



Ελληνική Δημοκρατία  
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό  
Ίδρυμα Ηπείρου

# Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο

Ενότητα 2: Βασικές μικροβιολογικές  
μέθοδοι

Δρ Δήμητρα Ζωάκη-Μαλισιόβα  
Καθηγήτρια Εντομολογίας



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Τμήμα: Τεχνολόγων Γεωπόνων

Τίτλος Μαθήματος: Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο

Ενότητα 2: Βασικές μικροβιολογικές μέθοδοι

Όνομα Καθηγητή: Δρ Δήμητρα Ζωάκη-Μαλισιόβα

Βαθμίδα Καθηγητή: Καθηγήτρια

Άρτα, 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



# Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



# Χρηματοδότηση

- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «**Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση**» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.
- Το έργο «**Ανοιχτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Ηπείρου**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



# Βασικές μικροβιολογικές μέθοδοι

# Σκοποί ενότητας

- Περιγραφή των βασικών μικροβιολογικών μεθόδων και χειρισμού μικροβίων στο εργαστήριο.



# Περιεχόμενα ενότητας

- Βασικές μικροβιολογικές μέθοδοι.



# Βασικές μικροβιολογικές μέθοδοι



# Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

- Σε ένα εργαστήριο λαμβάνουν χώρα μια σειρά από μικροβιολογικές μέθοδοι με σκοπό την **απομόνωση, καλλιέργεια και ταυτοποίηση** των μικροοργανισμών, αλλά και τη **μελέτη της φυσιολογίας** τους
- Κάθε εργαστήριο να είναι εξοπλισμένο με τα απαραίτητα όργανα, συσκευές και υλικά προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι παραπάνω μέθοδοι

# Μικροβιολογικές μέθοδοι

- Κάθε φυσικός βιότοπος περιέχει κατά κανόνα μεικτούς μικροβιακούς πληθυσμούς εξαιρετικά ετερόκλιτους
- Σχεδόν αδύνατη η περίπτωση ανάπτυξης «καθαρών» μικροβιακών πληθυσμών, δηλαδή ενός και μόνο είδους
- Προβληματική, αν όχι αδύνατη, η μελέτη των επί μέρους μικροβιακών ειδών στο φυσικό τους βιότοπο



# Μικροβιολογικές μέθοδοι

- **Λύση προβλήματος**

- **Απομόνωση** του υπό μελέτη μικροβιακού είδους από το φυσικό του περιβάλλον και τους άλλους μικροοργανισμούς που το συνοδεύουν
- Πολλαπλασιασμός ως **καθαρή καλλιέργεια** πάνω σε κάποιο κατάλληλο, στείρο θρεπτικό υλικό
- Προφύλαξη από οποιαδήποτε ενδεχόμενη μόλυνση που μπορεί να προκληθεί από άλλους μικροοργανισμούς που αφθονούν παντού στο περιβάλλον



# Θρεπτικά υλικά και καλλιέργεια μικροοργανισμών

- Τα θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για την ανάπτυξη, διατήρηση και μελέτη των μικροοργανισμών
- Σε θρεπτικά υλικά αναπτύσσονται οι μύκητες, τα βακτήρια και οι ζύμες
- **Σκοπός:** Προσομοίωση στο εργαστήριο των συνθηκών, που επικρατούν στο περιβάλλον, που ζουν με φυσικό τρόπο τα μικρόβια

# Θρεπτικά μέσα/υποστρώματα/υλικά

- **Θρεπτικό υπόστρωμα ή θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ή θρεπτικό υλικό** ονομάζεται κάθε υγρό ή στερεό μέσο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την *in vitro* ανάπτυξη των μικροοργανισμών
- Περιέχουν διάφορα θρεπτικά στοιχεία και έτσι καλύπτουν τις θρεπτικές τους απαιτήσεις
  - Άνθρακας, άζωτο, οξυγόνο, φωσφόρος, θείο, υδρογόνο, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία (νικέλιο, μαγγάνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μολυβδαίνιο, κοβάλτιο



# Θρεπτικά μέσα/υποστρώματα/υλικά

- **Φυσικό υπόστρωμα:** πάνω ή μέσα του ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται (ενδιαίτημα), π.χ. ορός αίματος για παθογόνα ζώων και ανθρώπου, γάλα για μικροοργανισμούς του γάλακτος, εκχύλισμα εδάφους για μικροοργανισμούς εδάφους κ.λπ.
- **Τεχνητό μέσο:** παρασκευάζεται ως υδατικό διάλυμα θρεπτικών συστατικών τα οποία απαιτούνται, για την ανάπτυξη του κάθε είδους μικροοργανισμού



# Θρεπτικά μέσα/υποστρώματα/υλικά





# Θρεπτικό υλικό

- Πρέπει να πληροί τους εξής κανόνες-αρχές
  - Πηγή άνθρακα & ενέργειας
  - Πηγή αζώτου
  - Αυξητικοί παράγοντες
  - Ανόργανα άλατα & ιχνοστοιχεία
  - pH





# Σύσταση θρεπτικού υλικού (1)

- **Νερό:** Το μικροβιακό κύτταρο περιέχει νερό σε ποσοστό 70-80%. Επίσης, τα κύτταρα απαιτούν ένα υδατικό περιβάλλον λόγω του ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις και η μεταφορά των συστατικών λαμβάνει χώρα μόνο παρουσία νερού. Επιπρόσθετα, το νερό διατηρεί όλα τα συστατικά του κυτοπλάσματος σε διάλυση
- Το θρεπτικό υλικό πρέπει οπωσδήποτε να περιέχει νερό (τα διάφορα συστατικά του διαλύονται σε νερό)
- Πρέπει πάντα να είναι **απιονισμένο ή απεσταγμένο** (όχι νερό βρύσης!), γιατί μπορεί να περιέχει διάφορα στοιχεία, όπως ιόντα Ca, P, Mg, τα οποία δημιουργούν ιζήματα όταν αντιδράσουν με πεπτόνες ή άλλα συστατικά του υλικού



# Σύσταση θρεπτικού υλικού (2)

- **Πηγή άνθρακα:** αποτελεί το σημαντικότερο στοιχείο στη θρέψη των μικροοργανισμών δεδομένου, ότι αποτελεί το σκελετό των βασικών μορίων που συμμετέχουν στη δόμηση του κυττάρου, όπως είναι οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες
- **Ετερότροφοι μικροοργανισμοί:** χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις, όπως σάκχαρα (η πιο εύκολα αφομοιώσιμη πηγή άνθρακα είναι το σάκχαρο γλυκόζη), αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες (οι πρωτεολυτικοί μικροοργανισμοί που υδρολύουν πρωτεΐνες και απαμινώνουν διάφορα αμινοξέα), αλλά και λιπαρές ουσίες (λιπολυτικοί μικροοργανισμοί που παράγουν λιπάσες)
- **Αυτότροφοι μικροοργανισμοί:** χρησιμοποιούν το  $\text{CO}_2$ , για να καλύψουν τις ανάγκες τους σε άνθρακα



# Σύσταση θρεπτικού υλικού (3)

- **Πηγή ενέργειας.** Τα μικροβιακά κύτταρα χρειάζονται ενέργεια προκειμένου να επιτελέσουν τις βιοσυνθετικές διεργασίες, που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξή τους.
- Με εξαίρεση τους **φωτότροφους** που εξοικονομούν την απαραίτητη ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης, οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί (**χημειοτρόφοι**) καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες είτε από τη διάσπαση οργανικών ουσιών μέσω της ζύμωσης ή της αναπνοής, είτε από την οξείδωση ανόργανων ενώσεων
- Στο θρεπτικό υλικό ως πηγή ενέργειας πρέπει να περιέχονται οργανικές (σάκχαρα, αμινοξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια) ή ανόργανες ενώσεις (π.χ. ενώσεις θείου, αζώτου, σιδήρου κ.ά.), ανάλογα με τον τύπο του μικροοργανισμού για τον οποίο προορίζεται το υλικό



# Σύσταση θρεπτικού υλικού (4)

- **Πηγή αζώτου:** είναι το αμέσως επόμενο μετά τον άνθρακα σημαντικότερο συστατικό στη μικροβιακή θρέψη λόγω του ότι συμμετέχει στη σύνθεση βασικών βιομορίων του μικροβιακού κυττάρου
- Η πηγή αζώτου σε ένα θρεπτικό υλικό μπορεί να είναι **ανόργανη** (συνήθως αμμωνιακά άλατα και αμμωνία, αλλά και νιτρικά άλατα) ή **οργανική** (πρωτεΐνες, πεπτίδια ή αμινοξέα)



# Αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί

- **Αζωτοδεσμευτικοί** μικροοργανισμοί (π.χ. βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Azotobacter*): εξασφαλίζουν το απαιτούμενο άζωτο από τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως **αζωτοδέσμευση**
- Με την αζωτοδέσμευση, οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν το μοριακό άζωτο της ατμόσφαιρας σε ανόργανες ενώσεις αζώτου (π.χ. αμμωνία και αμμωνιακά άλατα), τις οποίες στη συνέχεια χρησιμοποιούν για να συνθέσουν τα αμινοξέα τους και άλλα βιομόρια που περιέχουν άζωτο



# Σύσταση θρεπτικού υλικού (5)

- **Αυξητικοί παράγοντες:** Πρόκειται για ουσίες, που οι μικροοργανισμοί δεν έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν (π.χ. λόγω έλλειψης του απαραίτητου ενζυμικού συστήματος), ωστόσο είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους και κατά συνέπεια πρέπει να τις προσλάβουν έτοιμες από το μέσο ανάπτυξής τους
- Τέτοιες ουσίες είναι συνήθως **βιταμίνες** (π.χ. βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, θειαμίνη, ριφοβλαβίνη, νιασίνη κ.ά.), οι οποίες λειτουργούν ως συνένζυμα στο μεταβολισμό
- Οι μικροοργανισμοί έχουν ανάγκη κυρίως από υδατοδιαλυτές βιταμίνες (κυρίως του β-συμπλόκου)
- Για πολλούς μικροοργανισμούς, αυξητικοί παράγοντες είναι πουρίνες και πυριμιδίνες που απαιτούνται για τη σύνθεση των νουκλεϊκών τους οξέων (γενετικό υλικό) ή διάφορα αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση



# Σύσταση θρεπτικού υλικού (6)

- **Ανόργανα άλατα και ιχνοστοιχεία:** Η παρουσία τους είναι απαραίτητη στο θρεπτικό υπόστρωμα, για την καλύτερη ανάπτυξη των μικροοργανισμών
- Ιδιαίτερη σημασία έχουν τα φωσφορικά άλατα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη φωσφορυλίωση των ενδιάμεσων προϊόντων της γλυκόλυσης
- Απαραίτητα είναι διάφορα άλατα Na, K, Ca και Mg. Ορισμένα ανόργανα συστατικά επηρεάζουν την περατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ άλλα είναι απαραίτητα για τη σύνθεση τοξινών και μεταβολιτών
- Στα ιχνοστοιχεία κατατάσσονται τα Mn, Fe, Cu, Zn, Co, Mo, τα οποία οι μικροοργανισμοί χρειάζονται σε πολύ μικρές ποσότητες, ωστόσο είναι εντελώς απαραίτητα για τη μικροβιακή ανάπτυξη, λόγω του ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κυρίως ως συμπαραγοντες ενζυμικών συστημάτων του κυττάρου



# Σύσταση θρεπτικού υλικού (7)

- **Κατάλληλο pH:** Πέρα από τα διάφορα θρεπτικά συστατικά που πρέπει να περιέχονται σε ένα θρεπτικό υλικό, πρέπει επίσης να εξασφαλίζεται η κατάλληλη για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού τιμή pH
- Τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε ουδέτερα pH, δηλαδή τιμές γύρω στο 7, ενώ οι μύκητες προτιμούν όξινα pH με τιμές γύρω στο 5
- Η ρύθμιση του pH ενός θρεπτικού υλικού, όπου απαιτείται, γίνεται με την προσθήκη διαλύματος οξέος (π.χ. οξικό, υδροχλωρικό) ή βάσης (π.χ. NaOH)





# Διάκριση θρεπτικών υλικών

- **Φυσική κατάσταση (υφή):** υγρά και στερεά
  - Στερεοποίηση υγρών υποστρωμάτων με **1-2% άγαρ** (παράγοντας ζελατινοποίησης)
- **Χημική σύσταση (σύνθεση-προέλευση):** συνθετικά ή τεχνητά, ημισυνθετικά και φυσικά
  - **Συνθετικά:** καθορισμένη σύσταση
  - **Φυσικά:** άγνωστη, αλλά πλούσια, χημική σύσταση



# Διάκριση θρεπτικών υλικών

- **Βαθμός εξειδίκευσης (1)**

- **Γενικά ή μη επιλεκτικά:** περιέχουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, που επιτρέπουν την ανάπτυξη πολύ μεγάλου αριθμού διαφορετικών μικροοργανισμών. Συνήθως δεν είναι γνωστό ποια ακριβώς είναι αυτά τα θρεπτικά συστατικά, ούτε η συγκέντρωσή τους, και συνήθως προκύπτουν από την ενζυμική διάσπαση διαφόρων φυτικών και ζωικών ιστών, κυττάρων ζύμης κ.λπ.. Η διάσπαση αυτή οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών, αμινοξέων, βιταμινών κ.λπ.



# Διάκριση θρεπτικών υλικών

- **Βαθμός εξειδίκευσης (2)**

- **Εξειδικευμένα:** Η σύνθεσή τους ευνοεί την ανάπτυξη ορισμένων κατηγοριών μικροοργανισμών και δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη κάποιων άλλων. Αυτά τα υλικά χρησιμοποιούνται για την απομόνωση συγκεκριμένων κατηγοριών μικροοργανισμών. Σχεδόν κάθε γενικό υπόστρωμα μπορεί να μετατραπεί σε εξειδικευμένο με προσθήκη κάποιας χημικής ουσίας (π.χ. αντιβιοτικού, χρωστικής, άλατος κ.ά.), που παρεμποδίζει την ανάπτυξη κάποιων ομάδων μικροοργανισμών ή με αλλαγή της πηγής C & N, ή με αλλαγή του pH του



# Διάκριση θρεπτικών υλικών

- **Διάκριση εξειδικευμένων θρεπτικών υλικών**
  - **Εκλεκτικά (selective):** εκείνα που επιτρέπουν την ανάπτυξη κάποιων μικροβιακών ομάδων, ενώ ταυτόχρονα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη κάποιων άλλων, διότι περιέχουν κάποιους παρεμποδιστικούς για την ανάπτυξή τους παράγοντες
  - **Επιλεκτικά (elective):** εκείνα που ικανοποιούν τις θρεπτικές απαιτήσεις μίας ή περισσότερων ομάδων μικροοργανισμών, χωρίς όμως να παρεμποδίζουν τελείως άλλες ομάδες
  - **Διαγνωστικά:** σε ορισμένα υποστρώματα είναι δυνατός ο διαχωρισμός σε διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών



# Διάκριση θρεπτικών υλικών

- **Αν υποστηρίζεται περισσότερο η αύξηση των βακτηρίων (βακτηριολογικά) ή των μυκήτων (μυκητολογικά)**
  - **Βακτηριολογικά:** θρεπτικό υπόστρωμα αντιπροσωπεύει το φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης του βακτηρίου (συνήθως αυξημένες θρεπτικές απαιτήσεις)
  - **Μυκητολογικά:** συνήθως σε απλά θρεπτικά υποστρώματα με σάκχαρα, πηγή N (ανόργανη ή οργανική), ελάχιστα ιχνοστοιχεία, συνήθως υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (4%) και χαμηλό εύρος pH (3,8-5,6)
    - Μύκητες εκκρίνουν ένζυμα, που διασπούν μεγάλα οργανικά μόρια για να μπορέσουν να εισέλθουν στο κύτταρο
    - Μερικοί μύκητες απαιτούν βιταμίνες και άλλοι απαιτούν σύνθετα υποστρώματα με ευρύ φάσμα θρεπτικών ουσιών, όπως πεπτόνη

# Διάκριση θρεπτικών υλικών

- **Υποστρώματα εμπλουτισμού:** απομόνωση συγκεκριμένου είδους μικροοργανισμοί, που βρίσκεται σε χαμηλούς πληθυσμούς σε ένα περιβάλλον
- **Υποστρώματα για μικροβιολογικές βιοδοκιμές:** χρήση μικροοργανισμών-δεικτών για την παρουσία αντιβιοτικών, βιταμινών κ.λπ.
  - **Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MCI):** η μικρότερη συγκέντρωση του ανασταλτικού παράγοντα, που είναι ικανή να αναστείλει την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού-δείκτη



