$C που προκαλεί την εξαέρωση της οργανικής ύλης, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων.

Στους παράγοντες που προκαλούν αναστολή της μικροβιακής αύξησης συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων τα αντισηπτικά, τα απολυμαντικά, τα συντηρητικά και τα αντιβιοτικά.

## 3.1. Χρήση αντιβιοτικών.

Η χρήση των αντιβιοτικών είναι εκτεταμένη στην περιβαλλοντική μικροβιολογία, με εφαρμογές σε κλασικές μεθόδους, π.χ. δημιουργία εκλεκτικών υποστρωμάτων και απομόνωση, καθώς και στην μοριακή μικροβιολογία, π.χ. επιλογή αποικιών *Escherichia coli* με ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό λόγω της ύπαρξης γονιδίου ανθεκτικότητας σε πλασμίδιο που μεταφέρουν τα κύτταρα *E. coli*. Αντιβιοτικά καλούνται μη πρωτεϊνικής δομής φυσικές ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που παράγονται κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό του κυττάρου συγκεκριμένων μικροοργανισμών, και προκαλούν αναστολή της μικροβιακής αύξησης, ή ακόμη και πλήρη θανάτωση του μικροβιακού πληθυσμού. Το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming ήταν η πενικιλίνη που παράγεται από τον ασκομύκητα *Penicillium notatum*.

Τα πρώτα αντιβιοτικά παρουσίασαν εντυπωσιακά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά με την εκτεταμένη εφαρμογή η

αποτελεσματικότητά τους μειωνόταν. Σήμερα είναι γνωστό ότι η ανθεκτικότητα ενός μικροοργανισμού έναντι των αντιβιοτικών μπορεί να είναι απόρροια φυσικής επιλογής, μετάλλαξης από παρατεταμένη εφαρμογή αντιβιοτικού, καθώς και αποτέλεσμα μεταφοράς γενετικού υλικού από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό.

Για την επιλογή νέων αντιβιοτικών θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το γεγονός ότι μία ουσία πρέπει να παρουσιάζει επιλεκτική δράση (επιλεκτική τοξικότητα), δηλαδή αφενός να καταπολεμά-αναστέλλει τον παθογόνο μικροοργανισμό και αφετέρου να μην είναι τοξική για τα κύτταρα του οργανισμού που εφαρμόζεται. Τα αντιβιοτικά, ανάλογα με το εύρος δρασεώς τους, διακρίνονται σε ευρέως φάσματος, που αναστέλλουν-θανατώνουν πλήθος Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, και σε περιορισμένου φάσματος, τα οποία προκαλούν την αναστολή της ανάπτυξης συγκεκριμένων κατηγοριών μικροοργανισμών, π.χ. αντιβιοτικά που αναστέλλουν την ανάπτυξη Gram-αρνητικών, αφήνοντας ανέπαφα τα Gram-θετικά βακτήρια.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η χρήση αντιβιοτικών στην περιβαλλοντική μικροβιολογία, αφού χρησιμοποιούνται στην απαρίθμηση και απομόνωση συγκεκριμένων κατηγοριών μικροοργανισμών, στην ταξινόμηση νέων ειδών, και σε εφαρμογές μοριακής μικροβιολογίας.

### 3.2. Μηχανισμός δράσεως των αντιβιοτικών.

Με βάση το μηχανισμό δρασεώς τους, τα αντιβιοτικά ομαδοποιούνται στις εξής κατηγορίες:

**Α) Αναστολείς της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος - αντιβιοτικά β-λακτάμης:** προκαλούν αναστολή του σχηματισμού της πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων, ενώ τα ανθρώπινα ή ζωϊκά κύτταρα που δε διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα παραμένουν ανεπηρέαστα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες.

**Β) Αναστολείς της κυτταρικής μεμβράνης:** προκαλούν αναστολή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης, με αρνητικές επιπτώσεις στη δομή των φωσφολιπιδίων. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η πολυμυξίνη, η οποία παράγεται από το μικροοργανισμό *Bacillus polymyxa* που προκαλεί αναστολή των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Με δεδομένη την ομοιότητα στη βασική δομή της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών, η φαρμακευτική χρήση των αντιβιοτικών αυτών είναι περιορισμένη.

**Γ) Αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης:** παρεμποδίζουν διάφορα στάδια της πρωτεϊνοσύνθεσης, κυρίως τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα ριβοσώματα. Η επιλεκτική δράση τους έγκειται στη διαφοροποίηση που παρουσιάζουν οι προκαρυωτικές έναντι των ευκαρυωτικών ριβοσωμικών υποομάδων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι τετρακυκλίνες, η χλωραμφαινικόλη, η στρεπτομυκίνη κλπ.

**Δ) Αναστολείς της αναπαραγωγικής διαδικασίας:** συνδέονται με τα νουκλεϊκά οξέα, και τελικά προκαλούν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξής. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν αντιβιοτικά όπως η ριφαμπικίνη.

**Πειραματική διαδικασία.**

Α) Εφαρμογή δισκίων αντιβιοτικών.

Παρασκευάζεται στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, κατάλληλο για την ανάπτυξη του προς εξέταση μικροοργανισμού (π.χ. PCA για πλήθος οργανότροφων μικροοργανισμών). Ακολουθεί εμβολιασμός των τρυβλίων με τη μέθοδο της επίστρωσης, και εφαρμογή δισκίων που είναι εμβαπτισμένα σε συγκεκριμένη ποσότητα αντιβιοτικών. Μετά από επώαση, η δημιουργία κενών από βιομάζα, περιμετρικών στα δισκία, ζωνών πιστοποιεί ευαισθησία του μικροοργανισμού σε κάθε ένα από τα αντίστοιχα αντιβιοτικά, ενώ η απουσία τέτοιων ζωνών δηλώνει ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά αυτά.

Β) Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος με αντιβιοτικό.

Για την εφαρμογή των αντιβιοτικών, παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα (stock solution) συγκεντρώσεως συνήθως 100 mg/ml.
Στην συγκεκριμένη άσκηση, θα πραγματοποιηθεί παρασκευή υγρού και στερεού θρεπτικού υποστρώματος LB (Laura-Bertani medium). Η σύσταση του LB είναι η ακόλουθη:

1% w/v πεπτόνη
0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης
1% w/v NaCl
ενώ για την παρασκευή στερεού υποστρώματος θα γίνει προσθήκη 1.7% w/v άγαρ.

Κατόπιν αποστειρώσεως, θα ακολουθήσει προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πυκνού διαλύματος αντιβιοτικού (εδώ αμπικιλλίνη) που θα πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία 45$^{o}$C για το στερεό υπόστρωμα (δηλαδή λίγο πριν την στερεοποίηση του υποστρώματος, έτσι ώστε το αντιβιοτικό να υποστεί τη λιγότερη δυνατή θερμική διάσπαση), και σε θερμοκρασία δωματίου για το υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Η τελική συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υπόστρωμα μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πυκνού διαλύματος αντιβιοτικού θα είναι 100 μg/ml.
Τέλος, ακολουθεί εμβολιασμός με στέλεχος μικροοργανισμού που θα υποδειχθεί, και επώαση αυτού. Εμφάνιση θολότητας σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ή βιομάζας σε στερεό θρεπτικό υλικό, υποδεικνύει ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στο υπό εξέταση αντιβιοτικό.

# Ενότητα 4: Θρεπτικά υποστρώματα.

Θρεπτικό υπόστρωμα, ή θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, ή θρεπτικό υλικό καλείται οποιοδήποτε υγρό ή στερεό υλικό που περιέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη πολλών ή συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών.

Τα θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να προσομοιάζουν το φυσικό περιβάλλονο στο οποίο αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί (π.χ. στερεά υποστρώματα που περιέχουν διαλυτά συστατικά του εδάφους), ή να πληρούν τις ανάγκες πλήθους μικροοργανισμών (Potato dextrose agar-PDA για την ανάπτυξη μυκήτων) ή τις ανάγκες μίας συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών ή ενός μικροοργανισμού.

Τα περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα περιέχουν α) νερό που αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του βάρους των κυττάρων, β) ενώσεις του άνθρακα που το κύτταρο τις χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα (αποτελεί το δομικό συστατικό των πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων) και ενέργειας (παραγωγή ενέργειας από τον καταβολισμό οργανικών ενώσεων και σχηματισμό μορίων ATP), γ) ανόργανες (νιτρικά και αμμωνιακά άλατα) και οργανικές ενώσεις (πεπτόνη κ.α.) του αζώτου που χρησιμοποιούνται στον αναβολισμό αμινοξέων και νουκλεϊνικών οξέων, δ) αυξητικούς παράγοντες, όπως βιταμίνες που είναι συμπαράγοντες ενζυμικών συστημάτων-συνένζυμα, πουρίνες-πυριμιδίνες που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση του DNA, και αμινοξέα απαραίτητα για την πρωτεϊνοσύνθεση. Τέλος, χρησιμοποιούνται ανόργανα άλατα, όπως φωσφορικά που εκτός της ρυθμίσεως του pH χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις φωσφορυλίωσης, άλατα του νατρίου, καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου, καθώς και ιχνοστοιχεία, όπως Mn, Fe, Cu, Co και Mo που χρησιμοποιούνται σε ελάχιστες ποσότητες ως συμπαράγοντες ενζυμικών συστημάτων.

## 4.1. Κατηγορίες-Διαχωρισμός θρεπτικών υποστρωμάτων.

### 4.1.1. Υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο.

Τα θρεπτικά υποστρώματα διακρίνονται σε υγρά (liquid media ή broth) και στερεά (solid media, agar plates). Η παρασκευή στερεών υποστρωμάτων πραγματοποιείται με προσθήκη άγαρ, ενός πολυσακχαρίτη που παράγεται από θαλάσσια φύκη. Αιωρήματα περιεκτικότητας 1.5-2% σε άγαρ ρευστοποιούνται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80-90$^{o}$C, ενώ στερεοποιούνται σε θερμοκρασία περίπου 40$^{o}$C. Τα στερεά υποστρώματα χρησιμοποιούνται στην απαρίθμηση, απομόνωση και ανακαλλιέργεια μικροοργανισμών, ενώ τα υγρά χρησιμοποιούνται στη μελέτη της κυτταρικής αύξησης, των φυσιολογικών, χημειοταξινομικών και γενετικών χαρακτηριστικών διαφόρων μικροοργανισμών.

### 4.1.2. Με βάση την σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος.

Διακρίνονται σε:

**Α) Φυσικά ή εμπειρικά**, όπου χρησιμοποιούνται φυσικά υλικά ή εκχυλίσματα φυτικής ή ζωϊκής προέλευσης, και επομένως η σύσταση τους δεν είναι γνωστή (π.χ. θρεπτικό μέσο με εκχύλισμα εδάφους).

**Β) Συνθετικά**, τα οποία παρασκευάζονται εργαστηριακά με την ζύγιση συγκεκριμένων συστατικών (π.χ PDB, LB, NB). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα καθορισμένης συστάσεως θρεπτικά υποστρώματα (defined media) που αποτελούνται από διαλύματα αλάτων συγκεκριμένης συστάσεως και μία συγκεκριμένη οργανική ένωση γνωστής συγκεντρώσεως ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (π.χ. M9 medium).

### 4.1.3. Με βάση την εξειδίκευση στην ανάπτυξη διαφόρων ειδών μικροοργανισμών.

**Α) Θρεπτικά υποστρώματα γενικής συστάσεως:** Περιέχουν συστατικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη πλήθους ειδών μικροοργανισμών. Τα θρεπτικά συστατικά δεν είναι γνωστά, αφού συνήθως προκύπτουν από την ενζυματική υδρόλυση συστατικών φυτικής και ζωϊκής προέλευσης, καθώς και από εκχύλισμα ζύμης. Έτσι απελευθερώνεται πλήθος αμινοξέων, βιταμινών, και άλλων ενώσεων που καλύπτουν τις θρεπτικές απαιτήσεις διαφόρων ταξινομικών ομάδων.

**Β) Εξειδικευμένα θρεπτικά υποστρώματα**: Η σύνθεσή τους ευνοεί την ανάπτυξη μίας συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών, ή/και παρεμποδίζει τις υπόλοιπες ταξινομικές ομάδες σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Τα υλικά αυτά χρησιμοποιούνται για την απαρίθμηση και απομόνωση συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών (π.χ. TCBS Agar για *Vibrio* spp.). Η εξειδίκευση συνήθως οφείλεται στην προσθήκη κάποιου αντιβιοτικού, στην προσθήκη μίας συγκεκριμένης πηγής άνθρακα, ή στην αλλαγή του pH και της αλατότητας.

### Πειραματική διαδικασία.

Θα πραγματοποιηθεί παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB για βακτήρια και στερεού θρεπτικού υποστρώματος PDA για μύκητες (συμπεριλαμβανομένων των ζυμών). Η πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Παρασκευή 200 ml θρεπτικού υποστρώματος LB. Η σύσταση του LB (pH 7) είναι η ακόλουθη:

1% w/v πεπτόνη
0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης
1% w/v NaCl

Το παρασκευασμένο υλικό διανέμεται ισόποσα σε κωνικές φιάλες των 250 ml που καλύπτονται με πώμα υδρόφοβου βάμβακος. Κατόπιν, το υγρό θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται για 20 min και εμβολιάζεται με γνωστό στέλεχος βακτηρίου.

2) Παρασκευή 500 ml θρεπτικού υποστρώματος PDA (3.9% w/v PDA). Το θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται για 20 min, στερεοποιείται για κατάλληλο χρονικό διάστημα, και εμβολιάζεται με γνωστό στέλεχος μύκητα.

# Ενότητα 5: Χρώσεις μικροοργανισμών σε συστήματα ενεργού ιλύος.

Για την κατανόηση των μικροβιολογικών χρώσεων απαιτείται η γνώση βασικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των χρωστικών. Οι χρωστικές είναι άλατα, των οποίων το ένα από τα δύο ιόντα είναι χρωμοφόρο. Για παράδειγμα, η χρωστική μπλε του μεθυλενίου είναι άλας που αποτελείται από μπλε του μεθυλενίου (υπεύθυνο για το χρώμα) και ιόν χλωρίου (άχρωμο). Εάν το χρωμοφόρο είναι ένα θετικά φορτισμένο ιόν, η χρωστική χαρακτηρίζεται ως βασική (π.χ μπλε του μεθυλενίου, σαφρανίνη κ.α.), ενώ αν το χρωμοφόρο είναι ένα αρνητικά φορτισμένο ιόν, η χρωστική είναι όξινη (π.χ. Congo red).

Οι βασικές χρωστικές, λόγω του αρνητικού φορτίου των κυττάρων, ενώνονται με κύτταρα και τα χρωματίζουν, και η χρώση αυτή καλείται άμεση χρώση. Αντιθέτως, στην περίπτωση των όξινων χρωστικών, το χρωμοφόρο δεν ενώνεται με τα κύτταρα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παραμένουν άχρωμα, το δε περιβάλλον αυτών να χρωματίζεται. Έτσι, δημιουργείται αντίθεση μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος, οπότε διευκολύνεται η μικροσκόπηση. Η χρώση αυτή είναι γνωστή ως έμμεση χρώση.