# Διάκριση θρεπτικών υλικών

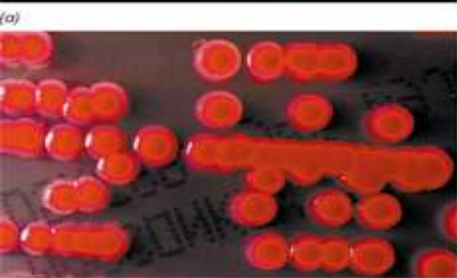
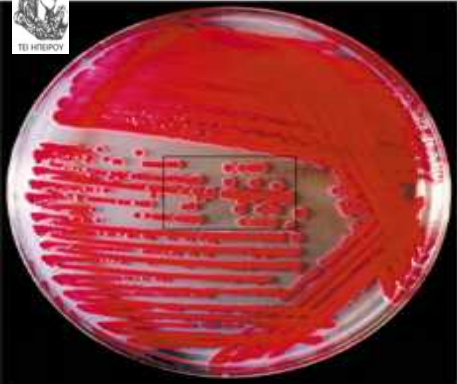
- Υποστρώματα για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών
- **API:** πλαστικοί δίσκοι με πολλούς μικρούς σωλήνες μέσα στους οποίους έχουν τοποθετηθεί διάφορα λυοφιλιόμενα υποστρώματα; Ακολουθεί εμβολιασμός με εναιώρημα κυττάρων, επώαση και αξιολόγηση αποτελεσμάτων με βάση την αλλαγή του χρώματος





# Μικροβιακή καλλιέργεια (1)

- **Ορισμός:** μικροβιακή καλλιέργεια καλείται το σύνολο δοχείο καλλιέργειας, θρεπτικό υπόστρωμα και εμβόλιο μικροοργανισμού
- **Καθαρή ή αμιγής μικροβιακή καλλιέργεια:** μικροβιακή καλλιέργεια που περιέχει κύτταρα ενός και μόνο μικροοργανισμού, π.χ. αποικία



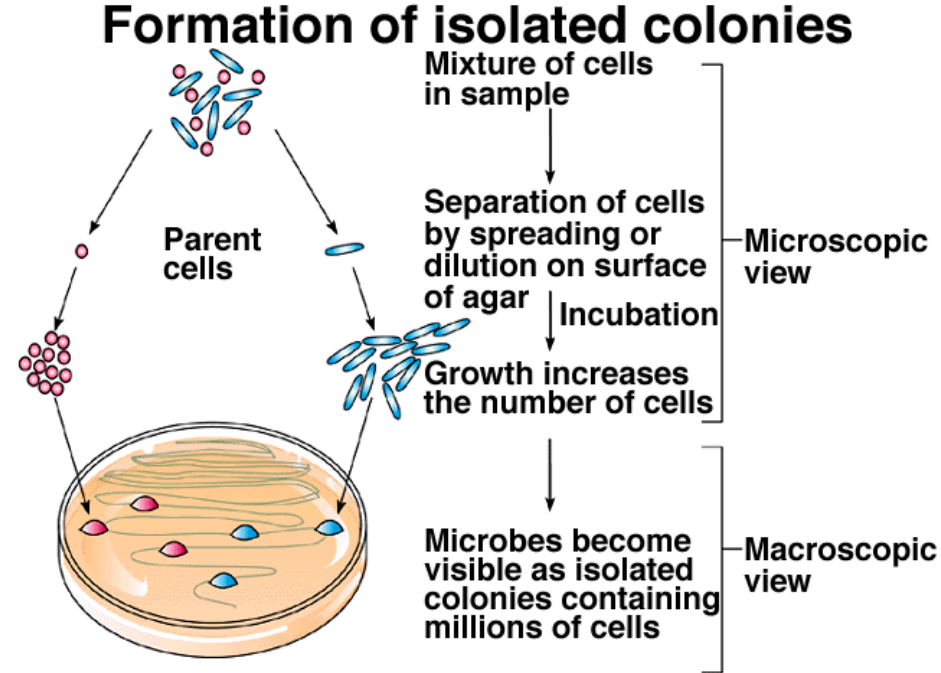




# Μικροβιακή καλλιέργεια (2)

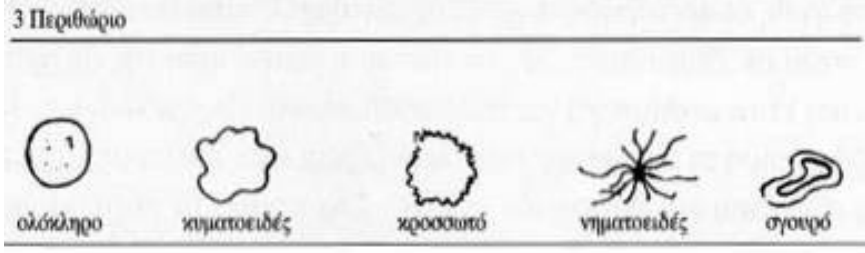
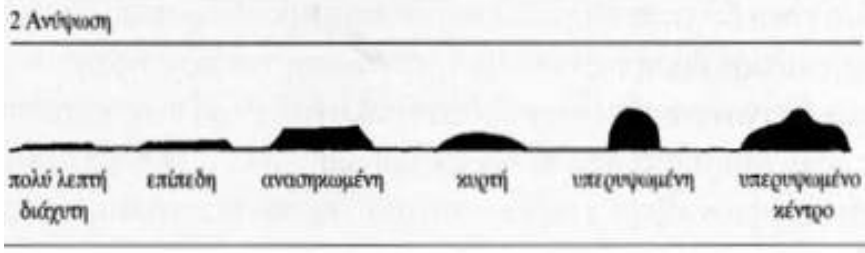
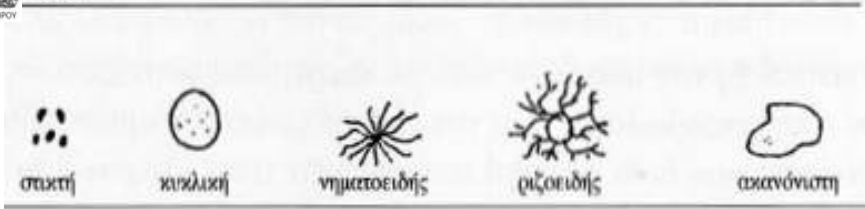
- Για τη δημιουργία αμιγούς καλλιέργειας απαιτείται η χρήση στερεών θρεπτικών υλικών
- Ακίνητοποιούν τα κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν απομονωμένες μάζες, που καλούνται **αποικίες**
- **Αποικίες επιτρέπουν το μακροσκοπικό έλεγχο της καθαρότητας μιας καλλιέργειας**

Kathleen Park Talaro and Arthur Talaro, *Foundations in Microbiology*, 3e Copyright © 1999 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.





Μορφή



# Μορφή αποικιών (1)

- Χαρακτηριστική για κάθε είδος μικροοργανισμού
- Για τον ίδιο τον μικροοργανισμό μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, την παρουσία θρεπτικών συστατικών, την παρουσία οξυγόνου, κ.ά.

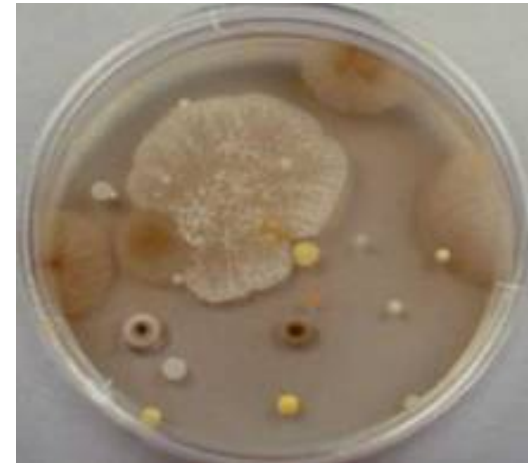
# Μορφή αποικιών (2)



**Αμιγείς καλλιέργειες**



**Μη αμιγείς καλλιέργειες**



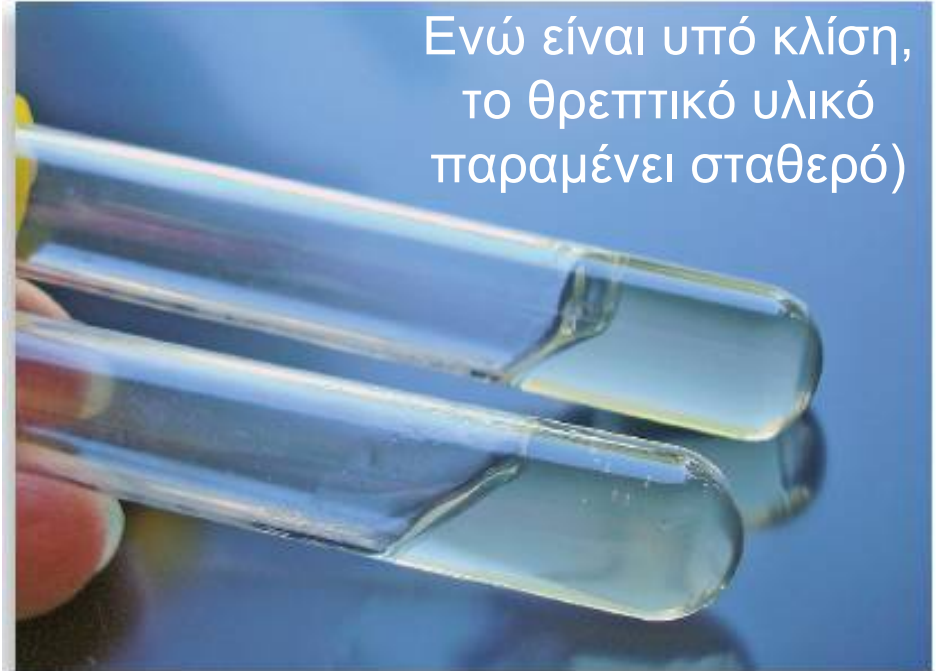
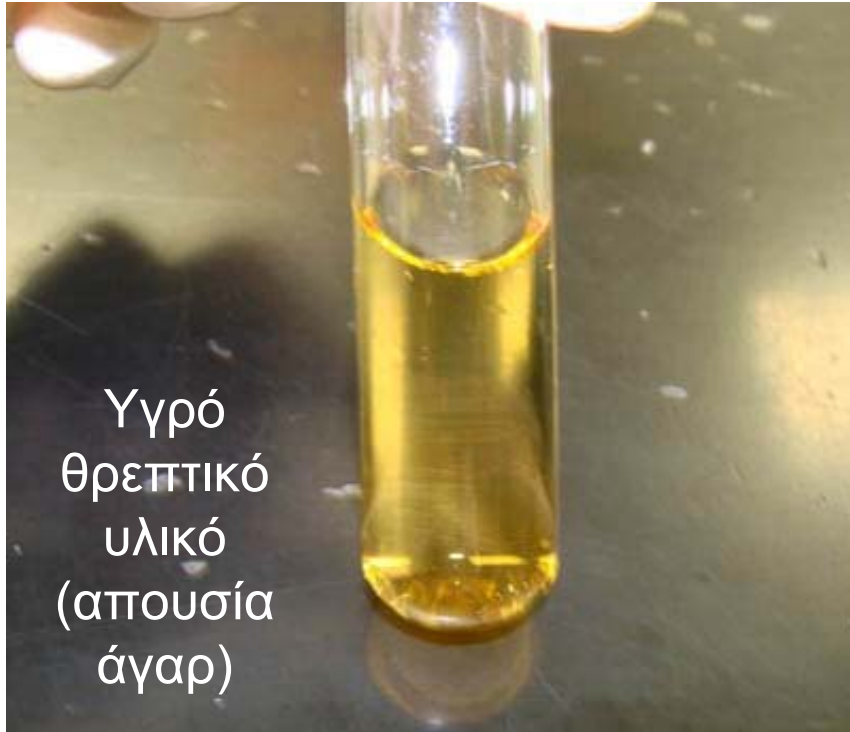


# Άγαρ (παράγοντας στερεοποίησης)

- **Άγαρ:** Είναι πολυσακχαρίτης (πολυμερές από D-γαλακτόζη, 3,6-άνυδρη-L-γαλακτόζη και γλυκουρονικό οξύ) που βρίσκεται στα θαλάσσια φύκη και υδατικό διάλυμα αυτού συγκέντρωσης 1% έχει την ιδιότητα να στερεοποιείται σε θερμοκρασία 35-45°C, με αποτέλεσμα να σχηματίζει μια πηκτή (ζελέ). Η πηκτή αυτή ρευστοποιείται πάλι μόνο εάν θερμανθεί μέχρι τους 80-100 °C. Συνήθως για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθεται άγαρ σε συγκέντρωση 1,5 %
- Εναλλακτικός στερεοποιητικός παράγοντας των θρεπτικών υλικών είναι η **ζελατίνη**



# Άγαρ (παράγοντας στερεοποίησης)



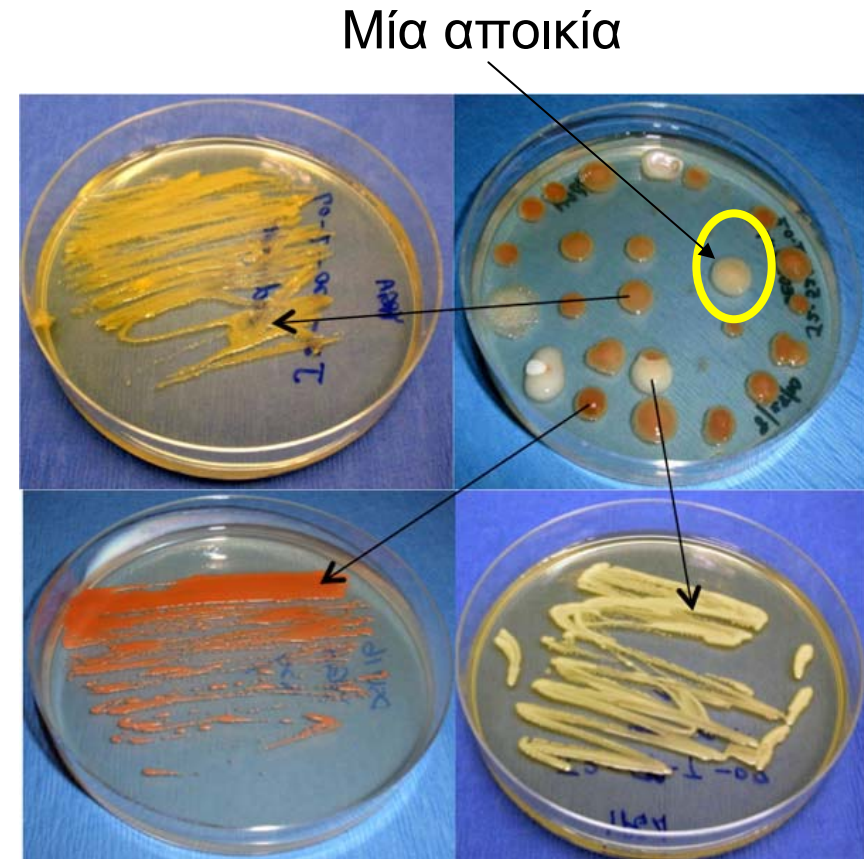
Στερεό θρεπτικό υλικό  
(παρουσία άγαρ)





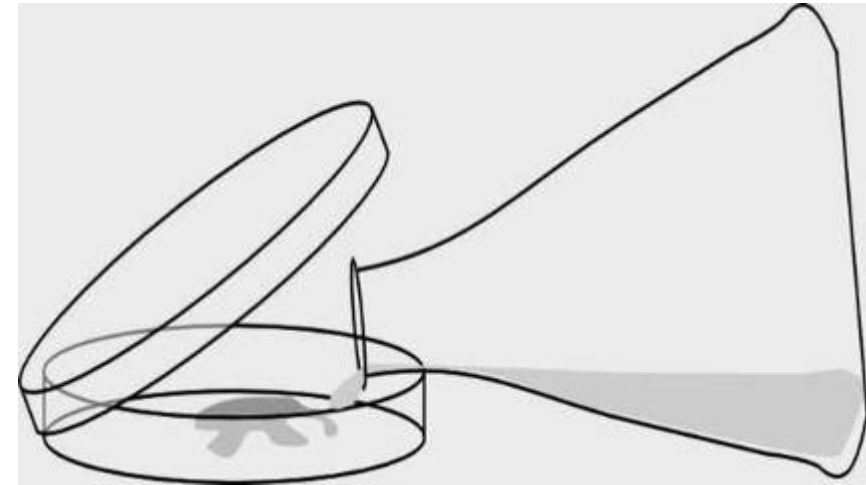
# Άγαρ (παράγοντας στερεοποίησης)

- Τα στερεά θρεπτικά υλικά έχουν ιδιαίτερη σημασία για την απομόνωση ενός μικροοργανισμού σε «καθαρή» καλλιέργεια, γιατί δίνουν τη δυνατότητα απομόνωσης μεμονωμένων αποικιών, η κάθε μία από τις οποίες αποτελεί και μία καθαρή καλλιέργεια
- Αυτό συμβαίνει γιατί κάθε αποικία προκύπτει από ένα και μόνο αρχικό κύτταρο και άρα όλα τα κύτταρα μιας αποικίας είναι απόγονοι ενός και μόνο μικροοργανισμού