Η χρώση επίσης διακρίνεται σε απλή και διαφορική. Στην απλή χρώση χρησιμοποιείται μία μόνο χρωστική (συνήθως βασική χρωστική), διευκολύνοντας την μικροσκοπική παρατήρηση, λόγω μεγαλύτερης αντίθεσης του ειδώλου. Αντίθετα, η διαφορική χρώση κυττάρων χρησιμοποιείται για την ταξινομική διάκριση ομάδων μικροοργανισμών, π.χ. χρώση Gram. Η διαφορική χρώση στηρίζεται στην εφαρμογή διαφορετικών χρωστικών, καθώς και στη διαφορετική σύσταση και φύση κυτταρικών δομών μεταξύ διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών.

## 5.1. Χρώση Gram.

Η χρώση αυτή προτάθηκε από τον Hans Christian Gram το 1884, και χρησιμοποιείται για τη διάκριση των βακτηρίων σε δύο κατηγορίες, στα Gram-θετικά και τα Gram-αρνητικά βακτήρια. Η διάκριση στηρίζεται στη διαφορετική κυτταρική δομή των μικροοργανισμών αυτών, αφού στην περίπτωση των Gram-θετικών έχουμε ένα παχύ εξωτερικό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ στα Gram-αρνητικά έχουμε μία εξωτερική μεμβράνη ακολουθούμενη από ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά την χρώση Gram χρησιμοποιούνται μία αρχική βασική χρωστική, ένα στερεωτικό μέσο, ένας παράγοντας αποχρωματισμού (οργανικός διαλύτης) και μία δεύτερη βασική χρωστική γνωστή ως χρωστική αντίθεσης.

Αρχικά, τόσο τα Gram-θετικά όσο και τα Gram-αρνητικά βακτήρια χρωματίζονται μπλε με την εφαρμογή του κρυσταλλικού ιώδους, αλλά κατά την έκπλυση με αλκοόλη ή ακετόνη (καθοριστικό στάδιο της διαδικασίας), η εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών που είχε χρωματιστεί μπλε απομακρύνεται και τα κύτταρα αποχρωματίζονται, ενώ το εξωτερικό στρώμα πεπτιδογλυκάνης των Gram-θετικών συγκρατεί το μπλε χρώμα. Κατά την χρώση με τη δεύτερη χρωστική

(σαφρανίνη), τα Gram-θετικά παραμένουν μπλε, ενώ τα αποχρωματισμένα από τον οργανικό διαλύτη Gram-αρνητικά κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα.

**Πειραματική διαδικασία.**

Για την χρώση Gram πραγματοποιούνται τα ακόλουθα βήματα:

1) Παραλαβή μεικτού υγρού από βιολογικό καθαρισμό.

2) Προσήλωση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα: Αιώρημα κυττάρων (1-2 σταγόνες) τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, και με απαλές κινήσεις πάνω από φλόγα πραγματοποιείται εξάτμιση του νερού και καθήλωση των κυττάρων στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας.

3) Προσθήκη κρυσταλλικού ιώδους (2 g κρυσταλλικό ιώδες και 0.8 g οξαλικό αμμώνιο σε 100 ml 20% v/v διαλύματος αιθυλικής αλκοόλης) και εφαρμογή για 1 min (αρχική χρώση).

4) Προσθήκη αντιδραστηρίου lugol (1 g $I_2$ και 2 g KI σε 300 ml απιονισμένου ύδατος) και εφαρμογή για 1 min (στερεωτική ουσία).

5) Έκπλυση με νερό.

6) Αποχρωματισμός με ακετόνη ή αιθανόλη.

7) Έκπλυση με νερό.

8) Μεταχρωματισμός με σαφρανίνη για 30 sec (10 ml 2.5% w/v σαφρανίνη σε 95% αιθανόλη + 100 ml απιονισμένου ύδατος).

9) Έκπλυση με νερό.

10) Μικροσκοπική παρατήρηση.

## 5.2. Χρώση Neisser.

Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται για την εύρεση αποθηκευτικών χώρων πολυφωσφορικού σε κύτταρα, και εφαρμόζεται στην ταυτοποίηση νηματοειδών μικροοργανισμών στην ενεργό ιλύ. Επίσης, χρησιμοποιείται για την παρατήρηση μικροοργανισμών που προκαλούν εκτεταμένη βιολογική απομάκρυνση φωσφορικού, γνωστών ως Polyphosphate Accumulating Organisms (PAOs).

**Πειραματική διαδικασία.**

Για την χρώση Neisser πραγματοποιούνται τα ακόλουθα βήματα:

*Παρασκευή Διαλύματος Μπλε του μεθυλενίου (Διάλυμα Α).*
Μπλε του μεθυλενίου 0.1 g
π. Οξικό οξύ 5 ml
Αιθανόλη 5 ml
Συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό έως τα 100 ml.

*Παρασκευή Διαλύματος Κρυσταλλικού ιώδους (Διάλυμα Β).*
Κρυσταλλικό ιώδες (10% w/v σε αιθανόλη) 3.3 ml
Αιθανόλη 6.7 ml
Συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό έως τα 100 ml.

*Παρασκευή Διαλύματος χρυσοϊδίνης (chrysoidine).*
Χρυσοϊδίνη Υ (1% w/v σε απιονισμένο $H_2O$) 33.3 ml.
Συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό έως τα 100 ml.

Προ της εφαρμογής, τα διαλύματα Α και Β αναμιγνύονται σε αναλογία 2:1, v/v.

Ακολουθείται η εξής πορεία:

1) Παραλαβή μεικτού υγρού από βιολογικό καθαρισμό.

2) Προσήλωση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα: Αιώρημα κυττάρων (1-2 σταγόνες) τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, και με απαλές κινήσεις πάνω από φλόγα πραγματοποιείται εξάτμιση του νερού και καθήλωση των κυττάρων στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας.

3) Προσθήκη διαλύματος Α+Β (2:1, v/v) και εφαρμογή για 15 sec.

4) Προσθήκη διαλύματος χρυσοϊδίνης και εφαρμογή για 45 sec.

5) Έκπλυση με νερό.

6) Μικροσκοπική παρατήρηση.

Neisser-αρνητικά κύτταρα χρωματίζονται απαλά καφέ ή κίτρινα. *Nostocoida limicola* ή Type 0092 χρωματίζονται γκρι-ιώδη. Νηματοειδή βακτήρια που σχηματίζουν αποθηκευτικούς χώρους πολυφωσφορικού χρωματίζονται μπλε και χαρακτηρίζονται ως Neisser-θετικά.

**5.3. Χρώση με μπλε του μεθυλενίου.**

Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται για τη διάκριση ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Επίσης, επιτρέπει την επιβεβαίωση της παρουσίας αποθηκευτικών χώρων πολυφωσφορικού στα κύτταρα, σε συστήματα εκτεταμένης βιολογικής αφαίρεσης φωσφόρου.

**Πειραματική διαδικασία.**

Για την χρώση με μπλε του μεθυλενίου πραγματοποιούνται τα ακόλουθα βήματα:

*Παρασκευή Διαλύματος Μπλε του μεθυλενίου*

| | | |
|---|---|---|
| Μπλε του μεθυλενίου | 0.01 | g |
| Κιτρικό νάτριο | 2 | g |

Συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό έως τα 100 ml.

Ίση ποσότητα καλλιέργειας και διαλύματος μπλε του μεθυλενίου αναμιγνύονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατηρούνται σε αιματοκυτόμετρο. Τα νεκρά κύτταρα επιτρέπουν, λόγω της διάρρηξης της μεμβράνης, την είσοδο της χρωστικής και το χρωματισμό των νεκρών κυττάρων ως μπλε.

# Ενότητα 6: Βασικές μικροβιολογικές δοκιμές ταυτοποίησης.

Για την πλήρη ταυτοποίηση ενός μικροοργανισμού απαιτείται μελέτη των μορφολογικών, βιοχημικών, χημειοταξινομικών και γενετικών χαρακτηριστικών αυτού. Εκτός της εξέτασης των μορφολογικών χαρακτηριστικών ενός μικροοργανισμού, η μελέτη διαφόρων φυσιολογικών-βιοχημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων ενός μικροοργανισμού επιτρέπει το βασικό χαρακτηρισμό αυτού. Για να επιτευχθεί η ταυτοποίηση ενός μικροοργανισμού απαιτείται η ύπαρξη καθαρής καλλιέργειας, δηλαδή η ύπαρξη κυττάρων ενός μόνο μικροβιακού στελέχους σε ένα θρεπτικό μέσο. Επίσης, από τις αρχές της δεκαετίας του ’90, έχουν αναπτυχθεί διαγνωστικά kit που επιτρέπουν εύκολα τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πλήθους φυσιολογικών-βιοχημικών χαρακτηριστικών μίας καθαρής καλλιέργειας. Συνήθως, επιτρέπουν τον προσδιορισμό πλέον των 20 φυσιολογικών χαρακτηριστικών (ο αριθμός αυτός μπορεί να ανέρθει ως τα 100) σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 4 ημερών. Ακολουθούν αναλυτικά ευρέως διαδεδομένες μικροβιολογικές δοκιμές, καθώς επίσης και μικροβιολογικές δοκιμές χρησιμοποιούμενες σε συστήματα ενεργού ιλύος.

## 6.1. Βασικές μικροβιολογικές δοκιμές.

### 6.1.1. Η δοκιμή της καταλάσης.

Η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από μικροοργανισμούς πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου καταλάση, όπως περιγράφεται στην παρακάτω βιοχημική αντίδραση. Το ένζυμο καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο που απαντάται σε οργανισμούς που ζουν σε συνθήκες οξυγόνου, προστατεύοντας αυτούς από την υψηλή δραστηριότητα του σχηματιζόμενου από τις οξειδώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου.

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{καταλάση}} H_2O + \tfrac{1}{2} O_2 (\uparrow)$$

Αναλυτικά, 1-2 σταγόνες 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου (οξυζενέ) τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αναμειγνύονται με κατάλληλη ποσότητα καλλιέργειας. Μετά από διάστημα 1-5 λεπτών, η ύπαρξη φυσαλίδων στο αιώρημα υποδηλώνει την ύπαρξη του ενζύμου καταλάση.

### 6.1.2. Η δοκιμή της οξειδάσης.

Η δοκιμή της οξειδάσης πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί αν ένας μικροοργανισμός περιέχει οξειδάσες του κυτοχρώματος c. Για την δοκιμή της οξειδάσης χρησιμοποιούνται οι συμπλεκομετρικοί δείκτες N,N,N′,N′-τετραμέθυλο-p-φαινυλενεδιαμίνη ή N,N-διμέθυλο-p-φαινυλενεδιαμίνη, που οι οξειδωμένες τους μορφές είναι μπλε, ενώ οι ανηγμένες τους μορφές είναι άχρωμες.

Έτσι, τα βακτηριακά στελέχη διακρίνονται σε οξειδάση-θετικά και οξειδάση-αρνητικά. Θετική αντίδραση οξειδάσης υποδεικνύει ότι ένα βακτήριο περιέχει οξειδάση του κυτοχρώματος c, και χρησιμοποιεί το οξυγόνο για παραγωγή ενέργειας μέσω μίας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Παράδειγμα στελεχών που δίδουν θετική αντίδραση οξειδάσης είναι τα μέλη της οικογένειας *Pseudomonadaceae*, ενώ παράδειγμα οξειδάση-αρνητικών βακτηρίων είναι τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*.

Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει διαβροχή διηθητικού χάρτου με σταγόνες διαλύματος 1% w/v N,N,N′,N′-τετραμέθυλο-p-φαινυλενεδιαμίνης, και μεταφορά βιομάζας στην διαβρεγμένη επιφάνεια. Μετά από σύντομο χρονικό διάστημα (μερικά δευτερόλεπτα έως 5 λεπτά), η εμφάνιση μπλε-μωβ χρώματος στην διαβρεγμένη επιφάνεια πιστοποιεί θετική αντίδραση οξειδάσης.

### 6.1.3. Υδρόλυση της καζεΐνης.

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από διάφορα αμινοξέα που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας μακριές αλυσίδες. Πολλά βακτήρια υδρολύουν πλήθος πεπτιδικών δεσμών διαφόρων πρωτεϊνών σε ολιγονουκλεοτίδια και εν τέλει σε αμινοξέα, που τα χρησιμοποιούν για σύνθεση των δικών τους πρωτεϊνών-ενζύμων και άλλων μορίων, καθώς και για παραγωγή ενέργειας. Η υδρόλυση των πρωτεϊνών, που καλείται πρωτεόλυση, πραγματοποιείται από ένζυμα που ονομάζονται πρωτεάσες.

Η καζεΐνη είναι μία πρωτεΐνη του γάλακτος, υπεύθυνη για το άσπρο χρώμα του γάλακτος, η δε πρωτεόλυση αυτής πραγματοποιείται από το ένζυμο καζεϊνάση, μία εξωκυτταρική πρωτεάση που υδρολύει την καζεΐνη. Η δοκιμή περιλαμβάνει ανάπτυξη σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα “milk agar” (για ένα λίτρο θρεπτικό: 5.0 g πεπτόνη, 2.5 g εκχύλισμα ζύμης, 1.0 g γλυκόζη, 50 g σκόνη γάλακτος -χωρίς αντιβιοτικά- και 17 g άγαρ). Αν ένας μικροοργανισμός εκκρίνει το ένζυμο καζεϊνάση, τότε θα εμφανιστεί μία μη θολή ζώνη στο σημείο εμβολιασμού.

### 6.1.4. Υδρόλυση του αμύλου.

Το άμυλο, ένα διακλαδιζόμενο πολυμερές, είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες γλυκόζης συνδεδεμένες με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αν και η γλυκόζη είναι ευκόλως αφομοιώσιμη πηγή άνθρακα και ενέργειας, το άμυλο, εξαιτίας του μεγάλου μοριακού του βάρους, δεν είναι δυνατόν να εισέλθει στο κύτταρο και να καταβολιστεί. Εντούτοις, πολλοί μικροοργανισμοί που ονομάζονται αμυλολυτικοί περιέχουν το ένζυμο αμυλάση, που προκαλεί διάσπαση-υδρόλυση των πολλαπλών γλυκοζιτικών δεσμών και απελευθέρωση εν τέλει μορίων γλυκόζης. Η δοκιμή περιλαμβάνει ανάπτυξη σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα “starch agar” (θρεπτικό υλικό Nutrient agar - παρασκευασμένο ακολουθώντας τις οδηγίες συσκευασίας- και 0.4% w/v υδατοδιαλυτό άμυλο). Μετά από επώαση, αν ένας μικροοργανισμός διαθέτει το

ένζυμο αμυλάση τότε θα εμφανιστεί κατά την εφαρμογή διαλύματος Lugol (1 g $I_2$ και 2 g KI σε 300 ml απιονισμένου ύδατος) μία άχρωμη-μη θολή ζώνη στο σημείο εμβολιασμού, ενώ σε περίπτωση απουσίας του ενζύμου αμυλάση, το εμβολιασμένο υπόστρωμα χρωματίζεται μπλε-καφέ.

### 6.1.5. Υδρόλυση λιπιδίων.

Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να διασπούν τα λίπη-λιπίδια (τριεστέρες της γλυκερόλης) σε γλυκερόλη και ελεύθερα οργανικά οξέα, και ονομάζονται λιπολυτικοί. Η υδρόλυση των εστερικών δεσμών επιτυγχάνεται με τη δράση εξειδικευμένων ενζύμων, που ονομάζονται λιπάσες. Για να διαπιστωθεί εάν ένας οργανισμός έχει λιπολυτική δράση, χρησιμοποιούνται θρεπτικά υποστρώματα στα οποία έχει προστεθεί κάποια λιπαρή ουσία, π.χ. τριβουτυρίνη, καλαμποκέλαιο, ελαιόλαδο, φυστικέλαιο κ.α. Ευρύτατα διαδεδομένη είναι η χρήση τριβουτυρίνης (τριεστέρας της γλυκερόλης με τρία μόρια βουτυρικού οξέος) κατά την εφαρμογή της δοκιμής. Η δοκιμή περιλαμβάνει ανάπτυξη σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα "tributyrin agar" (για ένα λίτρο θρεπτικό: 2.5 g πεπτόνη, 3 g εκχύλισμα ζύμης, 17 g άγαρ και 10 ml tributyrin). Μετά από επώαση, αν ένας μικροοργανισμός διαθέτει λιπάσες τότε θα εμφανιστεί μία καθαρή-μη θολή ζώνη στο σημείο εμβολιασμού, ενώ σε περίπτωση απουσίας λιπολυτικής δράσης, το εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό θα παραμείνει θολό.

## 6.2. Μικροβιολογικές δοκιμές χρησιμοποιούμενες σε συστήματα ενεργού ιλύος.

### 6.2.1. Χρώση PHA.

Πολυ-υδρόξυ-αλκανοειδή (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) είναι ευθύγραμμα βιοπολυμερή που συνθέτονται από πλήθος μονομερών (πλέον των 150 διαφορετικών μορίων έχουν ανιχνευθεί στην δομή τους), ως αποτέλεσμα του ζυμωτικού μεταβολισμού πλήθους βακτηρίων, και χρησιμοποιούνται από τα βακτηριακά κύτταρα για την αποθήκευση άνθρακα και ενέργειας. Ιδιαίτερη είναι η σημασία τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως στην παραγωγή βιοπολυμερών, καθώς και σε συστήματα βιολογικής αποφωσφόρωσης.

Για την πραγματοποίηση της χρώσης αυτής χρησιμοποιείται διάλυμα 0.3% w/v χρωστικής sudan black (σε 60% αιθανόλη) και διάλυμα 0.5% w/v σαφρανίνης. Μετά την τοποθέτηση της ενεργού ιλύος σε αντικειμενοφόρο πλάκα και την προσήλωση των κυττάρων, προστίθεται διάλυμα χρωστικής sudan black για διάστημα 10 min, ενώ ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό και προσθήκη διαλύματος σαφρανίνης για 10 sec. Μετά από μικροσκόπηση με τη βοήθεια του ελαιοκαταδυτικού φακού, η ύπαρξη μπλε-μαύρων κόκκων στις νιφάδες υποδεικνύει θετική χρώση.

### 6.2.2. Δοκιμή του θείου (S test).

Για τη διεξαγωγή της δοκιμής του θείου, αναμειγνύονται 5 ml ενεργού ιλύος με δύο κόκκους ένυδρου στερεού $Na_2S$. Κατόπιν αυτού, το προς εξέταση δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα 20 min. Ακολουθεί προσθήκη δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα, και μικροσκοπική παρατήρηση. Η παρουσία κίτρινων συσσωματωμάτων πιστοποιεί την ύπαρξη εγκλείστων θείου. Το αποτέλεσμα της δοκιμής αυτής χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση νηματοειδών βακτηρίων που εμπλέκονται σε φαινόμενα διόγκωσης ιλύος και αφρισμού, σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

### 6.2.3. Δοκιμή της ινδικής μελάνης (Indian ink test).

Για την εκτέλεση της δοκιμής με ινδική μελάνη (India ink), πραγματοποιείται ανάμειξη 10 μl μελάνης και 150 μl ενεργού ιλύος, ακολουθούμενη από μικροσκόπηση. Στην περίπτωση που η χρωστική διαπερνά τις υφές της νιφάδος, η δοκιμή είναι θετική. Το αποτέλεσμα της δοκιμής αυτής χρησιμοποιείται στον χαρακτηρισμό των νιφάδων που σχηματίζονται σε συστήματα βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

# ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ ΜΕ ΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

## 1. Η ΥΦΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ

Η ενεργός λάσπη είναι ο ουσιαστικός φορέας των βιολογικών διαδικασιών καθαρισμού. Στην βιομάζα της εκδηλώνεται το ενζυματικό δυναμικό, που απαιτείται για την μετατροπή των μεγαλομοριακών ενώσεων στα επιθυμητά ανόργανα τελικά συστατικά της επεξεργασίας των λυμάτων.

Πέραν τούτου δρουν οι νιφάδες και ως επιφάνειες προσρόφησης, πάνω στις οποίες βιολογικός αδιάφορα σώματα μπορούν να δεθούν. Η φυσική, χημική και βιολογική υφή της βιομάζας επηρεάζεται από την υφή των λυμάτων και την μέθοδο καθαρισμού τους. Γι' αυτό μπορεί να διαφέρει από μονάδα σε μονάδα και μέσα στην ίδια την μονάδα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

### 1.1 Η φυσικοχημική υφή της ενεργού ιλύος

Προϋπόθεση για την λειτουργία του συστήματος της ενεργού ιλύος είναι ο διαχωρισμός της βιομάζας από το καθαρό νερό, δια της καθίζησης, στην δεξαμενή καθίζησης. Για τον λόγο αυτό αναπτύσσονται και διατηρούνται στην ενεργό λάσπη μόνο αυτοί οι μικροοργανισμοί, που σχηματίζουν νιφάδες που μπορούν να καθιζάνουν και χρησιμοποιούν αυτούς ως χώρο του κύκλου ζωής των. Η ενεργός λάσπη αποτελείται από ακανόνιστα σχηματισμένες νιφάδες, με μία διάμετρο ανάμεσα στα 50-1000 μm και ένα ειδικό βάρος πάνω από 1.

Η χημική σύνθεση της ενεργού λάσπης ορίζεται από την βιομάζα την ίδια (βακτήρια, πρωτόζωα, μύκητες κλπ) και από οργανικές (οργανικές ίνες, άμυλο κλπ) και ανόργανες (ανθρακικά και φωσφορικά άλατα, υδροξείδια μετάλλων) εναποθέσεις και αποθηκεύσεις. Η συμμετοχή των ξεχωριστών μετόχων εξαρτάται από την φόρτιση της λάσπης (υψηλή φόρτιση λάσπης = μεγάλη συμμετοχή οργανισμών), από την υφή των λυμάτων και τον βαθμό απόδοσης της πρωτοβάθμιας καθίζησης. Σε μονάδες που δεν συμπεριλαμβάνουν πρωτοβάθμια καθίζηση (οξειδωτικές τάφροι) η ενεργός λάσπη περιέχει ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανων και αδιάφορων οργανικών ενώσεων. Αναλυτικά μπορούμε να υπολογίσουμε τις οργανικές ενώσεις με την πύρωση της λάσπης. Οι οργανικές στερεές ύλες κυμαίνονται ανάμεσα στα 35% και 85% , σε μονάδες με πρωτοβάθμια καθίζηση ανάμεσα σε 70% και 75%. Με αυτή την μέτρηση όμως δεν γίνεται διαχωρισμός ανάμεσα στην ενεργή βιομάζα και τις νεκρές οργανικές ύλες. Μια πρώτη ένδειξη της ενεργής βιομάζας παίρνουμε από τον προσδιορισμό του αζώτου ο οποίος βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά σε οργανική μορφή και με περίπου 6-8% αντιπροσωπεύει το τμήμα των λευκωμάτων. Άλλες μέθοδοι είναι ο προσδιορισμός του DNA και της συγκέντρωσης του ATP.

## 1.2 Η βιολογική υφή της ενεργού ιλύος

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί στα λύματα που εισέρχονται σε έναν βιολογικό καθαρισμό είναι βακτήρια (ανθρωπογενούς καταγωγής). Άλλοι μικροοργανισμοί προέρχονται από τα επιφανειακά ύδατα και τον αέρα. Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν πολύ ανθεκτικά στάδια (σπόρους, κύστες) και πρακτικά να μεταδοθούν παντού. Μόλις βρουν ξανά συνθήκες να αναπτυχθούν, επανέρχονται σε ενεργές μορφές (διατροφής και πολλαπλασιασμού).

Στους βιολογικούς καθαρισμούς εφαρμόζονται τεχνητά, εκείνες οι συνθήκες που επικρατούν στην φύση και συντελούν στον καθαρισμό των λυμάτων. Με την βοήθεια τεχνητών μέσων δημιουργούνται οι καλύτερες συνθήκες (παροχή οξυγόνου, pH, θερμοκρασία, τροφή) για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί διασπούν κατά την αναπνοή τους τις μεγαλομοριακές οργανικές ενώσεις σε ενεργητικά χαμηλότερα τελικά προϊόντα όπως $CO_2$, $H_2O$ και πολλαπλασιάζονται. Στην λάσπη συσσωρεύονται οι ρύποι (π.χ. βαρέα μέταλλα) και θρεπτικά υλικά, τα οποία απομακρύνονται από το σύστημα με την περίσσεια λάσπη. Η κοινωνία των μικροοργανισμών ζει σε μονάδες χώρου, όπως οι νιφάδες. Σε αυτές εναποθέτονται βακτήρια με το βλεννώδες περίβλημα τους πάνω σε ανόργανα υλικά. Η συνεχόμενη κυτταρική διαίρεση των βακτηρίων οδηγεί τελικά σε σταδιακή αύξηση των κυτταρικών αποικιών μέχρι να είναι ορατή η νιφάδα λάσπης. Οι νιφάδες έχουν συνήθως μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το νερό και μπορούν στις δεξαμενές καθίζησης να διαχωριστούν από αυτό.

Στην διαδικασία καθαρισμού τα βακτήρια είναι αυτά που διεξάγουν την κυριότερη εργασία. Από τα βακτηρία τρέφονται μονοκύτταροι και πολυκύτταροι μικροοργανισμοί, οι οποίοι με την σειρά τους τρώγονται από άλλους μεγαλύτερους οργανισμούς.

Στο σύστημα ενεργούς ιλύος οι νιφάδες διατηρούνται σε αιώρηση, με την βοήθεια αναδευτήρων. Η βακτηριακή μάζα οδηγείται στην δεξαμενή καθίζησης και καθιζάνει. Ένα μέρος της λάσπης απομακρύνεται από το σύστημα ενώ το μεγαλύτερο μέρος οδηγείται ξανά στην δεξαμενή αερισμού.

Μέσα στην βιοκοινωνία των μικροοργανισμών υπάρχουν διαφορετικά διατροφικά συστήματα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με τις τροφικές αλυσίδες. Τα βακτήρια διεξάγουν την μεγαλύτερη εργασία καθαρισμού. Σε μία νιφάδα ζουν οι πιο διαφορετικοί μικροοργανισμοί μαζί, σε πολύ μικρό χώρο, και ανταλλάσσουν σε μικρές διαδρομές τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναπνοής τους. Έτσι αυξάνει η περίμετρος των νιφάδων περισσότερο. Εδώ υπάρχουν βακτηριοφάγα μονοκύτταρα, κυρίως βλεφαριδωτά (Ciliaten) και μικρότερα πολυκύτταρα όπως τα βδελλοειδή τροχόζωα (Rotifer), που τρέφονται από τους μονοκύτταρους οργανισμούς (πρωτεύοντες καταναλωτές). Οι πρωτεύοντες καταναλωτές τρώγονται από τους δευτερεύοντες καταναλωτές (ληστές). Τέτοια είναι τα ελεύθερα βλεφαριδωτά (Litonotus), σταθερά βλεφαριδωτά (Suctorien) και προνύμφες εντόμων (Psychoda Larve).

Διακρίνουμε δύο τροφικούς τύπους στους πρωτεύοντες καταναλωτές: τους διηθητές και τους βοσκούς. Οι διηθητές είναι τις περισσότερες φορές σταθερά τοποθετημένοι πάνω στην νιφάδα (διακλαδισμένα και μη βλεφαριδωτά) και στροβιλίζουν τα ελεύθερα κινούμενα βακτήρια μέσα τους με την βοήθεια των βλεφάρων τους. Τα τροχόζωα (ελεύθερα κολυμπόντα βλεφαριδωτά) φιλτράρουν επίσης την τροφή τους. Οι έρποντες οργανισμοί αντίθετα περπατούν ή αιωρούνται πάνω σε μεγάλες νιφάδες και λύνουν κομμάτια της επιφάνειας της νιφάδας.

Η ποσότητα και η σύνθεση όλων των οργανισμών δεν ρυθμίζεται μόνο από τους ανταγωνιστικούς οργανισμούς, αλλά σχεδόν αποκλειστικά από τους συσχετισμούς μέσα στις διάφορες βακτηριακές ομάδες και δια των ιδιαίτερων εξωτερικών, τοπικών και τεχνολογικών συνθηκών. Έτσι είναι δυνατόν από την μικροσκοπική εικόνα να βγάλουμε συμπεράσματα για συγκεκριμένες συνθήκες (όπως π,χ, είδος λυμάτων, φόρτιση, ηλικία λάσπης, τροφοδοσία με οξυγόνο κλπ) στην διαδικασία καθαρισμού στον βιολογικό καθαρισμό.

## 2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

### Μηχανικοί συντελεστές

Μέγεθος και μορφή της νιφάδας καθορίζονται από τον υπάρχοντα στροβιλισμό. Ο πυρήνας της νιφάδας λάσπης, που είναι κατά κανόνα ανόργανος, επηρεάζει με την σύνθεση του, το μέγεθος του κόκκου και τον όγκο των πόρων την σύνθεση των εγκαθιστάμενων ειδών.

### Φυσικοί συντελεστές

Οι μικροοργανισμοί έχουν ορισμένες θερμοκρασίες προτίμησης. Κάτω από τα βακτήρια που αποδομούν τις οργανικές ενώσεις, υπάρχουν είδη που αγαπούν την ζέστη και άλλα το κρύο. Έτσι πολλαπλασιάζονται οι νιτροποιητές, που οξειδώνουν το αμμωνιακό άζωτο σε νιτρικό άζωτο, σε χαμηλές θερμοκρασίες λυμάτων πολύ αργά.

### Χημικοί συντελεστές

Η συγκέντρωση οξυγόνου, η τιμή του pH, ο λόγος ανάμιξης, τα θρεπτικά υλικά άνθρακας, το άζωτο, ο φώσφορος όπως και το είδος και η σύνθεση των ιχνοστοιχείων ορίζουν τα διάφορα είδη των βακτηρίων και αντιστοιχία και τα άλλα είδη της τροφικής αλυσίδας. Εάν καταλήξουν στα λύματα τοξικά υλικά, μπορούν να επηρεάσουν ή τις ενέργειες εναλλαγής της ύλης ή στην ακραία περίπτωση να σκοτώσουν ένα μεγάλο μέρος των οργανισμών.

## 3. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΛΑΣΠΗΣ

Κατά την συλλογή πληροφοριών γύρο από ποιότητα της βιομάζας σε ένα βιολογικό καθαρισμό αποτελεί το μικροσκόπιο ένα πολύ σπουδαίο βοηθητικό μέσο. Με την βοήθεια του μπορούμε να παρατηρήσουμε ορισμένα ορατά αναγνωριζόμενα χαρακτηριστικά της λάσπης. Αντιθέτως η ενεργητικότητα της βιομάζας υπολογίζεται με άλλες μεθόδους.