# Άγαρ (παράγοντας στερεοποίησης)

- Διανομή των στερεών θρεπτικών υλικών σε τρυβλία γίνεται μετά την αποστείρωση του υλικού
- Τα τρυβλία είναι ήδη αποστειρωμένα από τον κατασκευαστή
- Διανομή γίνεται όσο ακόμα το υλικό είναι αρκετά ζεστό ( $\sim 45^{\circ}\text{C}$ ), ώστε να μην στερεοποιηθεί πριν μπει στα τρυβλία



Σχηματικά, διανομή στερεού θρεπτικού υλικού σε τρυβλίο Petri



# Πλεονεκτήματα άγαρ

- Δε διασπάται από τους μικροοργανισμούς (εκτός από κάποιες εξαιρέσεις) και κατά συνέπεια το στερεό υλικό δε ρευστοποιείται λόγω της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε αυτό
- Υδατικό διάλυμα με άγαρ χαμηλής συγκέντρωσης (1-1.5%) στερεοποιείται, όταν η θερμοκρασία του πέσει κάτω από τους 45°C (απαιτείται ωστόσο προηγούμενος βρασμός, ώστε να διαλυθεί το άγαρ στο θρεπτικό υλικό),
- Η πηκτή που σχηματίζεται είναι αρκετά σκληρή και ελαστική, ώστε να μη «σπάει» το θρεπτικό υλικό κατά τον εμβολιασμό με το βακτηριολογικό κρίκο
- Το στερεοποιημένο υλικό ρευστοποιείται πάλι μόνο με βρασμό (100°C)





# Μειονεκτήματα ζελατίνης (σε σχέση με το άγαρ)

- Διασπάται από πολλούς πρωτεολυτικούς μικροοργανισμούς και έτσι χάνει τη στερεοποιητική της ικανότητα,
- Απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση (7-10%) ζελατίνης για τη δημιουργία πηκτής,
- Η πηκτή ρευστοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία (37°C, που είναι η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος) με αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες πάνω από 35°C.

# Θρεπτικό υλικό για μύκητες

- Για την παρασκευή 1 λίτρου υλικού **PDA**
  - Βρασμός 500 g πατάτας σε 500 mL νερό για 30 min
  - Διήθηση εκχυλίσματος
  - Συμπλήρωση στον όγκο 1 L με νερό
  - Πρόσθεση 20 g δεξτρόζης και 15 g άγαρ
  - Βρασμός μέχρι να «λιώσει» το άγαρ
  - Αποστείρωση



# Θρεπτικό υλικό για βακτήρια

- Πεπτόνη 1%
- Εκχύλισμα ζύμης 1%
- Χλωριούχο νάτριο 0,5%
- Άγαρ 1,5%

# Αναγωγικά θρεπτικά υποστρώματα

- Πρόκειται για θρεπτικά υποστρώματα, στα οποία έχει προστεθεί κάποιος αναγωγικός παράγοντας, π.χ. θειογλυκολικό νάτριο, που δεσμεύει το οξυγόνο και δεν είναι πλέον διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς
- Θρεπτικό υπόστρωμα βράζει (εξαέρωση όλου του οξυγόνου) και εφαρμόζεται συνεχής ροή αέριου αζώτου, ενώ ως αναγωγικός παράγοντας χρησιμοποιείται π.χ. η κυστεΐνη
- Χρήση για την ανάπτυξη μόνο των **αναερόβιων** μικροοργανισμών



# Αποστείρωση (1)

- Οποιοδήποτε θρεπτικό υλικό ή εργαστηριακός εξοπλισμός (σιφώνια, δοκιμαστικοί σωλήνες, φιάλες κ.λπ.) που χρησιμοποιείται σε χειρισμούς μικροοργανισμών πρέπει προηγουμένως να υποστεί αποστείρωση με σκοπό να αποφευχθούν επιμολύνσεις της καλλιέργειας του υπό μελέτη μικροοργανισμού με άλλους ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς



# Αποστείρωση (2)

- **Αποστείρωση:** νοείται η πλήρης καταστροφή όλων των ζωντανών μικροοργανισμών (βλαστικών μορφών και σπορίων ή άλλων ανθεκτικών μορφών τους) και ιών που υπάρχουν σε ένα μέσα ή αντικείμενα ή υλικά ή χώρους από κάθε ζωντανό κύτταρο ή βιώσιμο σπόριο (ή άλλη ανθεκτική μορφή)
  - Αδρανοποίηση κατά τρόπο μη αντιστρεπτό όλων των οργανισμών
  - **Απολύμανση:** απαλλαγή **μόνο** από παθογόνους μικροοργανισμούς



# Αποστείρωση (3)

- Αποστείρωση **γυαλικών**: ξηρός κλίβανος στους  $180^{\circ}\text{C}$  για μία ώρα
- Αποστείρωση **θρεπτικών μέσων**: σε κλιβάνους ατμού ή αυτόκαυστα με συνδυασμό πίεσης ( $1 \text{ atm}$ ) και θερμοκρασίας ( $121^{\circ}\text{C}$ ) για 15-20 λεπτά

# Τρόποι αποστείρωσης (1)

- **Φυσικές μέθοδοι:** Θερμότητα, Υπέρθερμος ατμός, Υπεριώδεις ακτίνες, Ιονίζουσες ακτινοβολίες, Διήθηση, Υπέρηχοι
  - Η αποστειρωτική δράση της θερμότητας οφείλεται στη **μετουσίωση** των μικροβιακών πρωτεϊνών και νουκλεοξέων
  - Αποστείρωση με υπέρθερμο ατμό πραγματοποιείται εντός ειδικών συσκευών που ονομάζονται **αυτόκλειστα** ή **αυτόκαυστα** (π.χ. κοινή οικιακή χύτρα πίεσεως)
  - Διήθηση διαλυμάτων ουσιών ασταθών στη θερμότητα με τη χρήση ηθμού με διάμετρο πόρων 0,2  $\mu\text{m}$





# Τρόποι αποστείρωσης (2)

- **Χημικές μέθοδοι (αντιμικροβιακές ουσίες):** οξειδίο του αιθυλενίου, η φορμαλδεΰδη, η γλουταραλδεΰδη και η β-προπιολακτόνη
  - Δρουν σαν αλκυλιωτικός παράγοντας, αντιδρούν δηλαδή με νουκλεοφιλικές ομάδες και προκαλούν υποκατάσταση στις κυτταρικές πρωτεΐνες με υδροξυαιθυλικές ομάδες



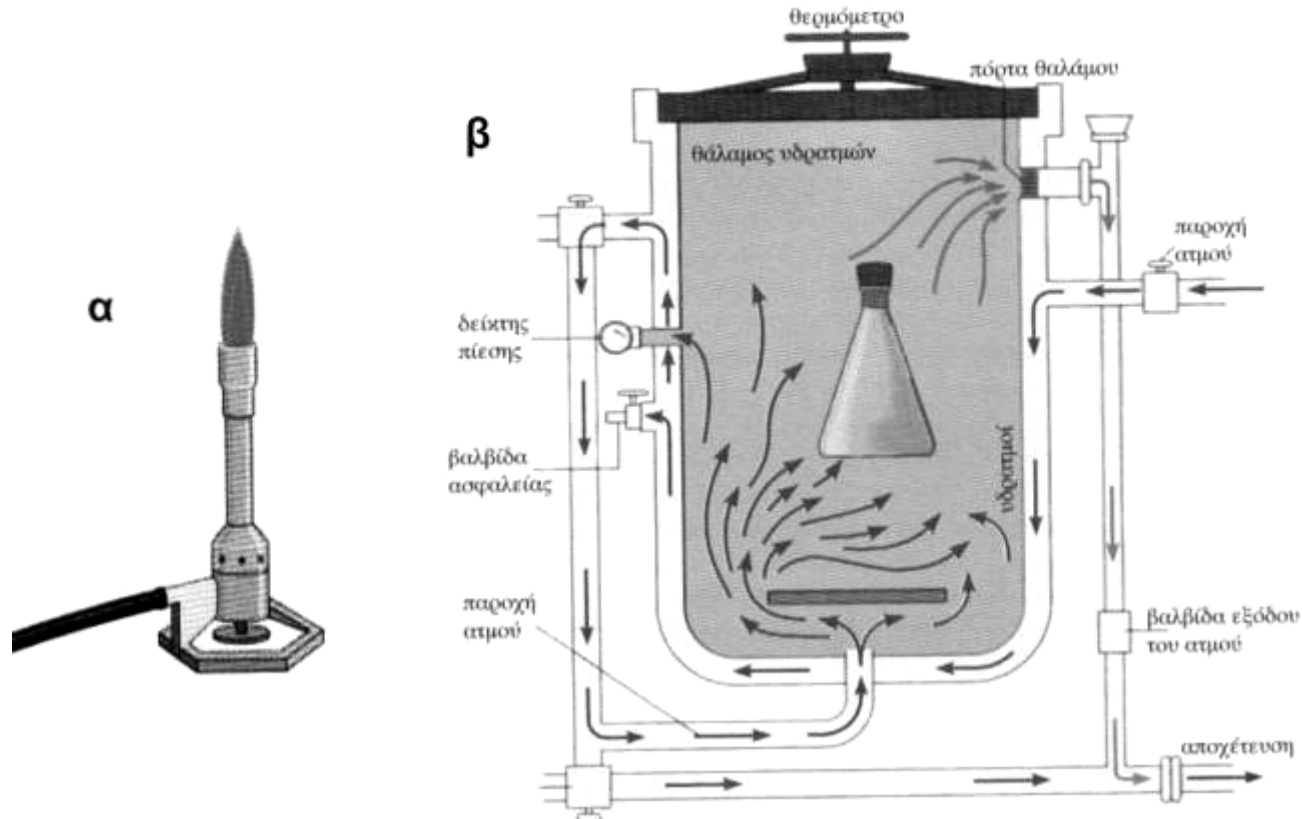
# Υγρή αποστείρωση (με θέρμανση)

- Εφαρμογή υπέρθερμων ατμών (**υγρή θερμότητα**) και θανάτωση των μικροοργανισμών, που οφείλεται στην κροκίδωση των πρωτεϊνών του κυττάρου
- Λαμβάνει χώρα μέσα σε ειδικές συσκευές (τα **αυτόκαυστα** (autoclave), οι οποίες λειτουργούν σε υψηλή πίεση **1.1 atm πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση** και η αποστείρωση επιτυγχάνεται με τη δράση υδρατμών θερμοκρασίας **121°C**
- Χρόνος εφαρμογής της υγρής αποστείρωσης εξαρτάται από τον όγκο και την ποσότητα των προς αποστείρωση υλικών; Για θρεπτικά υλικά συνήθως είναι **15-20 λεπτά**

# Αυτόκαυστο (autoclave) (1)

- Αποτελείται από ένα λέβητα, που κλείνει με ειδικούς κοχλίες (για να αντέξει την υψηλή πίεση που επικρατεί στο εσωτερικό του λέβητα) και στο εσωτερικό του υπάρχει χώρος στον οποίο προστίθεται νερό, το οποίο θα δημιουργήσει τους απαιτούμενους ατμούς
- Το νερό συνήθως καλύπτει ηλεκτρικές αντιστάσεις, που θερμαίνουν το νερό και οι υδρατμοί που παράγονται γεμίζουν το χώρο μέσα στο λέβητα
- Εναλλακτικά, ο ατμός μπορεί να παράγεται σε ένα χώρο εξωτερικά του χώρου αποστείρωσης και να μεταφέρεται σε αυτόν μέσω σωλήνα
- Ο υπέρθερμος αυτός ατμός προκαλεί τη θανάτωση των μικροοργανισμών και των σπορίων τους

# Αυτόκαυστο (autoclave) (2)



Σχηματική απεικόνιση του λύχνου Bunsen (α) και του αυτόκαυστου (β)



# Αυτόκαυστο (autoclave) (3)

- Επίτευξη  $121^{\circ}\text{C}$  (θανάτωση ακόμα και των πιο θερμοανθεκτικών σπορίων) με την εφαρμογή υψηλής πίεσης που εξασφαλίζεται από τη συσσώρευση των ίδιων των ατμών στο εσωτερικό του λέβητα
- Για να φτάσουν οι υδρατμοί τους  $121^{\circ}\text{C}$ , πρέπει η πίεση να φτάσει τη 1.1 atm πάνω από την ατμοσφαιρική
- Αυτή η πίεση μέσα στο αυτόκαυστο δεν είναι αρκετά υψηλή για να έχει μικροβιοκτόνο δράση; Απλά εφαρμόζεται προκειμένου να αυξηθεί η θερμοκρασία των ατμών
- Θερμοστάτης φροντίζει να σταματάει η λειτουργία των αντιστάσεων που θερμαίνουν το νερό, όταν η θερμοκρασία φτάσει το επιθυμητό όριο των  $121^{\circ}\text{C}$
- Αισθητήρας πίεσης εξακριβώνει κάθε στιγμή η πίεση εντός του λέβητα
- Χρονόμετρο για να ρυθμίζεται η διάρκεια αποστείρωσης



# Αυτόκαυστο (autoclave) (3)

- Σωστή αποστείρωση όλων των υλικών μέσα στο αυτόκαυστο επιτυγχάνεται με την πλήρη απομάκρυνση του αέρα που προϋπάρχει μέσα στο λέβητα και πλήρης αντικατάστασή του από τους υπέρθερμους υδρατμούς; Αυτό πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας βαλβίδας διαφυγής των ατμών, που βρίσκεται στο πίσω μέρος του λέβητα
- Όταν αποστειρώνονται υγρά υλικά σε περιέκτες (π.χ. σε σωλήνες, φιάλες κ.λπ.) δεν πρέπει αυτοί να είναι πολύ σφιχτά κλειστοί, ώστε να μπορέσουν οι υπέρθερμοι ατμοί να μπουν στο εσωτερικό του περιέκτη και να αποστειρώσουν το υλικό
- Εάν οι περιέκτες με το υγρό υλικό προς αποστείρωση είναι σφιχτά κλειστοί, οι υδρατμοί που θα παραχθούν από το ίδιο το υγρό υλικό (αφού και αυτό θα βράσει μέσα στο λέβητα) δεν θα έχουν τρόπο διαφυγής, η πίεση μέσα στον περιέκτη θα αυξηθεί και μπορεί αυτός να σπάσει ή να πετάξει απότομα το καπάκι του



# Βρασμός (με θέρμανση)

- Βρασμός στους **100°C** για 30 λεπτά (**υγρή θερμότητα**) σκοτώνει όλα τα μικροβιακά βλαστικά κύτταρα, όμως επιβιώνουν ορισμένα ενδοσπόρια
- Για πραγματική αποστείρωση και θανάτωση όλων των ενδοσπορίων απαιτείται παρατεταμένος ή διακοπτόμενος βρασμός: τρεις διαδοχικοί βρασμοί των 30 λεπτών μεταξύ των οποίων μεσολαβούν διαλείμματα ψύξης των 30 λεπτών.
- Γενικά ο βρασμός δε χρησιμοποιείται ως εργαστηριακή μέθοδος αποστείρωσης πλέον

# Ξηρή αποστείρωση

- Η θανατηφόρος δράση της οφείλεται σε αντιδράσεις οξείδωσης που προκαλούνται στα συστατικά του κυττάρου
- Επιτυγχάνεται με θερμό ξηρό αέρα (160°C για 2 ώρες ή 170°C για 1 ώρα), που κυκλοφορεί σε ειδικούς κλιβάνους ξηρής αποστείρωσης
- Συνήθως στους κλιβάνους αυτούς αποστειρώνονται αντικείμενα που αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες και σε απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας, όπως ο γυάλινος και ο μεταλλικός εξοπλισμός του εργαστηρίου





# Ξηρή αποστείρωση

- Η **φλόγα του λύχνου Bunsen** αποτελεί έναν άλλο τρόπο ξηρής αποστείρωσης και εφαρμόζεται για την αποστείρωση της βελόνας και του κρίκου εμβολιασμού
- Τα εργαλεία αυτά θεωρούνται αποστειρωμένα όταν πυρακτωθούν (πάρουν έντονο ερυθρό χρώμα) από την ξηρή θερμότητα που εκπέμπει η φλόγα



# Διήθηση

- Εφαρμόζεται για την αποστείρωση **θερμοευαίσθητων** υγρών υλικών που δεν αντέχουν στις υψηλές θερμοκρασίες, που αναπτύσσονται κατά την αποστείρωση με θερμότητα
- Για την αποστείρωση ενός διαλύματος βιταμίνης ή αντιβιοτικού, που πρόκειται να προστεθεί σε ένα θρεπτικό υλικό εφαρμόζεται η διήθηση
- Το προς αποστείρωση υγρό, με τη βοήθεια κενού, περνάει μέσα από έναν ηθμό με διάμετρο πόρων  $0.45 \mu\text{m}$  ή  $0.22 \mu\text{m}$ , οι οποίοι συγκρατούν τα μικροβιακά κύτταρα που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους
- Το υγρό που διέρχεται από τους πόρους είναι πλέον αποστειρωμένο και συλλέγεται σε ένα αποστειρωμένο περιέκτη (φιάλη ή σωλήνα)