Για την μικροσκοπική παρατήρηση πρέπει να εργαζόμαστε με φρέσκο δείγμα λάσπης. Μερικές ιδιότητες της λάσπης διαφοροποιούνται πολύ γρήγορα, ιδιαίτερα όταν προέρχονται από μονάδες υψηλής φόρτισης. Δείγματα τα οποία δεν θα εξετασθούν αμέσως διατηρούνται στους 4-7 $^0$C (τα δοχεία πρέπει να γεμίζονται μόνο μέχρι τα 2/3 του όγκου τους). Δεν πρέπει να καταψύχονται διότι έτσι καταστρέφονται οι φλόκοι Δείγματα από μονάδες υψηλής φόρτισης μπορούν να διατηρηθούν 2-3 ημέρες, δείγματα από οξειδωτικές τάφρους περίπου μία εβδομάδα. Παρόλα αυτά ορισμένα πρωτόζωα πεθαίνουν πολύ γρήγορα.

**Το μικροσκοπικό πεδίο παρατήρησης**

Σε ένα αρχάριο εμφανίζεται η νιφάδα της ενεργού ιλύος ως ένα κροκαλοπαγές πέτρωμα (σύμφυρμα), σχεδόν χωρίς καμία δομή, ετερογενές με ακανόνιστο σχήμα. Εδώ και εκεί μπορεί να δούμε μερικά κινούμενα τμήματα. Μεταξύ των νιφάδων παρατηρούμε ορισμένες φορές και νηματοειδής δομές. Το χρώμα των μεμονωμένων νιφάδων κυμαίνεται από κιτρινο-γκρί μέχρι καφέ-μαύρο.

Βέβαια δεν είναι όλες οι νιφάδες ίδιες. Οι διαφορές αυτές βασίζονται:

- Στην σταθερότητα, μορφή, δομή και μέγεθος των νιφάδων
- Στην σύνθεση των νιφάδων (παρουσία διάφορων μικροοργανισμών, χαρακτηριστικές ομάδες βακτηρίων, ανόργανα και οργανικά σωματίδια)
- Στους νηματοειδής μικροοργανισμοί (παρουσία, ποια είδη, αλλαγή της συγκέντρωσης τους με τον χρόνο)
- Στην ανάπτυξη ελεύθερα κινούμενων βακτηρίων μεταξύ των νιφάδων;
- Στο ποια πρωτόζωα υπάρχουν και σε ποια συγκέντρωση;
- Αν υπάρχουν σπιροχαίτες και / ή σπιρίλια;

Σπουδαίο ρόλο παίζει η μεγέθυνση σε σχέση με το είδος της πληροφορίας που θέλουμε να αντλήσουμε. Πρέπει να προσαρμόζεται στο μέγεθος του αντικειμένου που εξετάζουμε. Είναι παράλογο κάτω από 100Χ μεγέθυνση να θέλουμε να παρατηρήσουμε ένα αντικείμενο με 1 μm διάμετρο, διότι τότε θα είναι μόνο 0,1 mm μεγάλο.

Ο πίνακας που ακολουθεί μας δίνει κατευθυντήριες γραμμές για την επιλογή της σωστής μεγέθυνσης

| **Μεγέθυνση** | **Αντικείμενο** |
|---|---|
| 100 - 200 φορές | ✓ Μορφή, μέγεθος και δομή των φλόκων λάσπης<br>✓ Ταυτοποίηση των πρωτόζωων (εκτός μαστιγοφόρων-flagellate)<br>✓ Έκταση της αύξησης νηματοειδών Μορφή των νηματοειδών βακτηρίων<br>✓ Χαρακτηριστικές αποικίες βακτηρίων (Zoogloea κλπ)<br>✓ Ανόργανα σωματίδια. |
| 400-500 φορές | ✓ Σύνθεση και εσωτερική δομή της νιφάδας λάσπης.<br>✓ Αντοχή της νιφάδας<br>✓ Αύξηση των ελεύθερα κινούμενων βακτηρίων<br>✓ Παρουσία spirochetes και / ή spirillen<br>✓ Ταυτοποίηση νηματοειδών βακτηρίων (μέγεθος > 1 μm) και των μαστιγοφόρων. |
| 1000 φορές | ✓ Ταυτοποίηση των νηματοειδών βακτηρίων (διάμετρος <1 μm) |

# 4. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΙΦΑΔΩΝ

## Σχήμα, δομή και στερεότητα των νιφάδων

Το σχήμα μιας νιφάδας λάσπης μπορεί να κυμαίνεται από μία σφαιρική συμπαγή μορφή μέχρι μία τελείως ανοικτή ακανόνιστη δομή. Η ακριβής περιγραφή μιας νιφάδας είναι μία από τις δυσκολότερες εργασίες στην παρατήρηση της ενεργού ιλύος.

**Σχήμα: περίπου στρογγυλοποιημένο /ακανόνιστο**

Πλήρως σφαιρικές νιφάδες δεν υπάρχουν. Για τον λόγο αυτό κάθε νιφάδα με λίγο ή πολύ σφαιρικό σχήμα θεωρείται «στρογγυλοποιημένη» (εικ. 2). Μόνον όταν η μορφή της απέχει πολύ από την σφαιρικότητα την χαρακτηρίζουμε ως «ακανόνιστη» (εικ. 3). Στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε καθαρά προεξοχές από την νιφάδα προς διάφορες κατευθύνσεις. Επίσης η παρουσία νηματοειδών βακτηρίων οδηγεί συχνά σε ακανόνιστες μορφές νιφάδων. Τότε τα νήματα σχηματίζουν ένα είδος ιστού γύρο από τον οποίο αναπτύσσεται η νιφάδα.

**Στερεότητα: ασθενής / ισχυρή**

Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών χαρακτηριστικών περιγράφεται δύσκολα. Σε μία ασθενή νιφάδα η σύνδεση μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων είναι ασθενής και δεν υπάρχει ένα σταθερό κέντρο ανάπτυξης της νιφάδας.

Την δομή μιας παρόμοιας νιφάδας την καταστρέφουμε εύκολα κινώντας ελαφρά την καλυπτρίδα. Το όριο μεταξύ της νιφάδας και του υγρού δεν είναι ξεκάθαρο, διότι στα άκρα της νιφάδας υπάρχουν πολλά κύτταρα, για τα οποία δύσκολα μπορούμε να εκτιμήσουμε εάν ανήκουν στην νιφάδα ή βρίσκονται ήδη μέσα στο υγρό. (εικ. 5, επάνω τμήμα της νιφάδας). Κανονικά με την παρουσία νιφάδων ασθενούς στερεότητας υπάρχει και κυτταρικό υλικό σε ελεύθερη κατάσταση (Χ100 – 500). Η ισχύς των νιφάδων καθορίζεται κυρίως από την φόρτιση της μονάδας. Σε πολύ χαμηλές φορτίσεις λάσπης (F/M <0,025 g BOD/gMLSS.d) παρουσιάζει η νιφάδα την τάση διάσπασης σε μικρότερα σωματίδια. Σε τόση μικρή φόρτιση είναι εμφανές ότι απουσιάζουν τα θρεπτικά για να διατηρηθούν στην ζωή οι μικροοργανισμοί που σχηματίζουν τις νιφάδες. Σε υψηλές φορτίσεις δεν εμφανίζεται αυτό το πρόβλημα παρόλα αυτά όμως εμφανίζονται σε φορτίσεις >0,4-0,6 g BOD/gMLSS.d συχνά νιφάδες από τις οποίες αποκολλώνται μικρά σωματίδια. Σε μεσαίες φορτίσεις σχηματίζονται τις περισσότερες φορές ισχυρές νιφάδες (εικ. 2). Όταν σε μέσες φορτίσεις εμφανίζονται ελεύθερα κύτταρα ή μικρές συσσωρεύσεις βακτηρίων, τότε αυτό οφείλετε σε προβλήματα της διεργασίας καθαρισμού και ανάγεται σε ακατάλληλη σύνθεση των εισερχομένων λυμάτων.

**Δομή: συμπαγής / ανοικτή**

Μέσα σε μία συμπαγή νιφάδα μπορούνε να παρατηρήσουμε μόνο λίγα κενά (εικ. 2). Σε μία ανοικτή δομή αντιθέτως παρατηρούμε ξεκάθαρα τον διαχωρισμό τμημάτων της ίδιας νιφάδας μεταξύ τους με κενά (εικ. 4). Συχνά αυτό οφείλεται στην παρουσία νηματοειδών βακτηρίων.

Μία ιδιαίτερη ομάδα ανοικτών δομών αποτελούν οι συσσωρεύσεις (εικ. 6). Αυτές αποτελούνται από ένα σύμπλεγμα νηματοειδών βακτηρίων, μέσα στο οποίο περιέχονται μικρές, συμπαγείς, ισχυρές νιφάδες. (π.χ. σε οξειδωτικές τάφρους).

Η δομή και το σχήμα των νιφάδων επηρεάζει την ταχύτητα καθίζησης. Από την πλευρά αυτή θα ήταν επιθυμητή μία σφαιρική και συμπαγής νιφάδα. Κατά τον διαχωρισμό του νερού από την λάσπη συμπαρασύρονται όμως και κομμάτια λάσπης που δεν έχουν την κατάλληλη ταχύτητα καθίζησης. Το φαινόμενο αυτό απαιτεί μία μικρή σφαιρικότητα.

**Μέγεθος των νιφάδων**

Όταν μιλάμε για το μέγεθος της νιφάδας δεν εννοούμε το μακροσκοπικό μέγεθος που σχηματίζεται κατά την καθίζηση της νιφάδας. Αυτά τα ασθενώς μεταξύ τους συνδεμένα συσσωματώματα με διάμετρο 10 mm αποτελούνται ένα μεγάλο αριθμό μικρότερων σωματιδίων με διάμετρο < 1mm. Αυτές είναι οι νιφάδες, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται κυρίως από την φόρτιση της μονάδας, την σύνθεση του λύματος και τους στροβιλισμούς στην δεξαμενή αερισμού. Με την βοήθεια του προσοφθάλμιου νηματόσταυρου μπορούμε να μετρήσουμε την διάμετρο τους. Μετράμε την απόσταση δύο πιο απόμακρων σημείων της νιφάδας. (εικ. 7, 8, 9)

**Μεγάλη νιφάδα:** d > 500 μm
**Μέσου μεγέθους νιφάδα:** μεταξύ 250-500 μm
**Μικρή νιφάδα:** μεταξύ 50-250 μm
**Πολύ μικρή νιφάδα:** < 50 μm

Πολλές μικρές νιφάδες προκαλούν συνήθως μία θολή απορροή. Αυτές προέρχονται από πολύ χαμηλή φόρτιση, μεγάλο στροβιλισμό στην δεξαμενή αερισμού, τοξικές επιβολές, παρουσία συμπλόκων κλπ.

**Σύνθεση των νιφάδων**

Η ποικιλία στην σύνθεση της οικολογίας των νιφάδων και η παρουσία χαρακτηριστικών ομάδων βακτηρίων βρίσκεται σε άμεση σχέση με την ποιότητα και την ποσότητα των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών.

Μία νιφάδα αποτελείται κανονικά από μία ποικιλία μικροοργανισμών, η οποία ποικιλία καθιστά το σύστημα της ενεργού ιλύος εύκαμπτο να επεξεργαστεί ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών παράλληλα.

Όταν λοιπόν η νιφάδα αποτελείται μόνο από λίγα βακτήρια (μικρή ποικιλότητα) (εικ. 10), πρόκειται για λάσπη από υψηλή φόρτιση (F/M > 1g BOD/g MLSS.d) ή / και για ένα λύμα με περιορισμένη παρουσία θρεπτικών (άζωτο ή φώσφορο). Οδηγεί σε μια ασταθή διαδικασία επεξεργασίας, η οποία με την παραμικρή απόκλιση διαταράσσεται.

Μερικές φορές παρατηρούμε και συνενώσεις σε μία μάζα που φαίνεται να αποτελούνται μόνο από ένα είδος κυττάρων (εικ. 11). Στις περιπτώσεις αυτές έχουμε να κάνουμε μόνο με ένα βακτήριο, του οποίου τα κύτταρα περικλείονται από ένα γλοιώδες στρώμα. Συνήθως πρόκειται για τα Ζοόγλια (Zoogloea ramigera), ένα βακτήριο που σχηματίζει χαρακτηριστικά εξέχοντα υπερσαρκώματα από τις νιφάδες (εικ. 12) και ομοιάζουν με δάκτυλα.

Υπέρμετρη παρουσία ζοόγλιων οφείλεται σε υψηλή φόρτιση λάσπης και/ή μη επαρκής παρουσία θρεπτικών και παρουσιάζει κακή καθιζησημότητα, περικλείει επίσης μεγάλες ποσότητες υγρού που αντικατοπτρίζεται σε ένα υψηλό SVI.

Οι νιφάδες λάσπης αποτελούνται κατά κύριο λόγο από ζωντανά και νεκρά κύτταρα βακτηρίων. Παράλληλα μπορούμε να παρατηρήσουμε σχεδόν σε όλες τις νιφάδες μακρομοριακά ανόργανα και οργανικά σωματίδια, τα οποία σίγουρα δεν προέρχονται από τα βακτήρια. Πρόκειται για σωματίδια τα οποία προϋπάρχουν στην είσοδο των λυμάτων και περικλείονται από τις νιφάδες. Τα οργανικά σωματίδια διακρίνονται, εκτός του μέγεθος τους και από την ινώδη μορφή τους (εικ. 13). Τα ανόργανα είναι συνήθως μικροί κόκκοι άμμου, οι οποίοι παρουσιάζουν και έναν μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης από ότι το υπόλοιπο υλικό της νιφάδας. Τα αναγνωρίζουμε ιδιαίτερα εύκολα από την φωτεινότητα τους (εικ. 14).

Το μέγεθος της παρουσίας των οργανικών, ανόργανων και ζοόγλια αποικιών περιγράφεται ως ακολούθως:

- Απουσία
± Περιστασιακή παρουσία
+ Τακτική παρουσία (5-10 εμφανίσεις σε ένα παρασκεύασμα)
++ Συχνή παρουσία (> 15 εμφανίσεις σε ένα παρασκεύασμα)

**Ανάπτυξη των ελεύθερα κινούμενων βακτηρίων**

Σε μία μονάδα ενεργού ιλύος που λειτουργεί καλά, σχεδόν όλα τα βακτήρια βρίσκονται μέσα σε μία νιφάδα. Η ανάπτυξη της βιομάζας εμφανίζεται μόνο με την μορφή αύξησης της νιφάδας. Το διογκωμένο κυτταρικό υλικό που δεν χωρά μέσα στην νιφάδα χρησιμεύει ως τροφή για τα πρωτόζωα της λάσπης. Έτσι μετά την καθίζηση της λάσπης παραλαμβάνουμε ένα πολύ καθαρό νερό. Μερικές φορές βέβαια τα επεξεργασμένα νερά παρουσιάζουν μία θολότητα η οποία οφείλεται ή σε υψηλή φόρτιση ή /και σε κακό αερισμό.

Με την υψηλή φόρτιση γίνονται οι νιφάδες ασθενέστερες και οδηγούν σε διάσπαση της βιομάζας. Επίσης υπάρχουν πολλά θρεπτικά και εκτός των νιφάδων πράγμα που οδηγεί σε ανάπτυξη βακτηρίων και εκτός των νιφάδων και σε ακραίες περιπτώσεις οδηγεί σε λάσπη χωρίς καθόλου νιφάδες.

Ελλιπής οξυγόνωση οδηγεί επίσης σε παρόμοιο πρόβλημα. Εδώ έχουμε ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην υγρή φάση και μερική διάσπαση των νιφάδων οφειλόμενη στον θάνατο των αερόβιων οργανισμών. Μπορούμε να πούμε ότι πρόκειται για δηλητηρίαση της αερόβιας βιοκοινωνίας της λάσπης. Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και μία δηλητηρίαση της βιομάζας με βαρέα μέταλλα

κλπ. Παράλληλα εμφανίζεται και μία μεγάλη αύξηση ελεύθερης κυτταρικής ύλης. Η έκταση της αύξησης ελεύθερων βακτηρίων κατατάσσεται σύμφωνα με:

- Σχεδόν απουσία
+ Μερικές δεκάδες στην οπτική εικόνα
++ Μερικές εκατοντάδες στην οπτική εικόνα

Στις εικόνες 2 και 3 παρατηρούμε παραδείγματα όπου εμφανίζονται μικρή αύξηση και αντίστοιχα μεγάλη αύξηση ελεύθερης κυτταρικής ύλης, μάλιστα όλα τα μαύρα στίγματα στην εικόνα 3 είναι βακτήρια.

Στην ενεργό λάσπη τους καλοκαιρινούς μήνες και σε μονάδες χαμηλής φόρτισης μπορεί μερικές φορές να εμφανισθούν πολύ ευκίνητα βακτήρια. Πρόκειται για τις σπυροχαίτες (spirochaeten) (εικ. 15) και Σπιρίλια (Spirillen). Αυτά εμφανίζονται όταν ο αερισμός δεν είναι επαρκής. Η έκταση της παρουσίας τους κατατάσσεται σύμφωνα με:

- Απουσία
± Τυχαία παρουσία
+ 5-10 εμφανίσεις σε ένα παρασκεύασμα
++ > 15 εμφανίσεις σε ένα παρασκεύασμα

**Παράδειγμα 1ο** παρουσίασης των ιδιοτήτων των νιφάδων από οξειδωτική τάφρο (αερόβια σταθεροποίηση, μέτρια ανάπτυξη νηματοειδών, χωρίς πρωτοβάθμια καθίζηση)

| **Μορφολογία των νιφάδων λάσπης** | | | | | | **Διάφορες ιδιότητες** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Σχηματισμός και Μορφή των νιφάδων | Σχήμα | | Μέγεθος | | | | |
| | Ανοικτό | Συμπαγές | Μικρό | Μέσο | Μεγάλο | Ποικιλότητα | + |
| Ισχυρή, λίγο στρογγυλοποιημένη | | x | + | + | | Ελευθέρα κύτταρα 3) | - |
| Ισχυρή, διάγραμμα ακανόνιστο | | | | | | Ζοόγλια 2) | - |
| Ασθενής, λίγο στρογγυλοποιημένη | | | | | | Σπιροχαίτες 2) | + |
| Ασθενής, διάγραμμα ακανόνιστο | | | | | | Σπιρίλια 2) | - |
| Συσσωρεύσεις | x | | | ++ | + | Οργανικές ίνες 2) | + |

**Παράδειγμα 2ο** παρουσίασης των ιδιοτήτων των νιφάδων από μονάδα υψηλής φόρτισης (χωρίς νιτροποίηση, λίγα νηματοειδή, ύπαρξη πρωτοβάθμιας καθίζησης)

| **Μορφολογία των νιφάδων λάσπης** | | | | | | **Διάφορες ιδιότητες** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Σχηματισμός και Μορφή των νιφάδων | Σχήμα | | Μέγεθος | | | | |
| | Ανοικτό | Συμπαγές | Μικρό | Μέσο | Μεγάλο | Ποικιλότητα | + |
| Ισχυρή, λίγο στρογγυλοποιημένη | | | | | | Ελευθέρα κύτταρα 3) | ++ |
| Ισχυρή, διάγραμμα ακανόνιστο | | | | | | Ζοόγλια 2) | ± |
| Ασθενής, λίγο στρογγυλοποιημένη | | x | ± | + | + | Σπιροχαίτες 2) | - |
| Ασθενής, διάγραμμα ακανόνιστο | x | | | + | + | Σπιρίλια 2) | ± |
| Συσσωρεύσεις | | | | | | Οργανικές ίνες 2) | - |

2)

- = Απουσία
± = Περιστασιακή παρουσία
+ = μερικά (5-10) κύτταρα ή σωματίδια σε ένα παρασκεύασμα
++ = πολλά κύτταρα ή σωματίδια σε ένα παρασκεύασμα

3)

- = λίγα
+ = Μερικές δεκάδες στην οπτική εικόνα
++ = Μερικές εκατοντάδες στην οπτική εικόνα

# 5. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Σαν δείκτες μικροσκοπικής εξέτασης δεν είναι κατάλληλοι όλοι οι μικροοργανισμοί που συναντώνται στο ανάμικτο υγρό ενός βιολογικού καθαρισμού. Εξαιρετικοί είναι οι οργανισμοί που προσδιορίζονται απλά και εμφανίζονται μόνο σε καθορισμένες λειτουργικές συνθήκες. Ένας κακός δείκτης είναι αυτός που συναντάται σε κάθε λειτουργικό σύστημα.

Τους δείκτες - μικροοργανισμούς (που τρέφονται με βακτήρια) μπορούμε να τους παρατηρήσουμε με κοινά μικροσκόπια (μεγέθους 100x – 400x). Ορισμένοι σχηματισμοί πρέπει να χρωματισθούν με κατάλληλες χρωστικές ουσίες για να γίνουν ορατοί.

Οι παρατηρήσεις της ενεργού ιλύος με το μικροσκόπιο είναι εξαιρετικά χρήσιμες, γιατί με αυτές εξάγουμε συμπεράσματα για:

- Τις συνθήκες λειτουργίας, παρατηρώντας τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νιφάδων
- Την ποιότητα των επεξεργασμένων νερών, παρατηρώντας τα πρωτόζωα και τα τροχόζωα
- Το είδος των νηματοειδών βακτηρίων, σε περίπτωση διόγκωσης της λάσπης
- Τυχόν είσοδο τοξικών

## 4.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των νιφάδων σε σχέση με την λειτουργία της εγκατάστασης

Στην νιφάδα παρατηρούμε τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- **Μορφή:** Νιφάδες σφαιρικές, φυλλώδεις, αστεροειδείς, άμορφες
- **Πυκνότητα:** Νιφάδες συμπαγείς, ζελατινώδεις, χαλαρές /ασταθείς
- **Μέγεθος:** Πολύ μικρές < 50 μm, μικρές 50 -250 μm, μέσου μεγέθους 240-500 μm, μεγάλες 500-1000 μm
- **Κυρίαρχοι μικροοργανισμοί:** βακτήρια, μύκητες, ζωόγλια, νιφάδες nocardia ή από microthrix κλπ.

Το μέγεθος και η μορφολογία των νιφάδων εξαρτάται από τη φόρτιση των δεξαμενών:

- **Μονάδες χαμηλής φόρτισης** (0,05<F/M<0,2)
  Έχουν φλόκους μικρούς (50-250 μm)
  Με μαύρα στίγματα (ανόργανα άλατα) στο εσωτερικό τους
  Ανοιχτόχρωμοι περιφερειακά
  Υπάρχουν πρωτόζωα (βλεφαριδωτά)
  Παρατηρούνται επίσης κολλά τροχόζωα και σκώληκες
- **Μονάδες υψηλής φόρτισης** (0,5<F/M)
  Έχουν μεγάλους φλόκους (500-1000 μm)
  Αστεροειδών προεκτάσεις
  Υπάρχουν άφθονα μαστιγοφόρα και αμοιβάδες
- **Μονάδες μέσης φόρτισης** (0,2<F/M<0,5)
  Έχουν μέσου μεγέθους φλόκους (240-500 μm) που είναι συμπαγείς

Υπάρχουν άφθονα πρωτόζωα όπως: Vorticella convallaria, Opercularia coartata, Aspidisca costata, Euplotes affinis, Λίγα μαστιγοφόρα

**Α. Βακτήρια**

**Ζωόγλοια (εικ. 11, 12)**:

- Εμφανίζονται σε αποικίες μέσα σε περιτύλιγμα βλέννας
- Αναγνωρίζονται από τα σημάδια στα άκρα ή σε όλη την νιφάδα
- Ανάλογα με την πυκνότητα τους οδηγούν σε αύξηση του βάρους των νιφάδων και καλυτέρευση της καθίζησης και σπανιότερα σε αύξηση του όγκου με αντίστοιχη αύξηση του όγκου καθίζησης
- Εμφανίζονται περιοδικά σε μικρό αριθμό
- Σε μονάδες υψηλής φόρτισης μπορεί να αυξηθούν τόσο πολύ ώστε να οδηγήσουν σε υπέρμετρες νιφάδες

**Βακτήρια θείου (Beggiatoa), (εικ. 16)**:

- Είναι σε θέση να παραλάβουν μεγάλες ποσότητες ανοιγμένων ενώσεων θείου.
- Σε περίπτωση έλλειψης οξυγόνου έχουν πλεονεκτήματα ανάπτυξης
- Αναγνωρίζονται εύκολα από τα ανοικτόχρωμα, το φως διαθλώντα σημάδια (αποθέσεις θείου)
- Εμφανίζονται σφαιρικά, σπειροειδή, ή ως βάκιλοι
- Υπάρχουν σε μονάδες αυξημένη συγκέντρωση θείου (υδρόθειου) και χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, σε μονάδες υψηλής φόρτισης ή μονάδες με σαπισμένο απόβλητο.
- Μαζική παρουσία νηματοειδών βακτηρίων θείου οδηγεί στην διόγκωση της λάσπης και χειροτέρεψη της καθίζησης.
- Είναι κατά Gram και κατά Neisser αρνητικά

**Β. Μονοκύτταροι οργανισμοί (Πρωτόζωα)**

Αναπτυγμένοι οργανισμοί (ευκαριωτικοί) παρουσιάζουν σε αντίθεση με τα βακτήρια έναν πραγματικό πυρήνα. Διακρίνονται σε μονοκύτταρους (πρωτόζωα) και σε πολυκύτταρους.

**Μαστιγοφόρα (εικ. 17):**

- Τα μαστιγοφόρα φέρουν το όνομα τους από το μαστίγιο (ένα ή πολλά) που έχουν και είναι ξεκάθαρα μεγαλύτερο και δυνατότερο από βλέφαρα. Τα χρησιμοποιούν για να προχωρούν μέσα στην υγρή φάση.
- Πρόκειται για στρογγυλούς μέχρι οβάλ οργανισμούς μήκους 5-20 μm διάμετρο
- Κινούνται συνήθως ελευθέρα
- Είναι ουσιαστικά μεγαλύτερα από τα βακτήρια, αλλά μικρότερα από τα βλεφαριδωτά
- Ισχυροί ανταγωνιστές τους είναι τα βλεφαριδωτά που υπερτερούν σε κανονικές συνθήκες. Λόγο όμως του μικρού τους χρόνου αναπαραγωγής υπερτερούν, όταν τα βλεφαριδωτά διαταραχθούν στην ανάπτυξη τους ή δεν έχει αρχίσει ακόμη.

- Εμφανίζονται στην αρχική φάση εκκίνησης μίας μονάδας ή /και σε περιπτώσεις συχνών διαταραχών της διαδικασίας καθαρισμού.

**Pleuromonas,** είναι ένα μικρό μαστιγοφόρο με διάμετρο 6-20 μm. Κοντά στην θέση όπου είναι τα δύο μαστίγια είναι το κυτταρικό τοίχωμα λίγο κοίλο. Το μάκρη μαστίγιο είναι συχνά στερεωμένο σε νιφάδα λάσπης. Την πλευρομονάδα μπορούμε να την αναγνωρίσουμε εύκολα από τον γρήγορο πηδηχτό τρόπο να μετακινείται.

**Trigonomonas,** είναι δείκτης αναερόβιων συνθηκών (ανεπαρκής αερισμός).

**Αμοιβάδες (εικ. 18)**

- Όπως τα μαστιγοφόρα είναι και αυτές μικρές με μέγεθος από 10 μm μέχρι 3 mm.
- Κινούνται με σαν να πλέουν και μπορεί να είναι συμπαγή ή με μακριά συνεχώς μεταβαλλόμενα ψευτοπόδα. Μερικές μορφές είναι «γυμνές» και άλλες έχουν φλοιό.
- Ο μεγάλος αριθμός τους μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υψηλή αστάθεια επικρατεί στην βιολογική μονάδα (π.χ. κατά την φάση την έναρξης)

**Βλεφαριδωτά**

Η ομάδα των βλεφαριδωτών έχει εξερευνηθεί πολύ διεξοδικά. Εξαιτίας της ποικιλότητας τους είναι τα πλέον κατάλληλα πρωτόζωα για τον χαρακτηρισμό της κατάστασης λειτουργίας μιας βιολογικής μονάδας.

Υπάρχουν πολλά είδη ελεύθερων κινούμενων και σταθερών (εδραίων) μορφών. Οι σταθερές μορφές διηθούν το νερό συνεχώς και φροντίζουν με τον τρόπο αυτό για μία καθαρή απορροή. Επιπλέον διαιρούνται σε καμπανοειδή και μυζητικά.

Σε κανονικές αδιατάρακτες συνθήκες εμφανίζονται τουλάχιστον 3-4 είδη βλεφαριδωτών.

Είναι πολύ ευαίσθητα απέναντι σε δηλητήρια και ανασταλτικούς παράγοντες σε σχέση με τα βακτήρια. Έτσι η απουσία τους μας οδηγεί σε συμπεράσματα ότι η βιολογική διεργασία μπορεί να διαταράσσεται από δηλητήρια, υψηλές φορτίσεις, κακό αερισμό κλπ. Τα εδραία βλεφαριδωτά έχουν πλεονέκτημα σε μεγάλες τυρβώδεις κινήσεις όπως επιφανειακός αερισμός με σβούρες.

Εμφανώς πολλά στρογγυλοποιημένα, σε διαρκεί κύτταρα περιβεβλημένα ή νεκρά βλεφαριδωτά είναι σημάδια συχνών απότομων υψηλών φορτίσεων ή δηλητηρίασης της βιολογικής μονάδας. Μπορεί όμως και να σημαίνει ότι το δείγμα δεν διατηρήθηκε καλά μετά την συλλογή του.

**Vorticella (εικ. 19, 20, 21, 22)**

Τα εδραία βλεφαριδωτά, με διάμετρο σώματος από 50 μέχρι 150 μm, έχουν μίσχο, με ένα μυόνημα μέσα, το οποίο κατά τα τραντάγματα συστέλλεται σπειροειδώς. Ζουν μεμονωμένα και δεν σχηματίζουν αποικίες.

Δύο είδη είναι σημαντικά για την παρατήρηση:

**V. convallaria:** το σώμα της στο σημείο του περιστοματικού δίσκου είναι πολύ φαρδύ. Αυτού του είδους οι v. είναι πολύ απαιτητικές και εμφανίζονται μόνο σε μονάδες με πολύ καλό αερισμό (0,15<F/M<0,3) .

Η **V. campanula** έχει επίσης φαρδύ περιστοματικό δίσκο και εμφανίζεται σε μονάδες με χαμηλή φόρτιση (F/M 0,05-0,1).

Η **V. microstoma** έχει στενό περιστοματικό δίσκο και είναι λιγότερο ευαίσθητο από ότι οι προηγούμενες δύο. Έτσι εμφανίζεται όταν οι άλλες δεν έχουν δυνατότητες ανάπτυξης όπως συχνά συμβαίνει σε μονάδες υψηλής φόρτισης (F/M > 0,4 kg BOD/kg MLSS.d). Αναγνωρίζεται εύκολα από το μακρύ σώμα και το μικρό περιστοματικό δίσκο.

**Carchesium, (εικ. 23)**

Εμφανίζεται όπως η vorticella, με διάμετρο 100-125 μm, γύρο στο στόμα του έχει βλέφαρα. Και αυτό έχει μυόνημα για να μπορεί να συστέλλεται. Συνήθως το στέλεχος του είναι διακλαδωμένο και σχηματίζει αποικίες. Ο μυς διακόπτεται σε κάθε διακλάδωση.