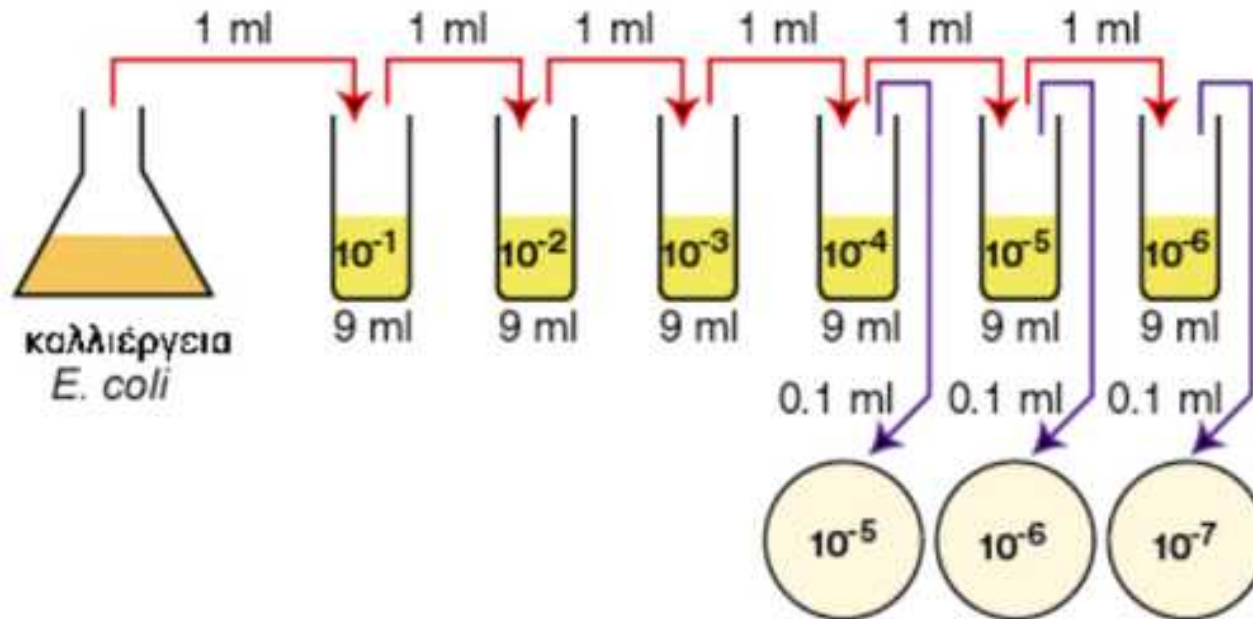


# Ακτινοβόληση

- Εφαρμογή ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας (υπεριώδης ακτινοβολία περίπου 260 nm, μη ιονίζουσα ακτινοβολία) με αντιμικροβιακή δράση, η οποία απορροφάται από διάφορα κυτταρικά συστατικά και κυρίως από το DNA, με αποτέλεσμα τη θανάτωση των μικροβιακών κυττάρων
- Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει το μειονέκτημα της μικρής διεισδυτικής ικανότητας και χρησιμοποιείται για την αποστείρωση του αέρα σε κλειστούς χώρους (π.χ. δωμάτια) και επιφανειών εργασίας
- Ιονίζουσες ακτινοβολίες (ακτίνες  $\gamma$  &  $\chi$ ), οι οποίες έχουν μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση συσκευασμένων εργαστηριακών υλικών, όπως σύριγγες, τρυβλία κ.λπ.



# Τρόποι επίτευξης καθαρής καλλιέργειας (1)



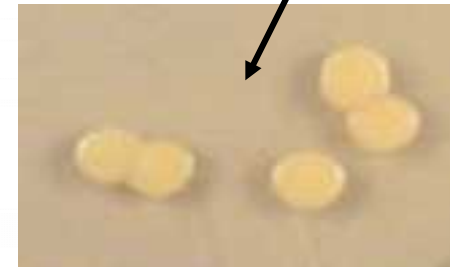
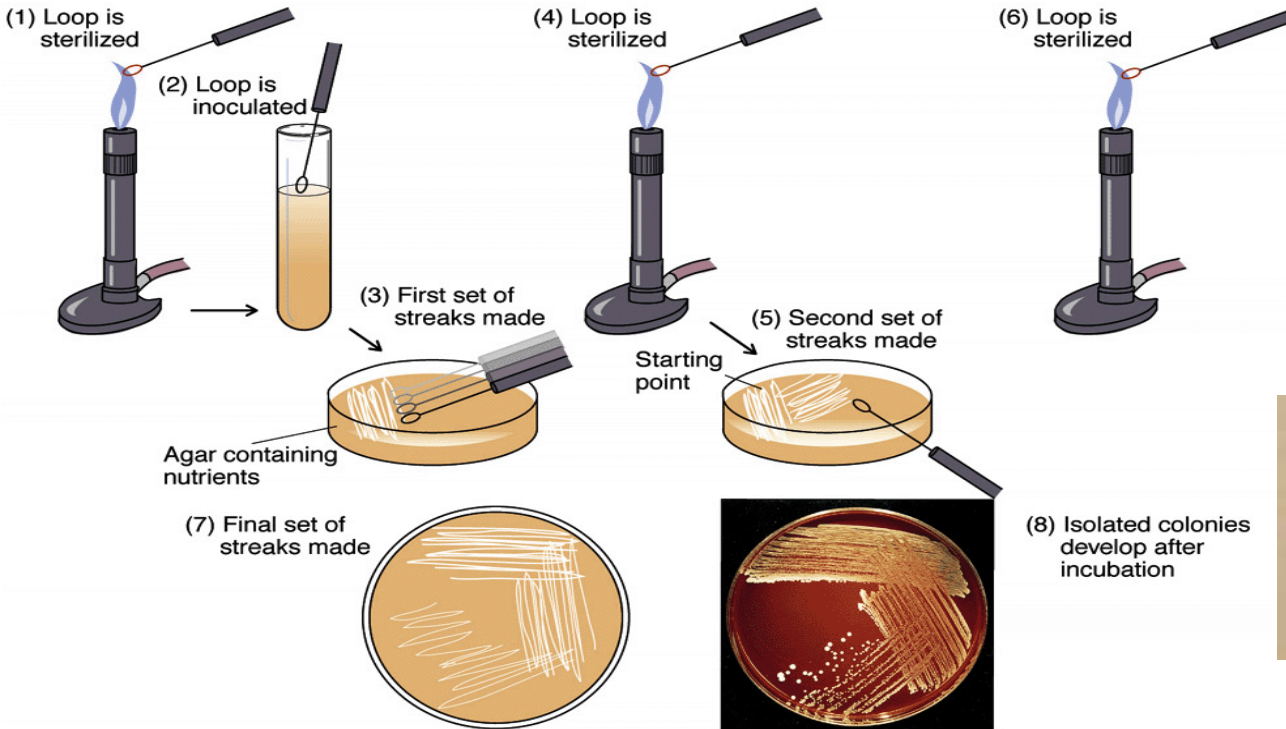
Μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων



# Τρόποι επίτευξης καθαρής καλλιέργειας (2)

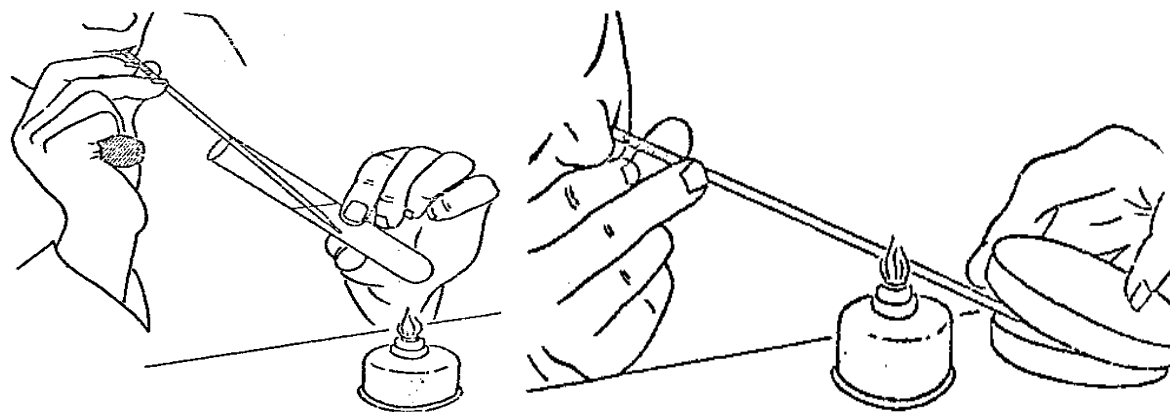
## Μέθοδος των παράλληλων γραμμών

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

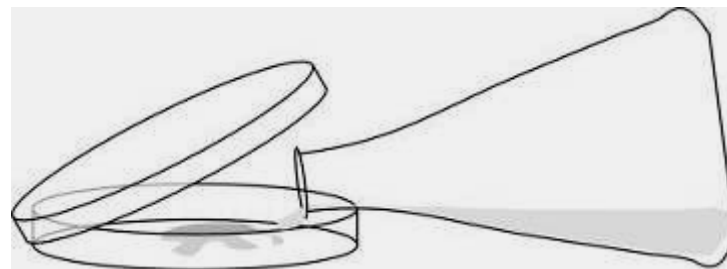
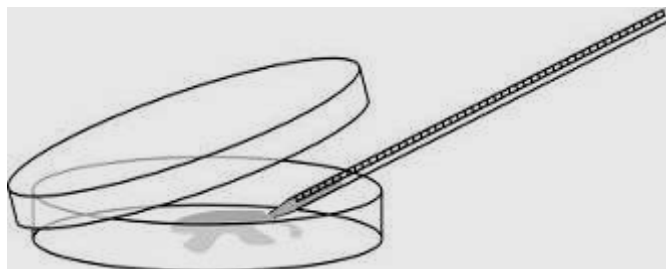


# Τρόποι επίτευξης καθαρής καλλιέργειας (3)

**Διασπορά μικροοργανισμού σε τρυβλίο Petri**



**Αραίωση εμβολίου & ενσωμάτωση με θρεπτικό υλικό σε τρυβλίο**

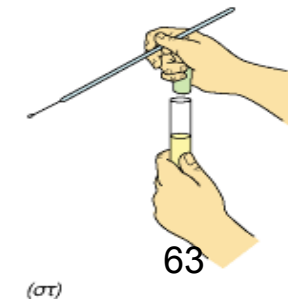
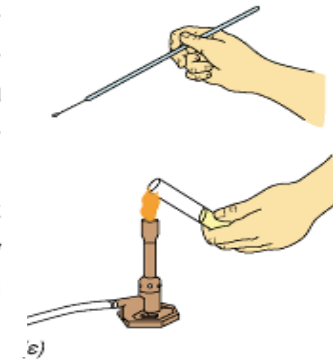
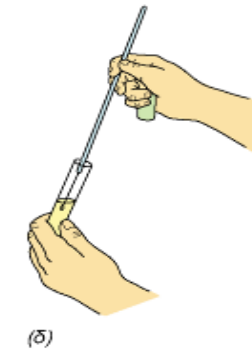
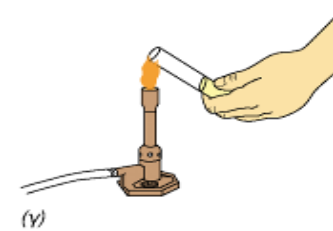
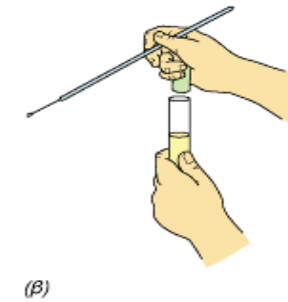
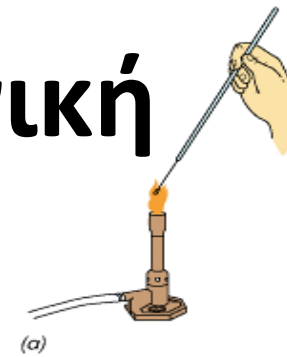




# Ασηπτική τεχνική

Είναι το σύνολο των χειρισμών που εφαρμόζονται προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση μιας μικροβιακής καλλιέργειας ή ενός μέσου με ξένους μικροοργανισμούς (π.χ. χρήση αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων και εργαλείων, ασηπτική μεταφορά ενοφθαλμίσματος, κ.ά.)

Ασηπτική μεταφορά. (α) Ο βρόχος ενοφθαλμισμού θερμαίνεται μέχρι να ερυθροπυρωθεί και ψύχεται για λίγο στον αέρα. (β) Αφαιρούμε το πώμα του δοκιμαστικού σωλήνα. (γ) Περνάμε το άκρο του σωλήνα μέσα από τη φλόγα. (δ) Το δείγμα μεταφέρεται στον αποστειρωμένο βρόχο ενοφθαλμισμού. (ε) Μετά τη λήψη του δείγματος με τον βρόχο ενοφθαλμισμού, περνάμε πάλι τον σωλήνα μέσα από τη φλόγα και μεταφέρουμε το δείγμα σε νέο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. (στ) Επανατοποθετούμε το πώμα στον σωλήνα. Ο βρόχος ενοφθαλμισμού πυρακτώνεται πάλι πριν την περάτωση της εργασίας.



# Αρχές διαγνωστικής (1)

## Διάγνωση στον αγρό (ΚΛΙΝΙΚΗ διάγνωση)

- **Παθογνωμονικό σύμπτωμα:** διάγνωση ασθένειας στον αγρό, χωρίς την αναγκαία ύπαρξη άλλων στοιχείων για την ασθένεια
- Σε αντίθετη περίπτωση, **Πληροφοριακό δελτίο, π.χ.:**
  - Περιγραφή συμπτωμάτων και σημείων
  - Εδαφοκλιματικές συνθήκες, άρδευση-λίπανση, γ. φάρμακα
  - Ιστορικό καλλιέργειας και γειτνιαζόμενες καλλιέργειες
  - Εντοπισμός παθογόνου αιτίου στο φυτό
  - Εμφάνιση ασθένειας στον αγρό (κηλίδες, γραμμές φύτευσης)





# Αρχές διαγνωστικής (2)

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ διάγνωση

- Αντιπροσωπευτικά δείγματα
- Ιστός προσβεβλημένος-υγιής
- Συμπτώματα-Σημεία ασθένειας
- Πληροφοριακό δελτίο
- Υγρός θάλαμος για την ανάπτυξη σημείων
- **Τελικός στόχος:** απομόνωση και καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού
- Αν **μη-παρασιτικής φύσεως ασθένεια**, π.χ. τροφοπενία:  
**χημική ανάλυση**



# Αρχές Koch

- Οι αναγκαίες αποδεικτικές αρχές της σχέσης ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού προς μία δεδομένη ασθένεια
  - Διαπίστωση παρουσίας του μικροοργανισμού σε κάθε περίπτωση της ασθένειας
  - Ο οργανισμός να απομονώνεται σε καθαρή καλλιέργεια
  - Να αναπαράγεται η τυπική μορφή της ασθένειας μετά από πειραματική μόλυνση υγιούς ξενιστή με τον μικροοργανισμό, που έχει απομονωθεί αρχικά σε καθαρή καλλιέργεια
  - Ο μικροοργανισμός να απομονώνεται ξανά σε καθαρή καλλιέργεια από τον πειραματικά μολυνθέντα ξενιστή



# Βιβλιογραφία

- Ανώνυμος, 2009. Εργαστηριακές σημειώσεις Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 45 σελ.
- Ζωάκη-Μαλισιόβα Δ., 1995. Εργαστήρια Φυτοπροστασίας Ι. Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου, 93 σελ.
- Ζωάκη-Μαλισιόβα Δ., 1998. Μαθήματα Φυτοπροστασίας Ι. Διδακτικές σημειώσεις, Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου, 121 σελ.
- Ηλιόπουλος Α.Γ., 2004. Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Έμβρυο, 296 σελ.
- Τζάμος Ε.Κ., 2007. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, 557 σελ.



# Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Τεχνολογικό Ίδρυμα Ηπείρου. Δρ Δήμητρα Ζωάκη  
Μαλισιόβα.

Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο. Βασικές μικροβιολογικές  
μέθοδοι.

Έκδοση: 1.0. Άρτα, 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:  
<<http://eclass.teiep.gr/courses/TEXG101/>>

# Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά Δημιουργού-Μη Εμπορική Χρήση-Όχι Παράγωγα Έργα 4.0 Διεθνές [1] ή μεταγενέστερη. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, Διαγράμματα κ.λπ., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.el>



# Τέλος Ενότητας

## Επεξεργασία: Δρ Αντωνόπουλος Δημήτριος

*Γεωπόνος-Φυτικής Παραγωγής ΓΠΑ*

*Γεωπόνος-Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας ΓΠΑ*

*ΕΠΠΑΙΚ ΑΣΠΑΙΤΕ*

*ΜΔΕ (MPhil) Φυτοπροστασίας ΓΠΑ*

*ΜΔΕ (MSc) Ασφάλειας Τροφίμων WUR*

*ΔΔ (PhD) Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ*

*Μετα-ΔΔ (Post-Doc) Φυτοπαθολογίας NCSU USA*

*Μετα-ΔΔ (Post-Doc) Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ-ΙΚΥ*

Άρτα, 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ  
2007-2013  
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