Η εμφάνιση του είναι δείκτης καλού αερισμού. Πλήθος μεγάλων αποικιών σημαδεύουν αδιατάρακτες, σταθερές συνθήκες λειτουργίας. Εμφανίζεται σε μέτριες φορτίσεις (F/M = 0,2 – 0,4 kg BOD/kg MLSS.d)

**Opercularia, (εικ. 24)**

Ομοιάζει πολύ στο carchesium. Τα στελέχη είναι επίσης διακλαδωμένα, έτσι που μπορεί να σχηματίζει αποικίες, και δεν περικλείουν κανένα μυ. Τα κύτταρα έχουν διάμετρο περίπου 140 μm και συνήθως είναι παρών ένας χαρακτηριστικός περιστοματικός δίσκος, με διάμετρο το ένα πέμπτο του ανοίγματος της καμπάνας. Η εμφάνιση του είναι επίσης δείκτης καλού αερισμού. Πλήθος μεγάλων αποικιών σημαδεύουν αδιατάρακτες, σταθερές συνθήκες λειτουργίας. Τα είδη της ο. εμφανίζονται παράλληλα με την vorticella σε αδιατάρακτες συνθήκες και σε μέτριες φορτίσεις.

**Epistylis, (εικ. 25)**

Ο οργανισμός αυτός έχει την μορφή τρομπέτας με μία διάμετρο από 70 - 100 μm. Το διακλαδωμένο στέλεχος δεν περιέχει κανένα μυ, χοντρό, με ραβδώσεις και δεν περιέχει μυόνημα.

Τα είδη epistylis εμφανίζονται μόνο σε πολύ καλά λειτουργούσες μονάδες με επαρκές οξυγόνο, σταθερές συνθήκες και σχετικά μεγάλη ηλικία λάσπης.

Αυτοί οι τέσσερις μικροοργανισμοί έχουν πολλές κοινές ιδιότητες. Μπορούν να ξεχωριστούν με την βοήθεια του παρακάτω πίνακα.

| | Μυς στο στέλεχος | Στέλεχος διακλαδωμένο | Περιστοματικός δίσκος | Μορφή του σώματος |
|---|---|---|---|---|
| Vorticella | + | - | μεγάλος | καμπανοειδής |
| Carchesium | + | + | μεγάλος | καμπανοειδής |
| Opercularia | - | + | μικρός | καμπανοειδής |
| Epistylis | | + | μεγάλος | Σαν βάζο |

**Tokophrya, (εικ. 26)**

Τα είδη αυτά είναι μυζητικά, ονομάζονται και heliozoa. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν οργανισμοί με σφαιρικό κυτταρικό σώμα, το οποίο είναι γεμάτο από ευθύγραμμες ακίδες. Αυτές μπορούν να μαζεύονται και να ξεδιπλώνονται. Χρησιμοποιούνται για να πιάνουν το θήραμα τους. Οργανισμοί που συλλαμβάνονται ακινητοποιούνται και μετά τρώγονται. Πολλαπλασιάζονται πολύ πιο αργά από τα άλλα βλεφαριδωτά, γι αυτό και εμφανίζονται σε μονάδες με μεγάλη σταθερότητα και μεγάλη ηλικία λάσπης (0,05<F/M<0,1) Η διάμετρος τους κυμαίνεται ανάμεσα σε 40-100 μm. Είναι δείκτες καλού αερισμού.

**Aspidisca, (εικ. 27)**

Ανήκει στα έρποντα βλεφαριδωτά, έχει την μορφή αυγού και σταθερό σώμα με καμπυλωτή πλάτη. Το μήκος του σώματος κυμαίνεται από 25-55 μm. Τα βλέφαρα εμφανίζονται με την μορφή, ενωμένων μεταξύ τους σε δέσμη (σαν πόδια = κιρρόποδο). Συνήθως έρπει με μεγάλη ταχύτητα στην επιφάνεια των νιφάδων και φροντίζει να μην αναπτυχθεί υπέρμετρα. Εμφανίζεται σχεδόν σε κάθε λάσπη με μεγάλη ηλικία λάσπης.

Η **a. cicada** έχει στην πλάτη της 3-6 αυλακώσεις κατέχει μικρό βαθμό ένδειξης διότι εμφανίζεται σχεδόν σε κάθε φόρτιση λάσπη και σε κάθε μονάδα με νιτροποίηση.

Η **a. lynceus** ομοιάζει με χελωνίτσα και δεν έχει αυλακώσεις. Είναι ευαίσθητη στην έλλειψη οξυγόνου. Έτσι συχνή εμφάνιση της σημαίνει καλή οξυγόνωση και σταθερές συνθήκες λειτουργίας.

**Euplotes affinis, (εικ. 28)**

Σχηματίζει αυγοειδή κύτταρα με ένα μάκρος από 80-120 μm. Επάνω στην πλάτη του δείχνει έξι αυλακώσεις και η πλευρά της κοιλιάς είναι πεπλατυσμένη. Η επιφάνεια των κυττάρων παρουσιάζει μερικά «πόδια» αλλά δεν εμφανίζονται μεμονωμένα βλέφαρα. Τα εννέα «πόδια» στην μπροστινή και τα πέντε στην πίσω πλευρά φαίνονται συνήθως πολύ καλά. Κοντά στο περιστόμιο εμφανίζονται μεμβρανέλες (μικρές κάθετες σειρές μεταξύ τους ενωμένων βλεφάρων). Ο Euplotes μπορεί να παρομοιασθεί με την Aspidisca, η οποία όμως είναι πολύ μικρότερη. Εκτός αυτού κινείται ελεύθερα στην υγρή φάση. Εμφανίζεται σε καλές συνθήκες οξυγόνωσης και χαμηλές φορτίσεις (F/M < 0,2 kg BOD/kg MLSS.d).

**Tetrahymena και Glaucoma**

Έχει την μορφή αυγού, είναι σχετικά μικρά και είναι δείκτες για μια υπερφόρτιση της μονάδας επεξεργασίας. Όπως και το Colpidium, η Chilodonella, το Litonotus, το Paramecium και ο Coleps παρουσιάζουν λίγο ή πολύ ομοιόμορφη κατανομή βλεφάρων πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου τους.

**Colpidium, (εικ. 29)**

Από το είδος αυτός εμφανίζεται σε μονάδες υψηλής φόρτισης το C. campylum (ομοιάζει με νεφρό) (F/M > 0,4 kg BOD/kg MLSS.d) σχετικά συχνά. Εμφανής είναι η ασύμμετρος μορφής του.

**Chilodonella, (εικ. 30)**

Το σώμα του είναι ασύμμετρο και πολύ πεπλατυσμένο. Δείχνει καλύτερες συνθήκες οξυγονωσης από το colpidium και εμφανίζεται σε μονάδες μέσης μέχρι χαμηλής φόρτισης (F/M = 0,2 – 0,4 kg BOD/kg MLSS.d).

**Litonotus και trachelophyllum**

Τα βλεφαριδωτά αυτά με τον χαρακτηριστικό λαιμό έχουν μικρή αξία ως δείκτες. Εμφανίζονται συνήθως σε μονάδες με μεγάλη ηλικία λάσπης και χαμηλή φόρτιση.

Τα κύτταρα του **Litonotus** έχουν την μορφή φιάλης. Ο λαιμός και το υπόλοιπο μέρος του κυττάρου έχουν το ίδιο μήκος (50 μm). Τα βλέφαρα είναι περιορισμένα στην πίσω πλευρά.

Το **Trachelophyllum** είναι ένα πλατυσμένο, κινητό, με μακρύ σώμα (70 μm) το οποίο είναι πλήρως με βλέφαρα σκεπασμένο. Γλιστρά αργά διαμέσου και πάνω από τις νιφάδες λάσπης. Συναντάται συχνά στην ενεργό λάσπη και μπορεί να μπερδευτεί με τα μικρά είδη του Litonotus.

**Paramecium caudatum**

Τα κύτταρα αυτού του οργανισμού έχουν την μορφή ενός πούρου. Τα βλέφαρα σκεπάζουν όλο το σώμα. Το εσωτερικό του κυττάρου είναι μεγάλο και συνήθως καλά ορατό. Πολύ χαρακτηριστικό είναι η αστεροειδής συσταλτική φαινομενική τρύπα (contractile vacuole). Είναι δείκτης κακής οξυγόνωσης.

**Coleps**

Είδη του γένους coleps εμφανίζονται μόνον σε μονάδες χαμηλής φόρτισης (F/M < 0,2 kg BOD/kg MLSS.d).

**Rotifer (τροχόζωα), Rotaria, Cephalodella, Proales** (εικ. 33)

Είναι πολύ κινητικοί, πολυκύτταροι οργανισμοί με μακρόστενη μορφή. Το μήκος φθάνει από 100 - 500 μm. Το σώμα περικλείεται από ένα προστατευτικό κάλυμμα, μέσα στο οποίο μπορούν να μαζεύονται το κεφάλι και ένα μέρος της ουράς. Στο κεφάλι φέρουν βλέφαρα τα οποία είναι ανεπτυγμένα με την μορφή τροχών. Η ουρά παίζει σπουδαίο ρόλο στην τηλεσκοπική κίνηση τους. Εμφανίζονται σε 0,05<F/M<0,3, και σε λάσπες μεγάλης ηλικίας. Δείχνουν σταθερές συνθήκες λειτουργίας.

## 6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΗΜΑΤΟΕΙΔΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Στην περίπτωση διογκωμένης λάσπης, είναι απαραίτητο να γίνει αναγνώριση και ταυτοποίηση των υπευθύνων νηματοειδών. Η παρατήρηση γίνεται συνήθως με φακό 1000 φορές, σε κεχρωσμένα δείγματα λάσπης κατά Gram, και Neisser κλπ. Μετά την παρατήρηση με το μικροσκόπιο, γίνεται καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νηματοειδών και με τα αποτελέσματα των χρώσεων χρησιμοποιούνται στη συνέχεια πίνακες με τους οποίους γίνεται η αναγνώριση.

## 7. ΔΙΑΠΙΣΤΩΣΗ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΞΙΚΩΝ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

**Τα πρωτόζωα και τα τροχόζωα είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητα «ε τοξικές ουσίες από ότι είναι τα βακτήρια.**

Έτσι οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμεύουν σαν δείκτες εισόδου τοξικών στις δεξαμενές. Πέραν αυτών **η αλλαγή στον αριθμό και το είδος των είναι ενδείξεις μεγάλων μεταβολών στις λειτουργικές παραμέτρους.**

Για παράδειγμα, αναφέρεται η συμπεριφορά των βλεφαριδωτών (ciliates) Ξαφνική μείωση των ζώντων βλεφαριδωτών είναι ένδειξη απότομης υπερφόρτισης με τοξικές ουσίες (είσοδος βιομηχανικών αποβλήτων, βοθρολυμάτων κλπ) ή παρατεταμένη ανεπάρκεια οξυγόνου. Η ανάπτυξη νηματοειδών βακτηρίων ή μυκήτων είναι ένδειξη μετατόπισης

## 8. ΕΙΔΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Τα μικροσκοπικά παρασκευάσματα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- προσωρινά
- ημιμόνιμα
- μόνιμα

**Προσωρινά παρασκευάσματα**

Παίρνουμε μια καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα με τις παρακάτω διαστάσεις:

- πάχος: 1 mm
- μήκος: 7 έως 7,5 mm
- πλάτος: 2,5 mm

Το πάχος της αντικειμενοφορού πλάκας έχει σημασία και αλλάζει ανάλογα με το είδος των φακών που υπάρχουν στο πλάκας πρέπει να είναι από 0,8 έως 1 mm. Για τους αποχρωματικούς φακούς το πάχος της.

Αν οι αντικειμενοφόρες πλάκες δεν φαίνονται καθαρές τις πλένουμε με αλκοόλη.

Στο κέντρο της πλάκας βάζουμε με σταγονόμετρο μία σταγόνα του υγρού παρατήρησης που ποικίλει ανάλογα με την περίπτωση π.χ. νερό, γλυκερίνη κτλ. Μέσα στη σταγόνα αυτή βάζουμε το αντικείμενο που θέλουμε να παρατηρήσουμε.

Πάνω στο υγρό βάζουμε μια καλυπτρίδα, που είναι ένα λεπτό κομμάτι από γυαλί (σχήμα 6) με τις παρακάτω διαστάσεις:

- πάχος: 0,17 mm
- πλάτος κ μήκος: 22 mm

Για να μη σχηματιστούν φυσαλίδες από αέρα στο παρασκεύασμα, ακουμπούμε την καλυπτρίδα πάνω στην αντικειμενοφόρο με τη μια άκρη της και την αφήνουμε να πέσει απαλά. Κατόπιν την πιέζουμε με τον αντίχειρα, αφού πρώτα βάλουμε ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί. Το χαρτί κατανέμει την πίεση ομοιόμορφα και απορροφά το υγρό που περισσεύει.

Το παρασκεύασμα είναι τώρα έτοιμο για παρατήρηση.

**Ημιμόνιμα παρασκευάσματα**

Η διαδικασία προετοιμασίας τους είναι η ίδια όπως και για τα προσωρινά. Μόλις πιέσουμε την καλυπτρίδα σφραγίζουμε και τις τέσσερις ακμές με κάποιο ειδικό μέσο. Το πιο συνηθισμένο είναι η βαζελίνη. Τα παρασκευάσματα αυτά μπορούν να διατηρηθούν επί μήνες.

Ένας άλλος τρόπος σφράγισης είναι με κερί θερμαίνουμε μια βελόνα, τη βουτάμε στο κερί και μετά με προσοχή τη σέρνουμε κατά μήκος των άκρων της καλυπτρίδας.

**Μόνιμα παρασκευάσματα**

Για την προετοιμασία των παρασκευασμάιων αυτών χρειάζονται ειδικά μέσα, να διαιρούνται σε δύο κατηγορίες:

- υδατοδιαλυτά,
- διαλυτά σε ξυλόλη.

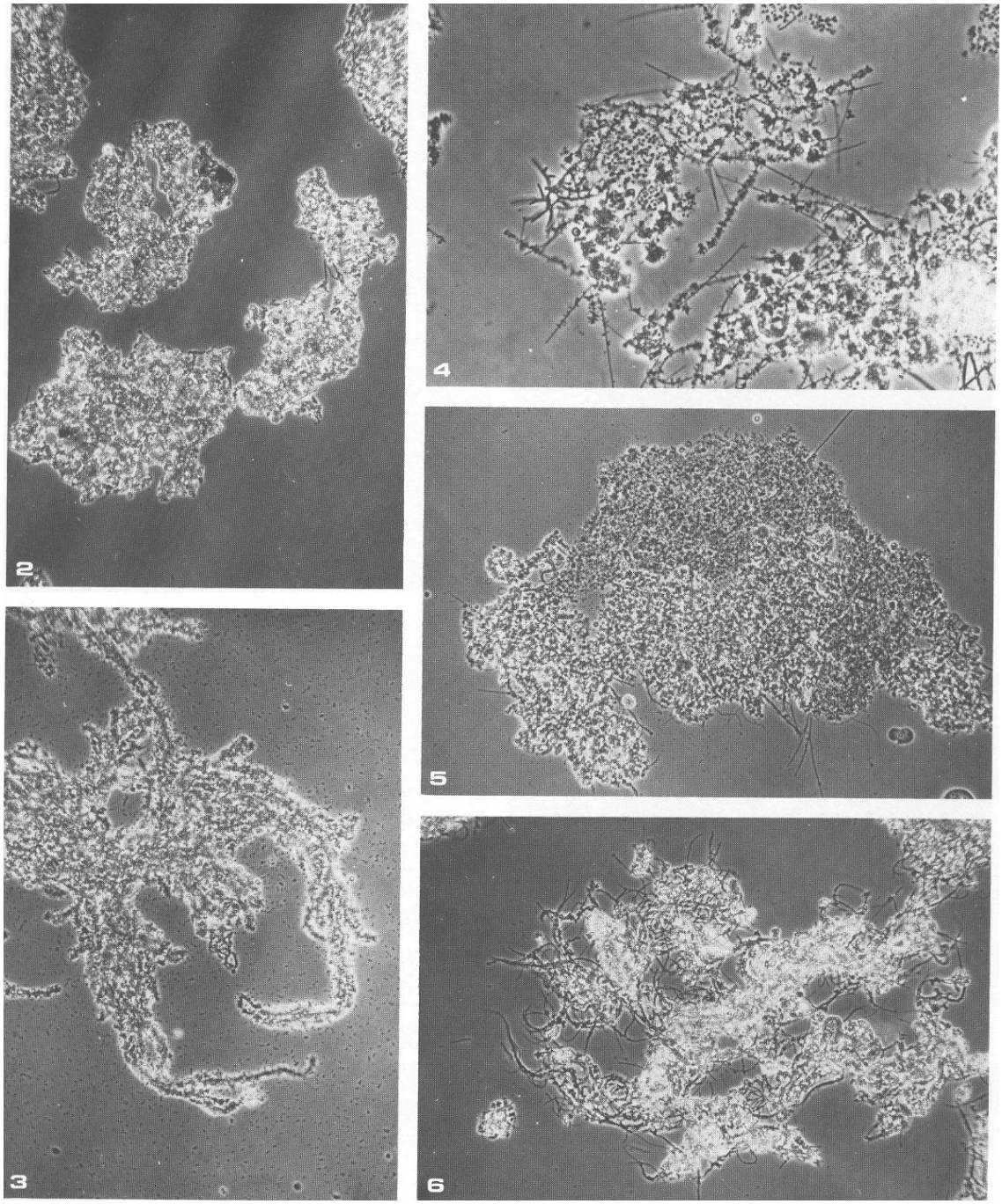
Τα πρώτα χρησιμοποιούνται όταν το αντικείμενο που θέλουμε να παρατηρήσουμε βρίσκεται μέσα σε υδατική διάλυση, ενώ τα δεύτερα χρησιμοποιούνται μετά από αφυδάτωση του αντικειμένου που θέλουμε να παρατηρήσουμε.

**Ασκήσεις**

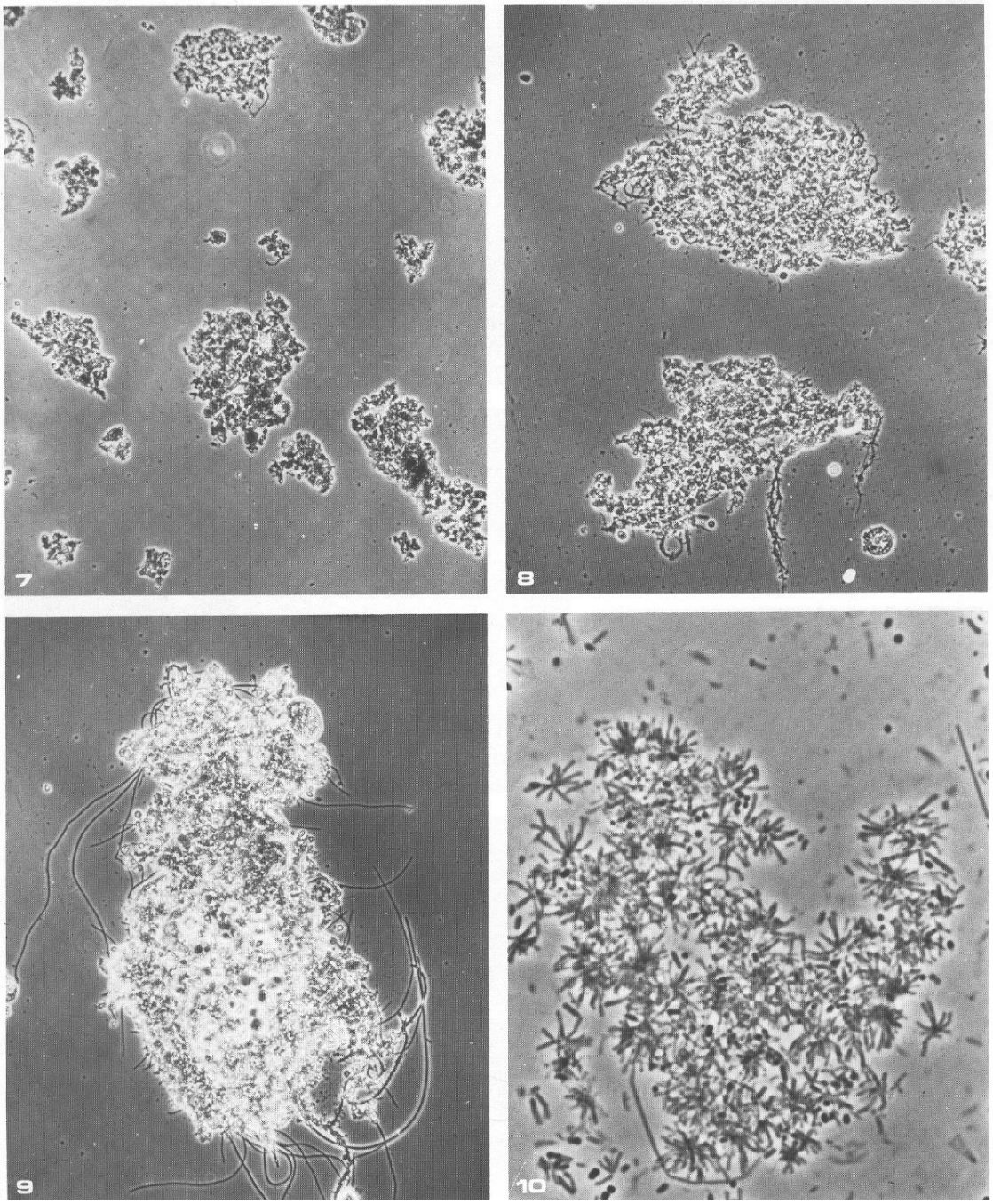
Παρατήρηση ανάμικτου υγρού από την δεξαμενή αερισμού βιολογικού καθαρισμού.

Ταυτοποίηση (αναγνώριση του είδους και του αριθμού )των πρωτοζώων που εμφανίζονται στην λάσπη. Βγάλτε συμπεράσματα για την οξυγόνωση της δεξαμενής αερισμού, την είσοδο τοξικών στην μονάδα, την ηλικία της λάσπης και την πιθανή διαταραχή του συστήματος.

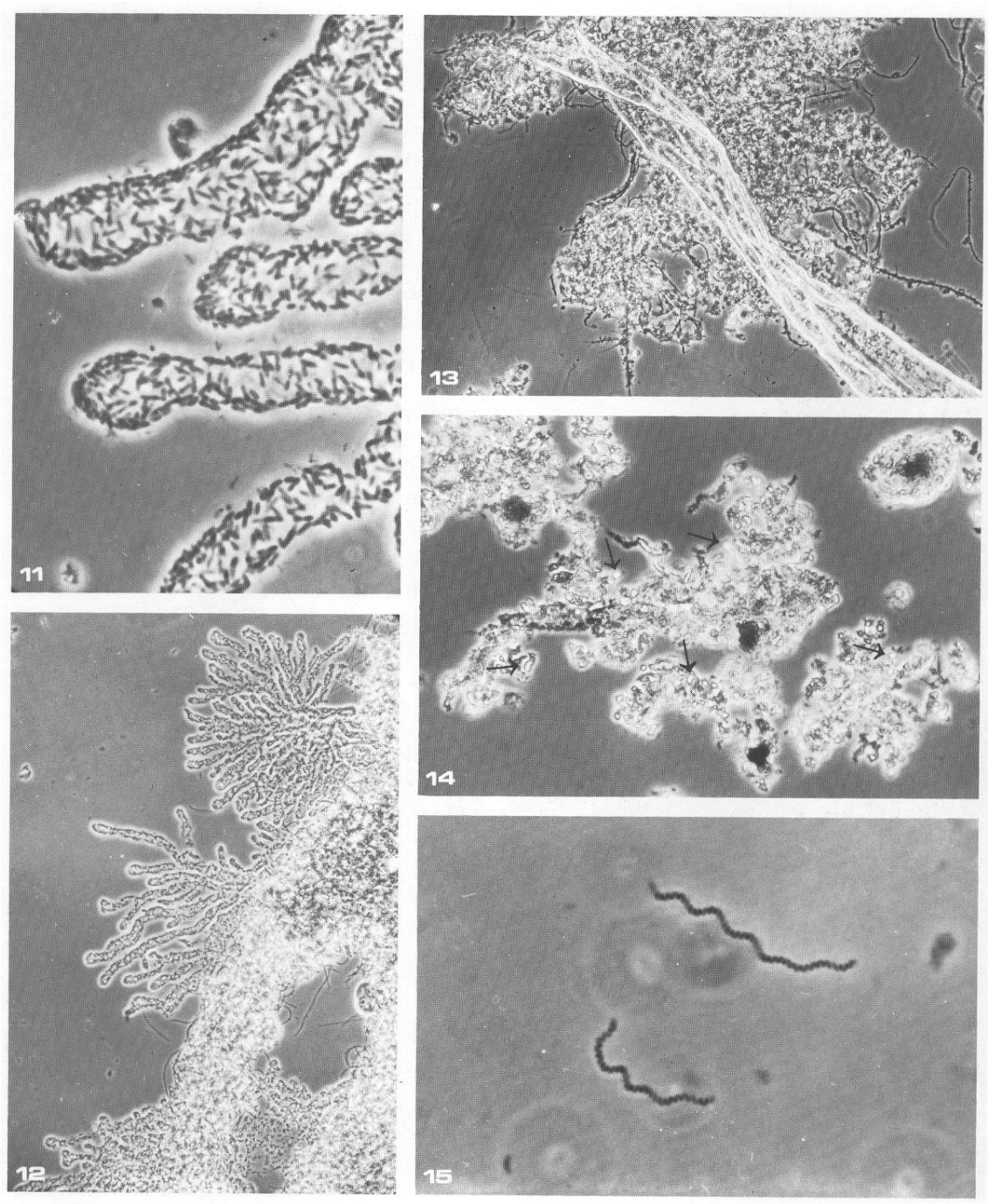
Ταυτοποίηση των ιδιοτήτων της νιφάδας (σχήμα, στερεότητα, δομή, μέγεθος, σύνθεση και ανάπτυξη ελευθέρως κινουμένων βακτηρίων). Κάντε χρήση των πινάκων από τα παραδείγματα 1 & 2. Βγάλτε τα συμπεράσματα σας για την σχέση την σχέση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νιφάδων με την λειτουργία της εγκατάστασης από όπου προήλθε το δείγμα.



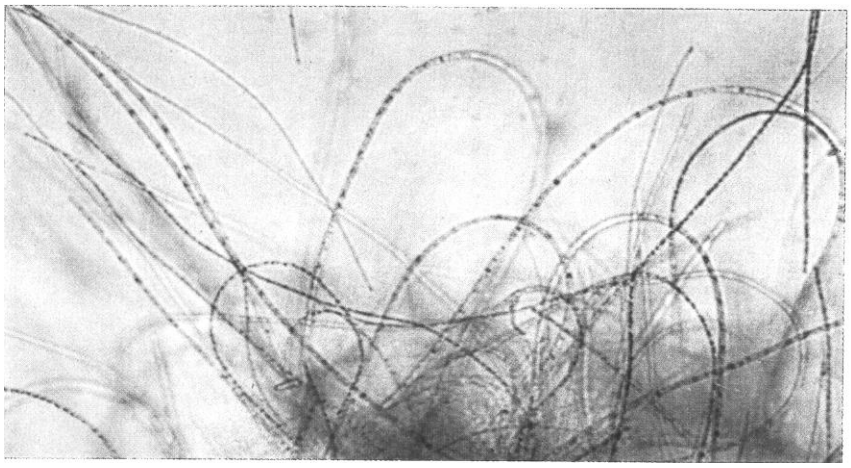

Σχήμα και δομή των νιφάδων:
2. Ισχυρή συμπαγής, x90
3. Ακανόνιστη – πολλά βακτήρια, x90
4. Ανοικτή δομή , x180
5. Μεγάλη με χαλαρή δομή, x90
6. Νηματοειδή με μικρές νιφάδες Agglomerate, x90



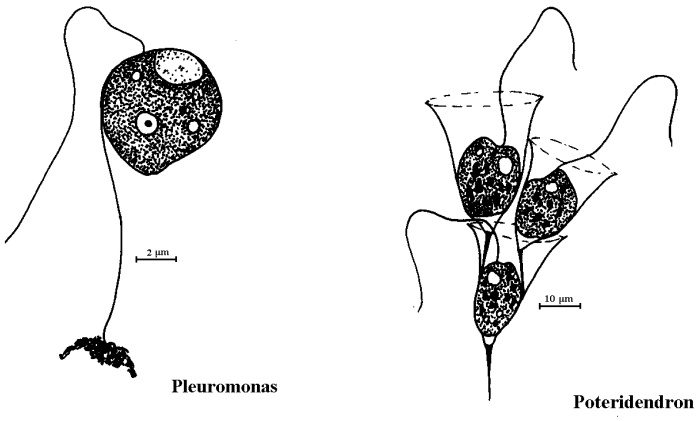

Μέγεθος και ποικιλότητα των νιφάδων:
7. Μικρές νιφάδες, διάμετρος 150 μm, μεγέθυνση x115.
8. Μεσαίου μεγέθους νιφάδες, διάμετρος 150 –500 μm, μεγέθυνση x115.
9. Μεγάλη νιφάδα, διάμετρος 500 μm, μεγέθυνση x115.
10. Νιφάδα με μικρή ποικιλότητα, x1150



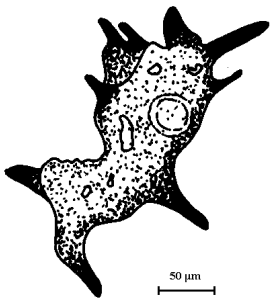

Σύνθεση των νιφάδων:
11. «δάκτυλα» ζωόγλιων, x890
12. Αποικίες ζωόγλιων, x180
13. Μεγάλες μη αποικοδομήσιμες οργανικές ίνες, x180
14. Νιφάδες λάσπης με μεγάλο αριθμό ανόργανων σωματιδίων, x180
15. Spirochäten, x1350

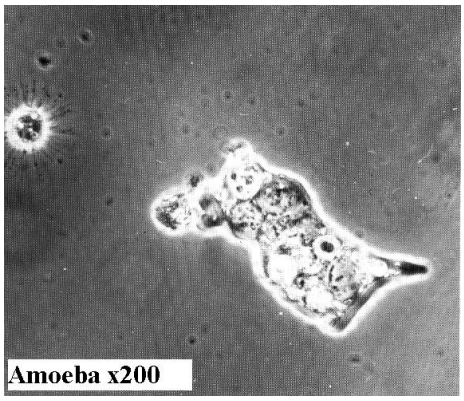


16. Beggiatoa (βακτήριο θείου). Τα σωματίδια που διαθλούν το φως είναι σταγονίδια θείου.

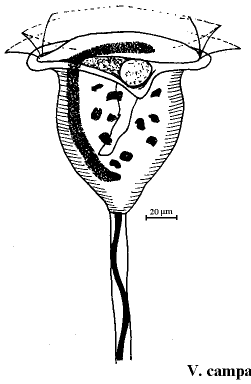



17. Μαστιγοφόρα

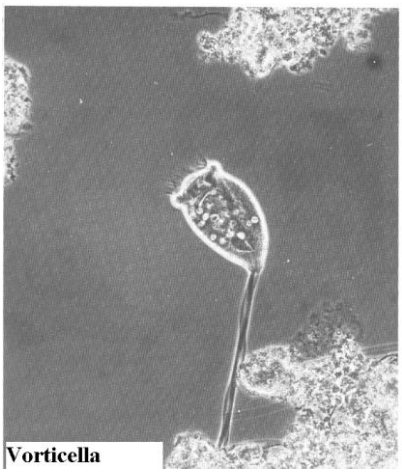


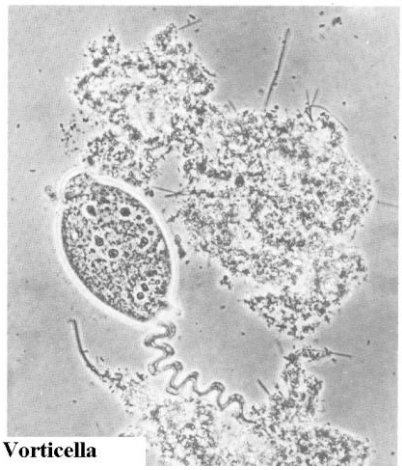

18. Αμοιβάδες




V. campanula



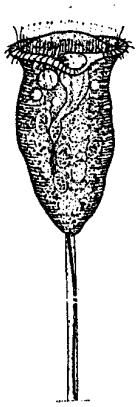
Vorticella



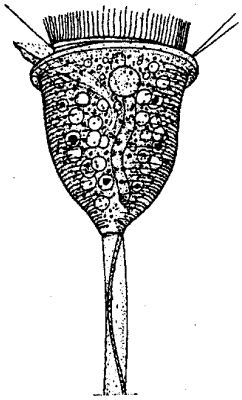
Vorticella

19, 20, Vorticella sp., 21 Vorticella sp με συσπειρωμένο μίσχο

V. microstoma

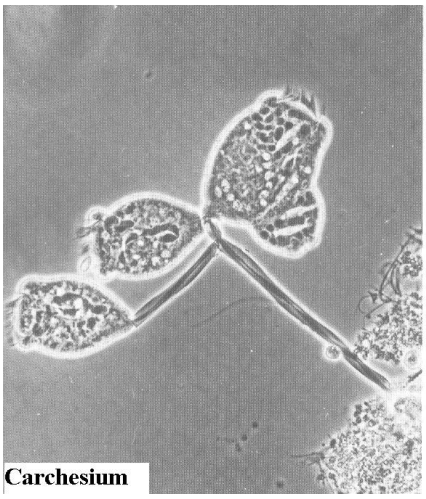


V. convalaria

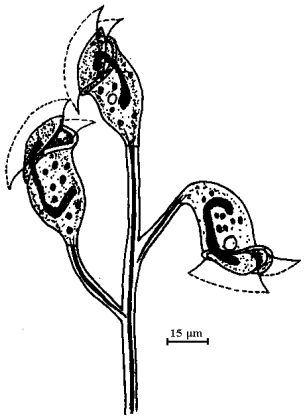


V. campanula

22. Συγκριτική αναπαράσταση των τριών βασικών ειδών Vorticella sp.

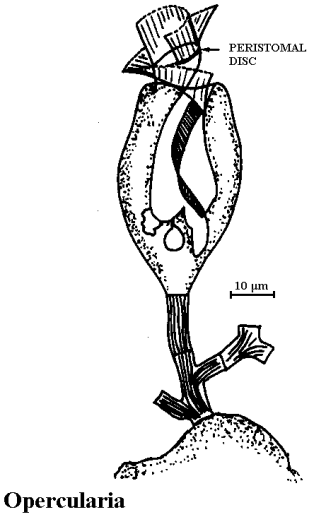


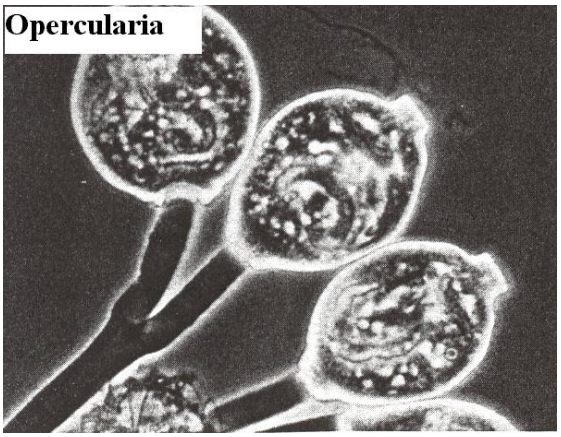
Carchesium



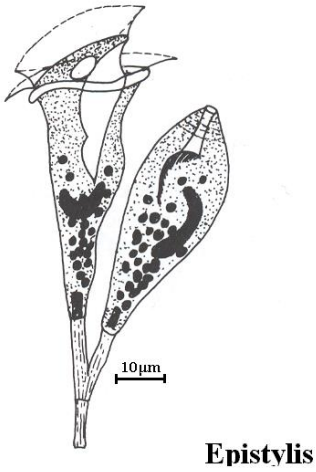

Carchesium

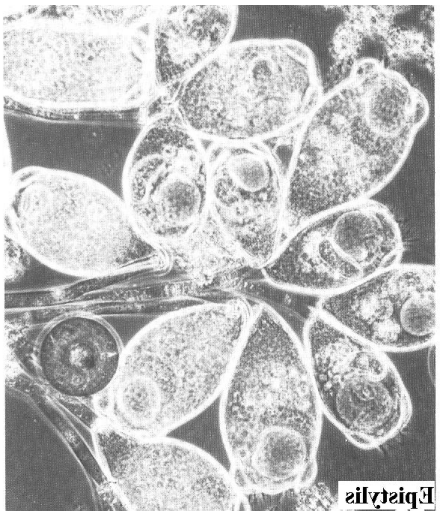
23. Carchesium



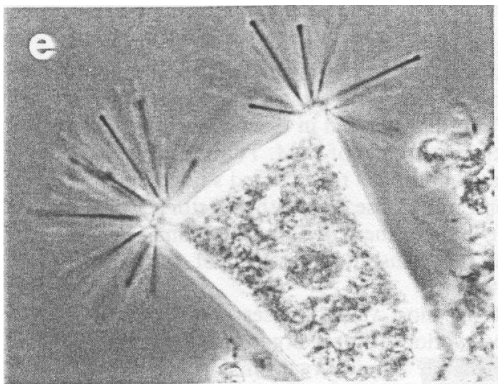




24. Opercularia

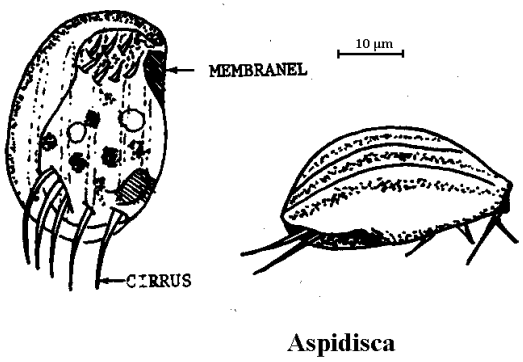


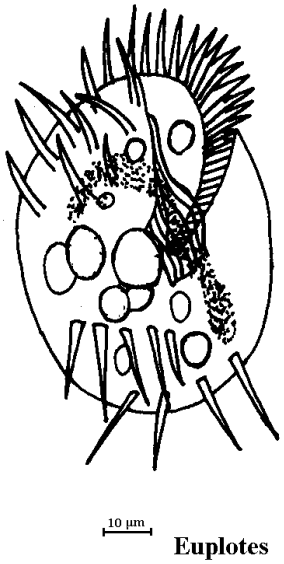
25. Epistylis



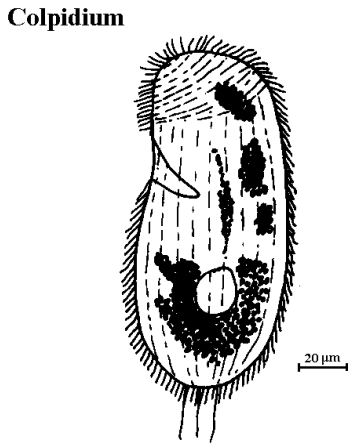
26. Tocophrya



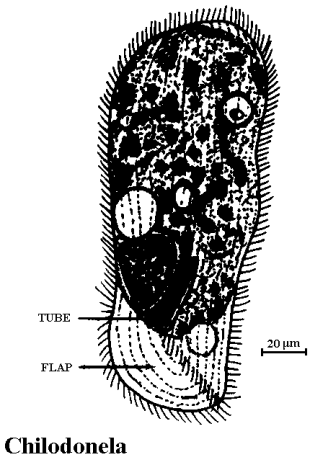

27. Aspidisca



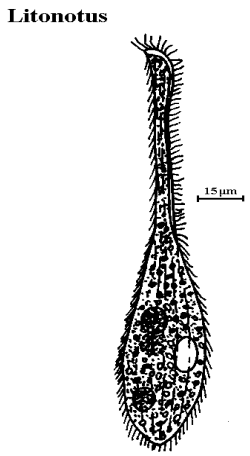

28. Euplotes



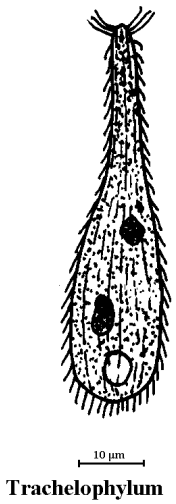

29. Colpidium



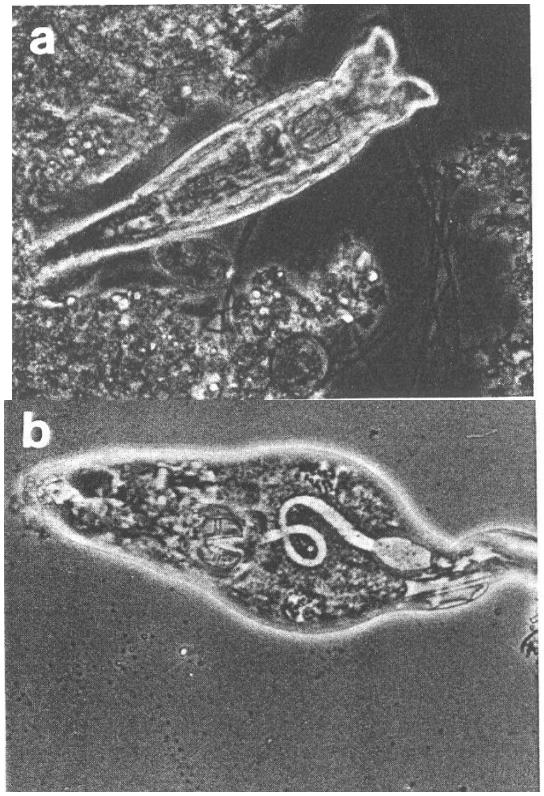

30. Chilodonella




31. Litonotus




32. Trachelophylum




33. Rotifers (Τροχόζωα)

# ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ

**Ονοματεπώνυμο:**_____

**ΑΜ/Ομάδα:**_____/_____

| ΛΑΣΠΗ | ΝΙΦΑΔΕΣ | | |
|---|---|---|---|
| Χρώμα | **Σχήμα** | **Δομή** | **Μέγεθος** |
| ☐ ελαφρώς καφέ | ☐ Στρόγγυλο | ☐ ισχυρή | ☐ μικρό |
| ☐ …… | ☐ Ακανόνιστο | ☐ χαλαρή | ☐ μέσο |
| Οσμή | ☐ …… | ☐ …… | ☐ μεγάλο |
| ☐ μουχλιασμένη | | | ☐ δικτυωμένο |
| ☐ νωπή | | | |
| ☐ …… | Παρουσία νηματοειδών: 1) …… | | |

**ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

| **Βλεφαριδωτά ελεύθερα** | | Βλεφαριδωτά εδραία | |
|---|---|---|---|
| Aspidisca | | Votricella conv. | |
| Tokophrya | | Votricella micr. | |
| Euplotes | | Votricella camp. | |
| Tetrahymena | | Carchesium | |
| Glaucoma | | Opercularia | |
| Colpidium | | Epistylis | |
| Paramecium | | | |
| Coleps | | | |
| Trachelophyllum | | | |
| Litonotus | | | |
| Rotifer | | **Βακτήρια** | |
| | | Ζωόγλοια | |
| | | Beggiatoa | |
| | | | |
| | | | |
| **Αμοιβάδες** | | **Μαστιγοφόρα** | |
| | | Pleuromonas | |
| | | Trogonomonas | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

| 1) | | 2) | | |
|---|---|---|---|---|
| Σπάνια | 0 | Περιστασιακά | 1 | (1-5 οργανισμοί) |
| Μικρή | 1 | Μερικά | 2 | (5-10 οργανισμοί) |
| Μέτρια | 2 | Πολλά | 3 | (> 10 οργανισμοί) |
| Ισχυρή | 3 | Μαζικά | 4 | (μαζικά για βακτηρία) |
| Πολύ ισχυρή | 4 | | | |

# ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ

**Ονοματεπώνυμο:**_____

**ΑΜ/Ομάδα:**_____/_____

| ΛΑΣΠΗ | ΝΙΦΑΔΕΣ | | |
|---|---|---|---|
| Χρώμα | **Σχήμα** | **Δομή** | **Μέγεθος** |
| ☐ ελαφρώς καφέ | ☐ Στρόγγυλο | ☐ ισχυρή | ☐ μικρό |
| ☐ …… | ☐ Ακανόνιστο | ☐ χαλαρή | ☐ μέσο |
| Οσμή | ☐ …… | ☐ …… | ☐ μεγάλο |
| ☐ μουχλιασμένη | | | ☐ δικτυωμένο |
| ☐ νωπή | | | |
| ☐ …… | Παρουσία νηματοειδών: 1) …… | | |

**ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

| **Βλεφαριδωτά ελεύθερα** | | Βλεφαριδωτά εδραία | |
|---|---|---|---|
| Aspidisca | | Votricella conv. | |
| Tokophrya | | Votricella micr. | |
| Euplotes | | Votricella camp. | |
| Tetrahymena | | Carchesium | |
| Glaucoma | | Opercularia | |
| Colpidium | | Epistylis | |
| Paramecium | | | |
| Coleps | | | |
| Trachelophyllum | | | |
| Litonotus | | | |
| Rotifer | | **Βακτήρια** | |
| | | Ζωόγλοια | |
| | | Beggiatoa | |
| | | | |
| | | | |
| **Αμοιβάδες** | | **Μαστιγοφόρα** | |
| | | Pleuromonas | |
| | | Trogonomonas | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

| 1) | | 2) | | |
|---|---|---|---|---|
| Σπάνια | 0 | Περιστασιακά | 1 | (1-5 οργανισμοί) |
| Μικρή | 1 | Μερικά | 2 | (5-10 οργανισμοί) |
| Μέτρια | 2 | Πολλά | 3 | (> 10 οργανισμοί) |
| Ισχυρή | 3 | Μαζικά | 4 | (μαζικά για βακτηρία) |
| Πολύ ισχυρή | 4 | | | |