**ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ Ι**

Α΄ΕΞΑΜΗΝΟΥ ΙΕΚ ΑΙΓΙΝΑΣ

ΒΟΗΘΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

(ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ)



Παραδόσεις του καθηγητή

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΗ ΝΤΟΤΣΙΚΑ ΙΩΑΝΝΑ

Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων

Μ.Δ.Ε. ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΠΑ

1. **ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ (ΓΕΝΙΚΑ)**
2. **Τι είναι θρεπτικά υλικά και ποια σκοπιμότητα εξυπηρετούν;**

Τα μικρόβια για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν έχουν ανάγκη από θρεπτικές ουσίες και κατάλληλη θερμοκρασία και ατμόσφαιρα.

Τα θρεπτικά υλικά είναι μίγματα διαφόρων ουσιών, τα οποία προσφέρουν τις ευνοϊκές συνθήκες για τη διατροφή και πολλαπλασιασμό των μικροβίων in vitro[[1]](#footnote-1). Μερικές από τις ουσίες αυτές είναι θρεπτικές για τα μικρόβια, ενώ άλλες είναι παράγοντες αύξησης ή προστατευτικές για την ανάπτυξή τους.

Από τη μεταβολική τους δραστηριότητα τα μικρόβια αλλοιώνουν το θρεπτικό υπόστρωμα και μεταβάλλουν την αρχική του όψη (θόλωση, παραγωγή αερίου, διάσπαση σακχάρων, μεταβολή pH). Έτσι παίρνουμε πολύτιμα στοιχεία για τις ιδιότητες γενικά των μικροβίων.

Σκοπιμότητα των θρεπτικών υλικών: Τα θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται στη μικροβιολογία για την ανάπτυξη και ανεύρεση των παθογόνων μικροβίων μέσα σε φυσιολογικά ή παθογόνα εκκρίματα του ανθρώπινου οργανισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σπορά των εκκριμάτων π.χ. ούρων, πύου, φαρυγγικού εκκρίματος κ.ά., στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά στα οποία γίνεται η ανάπτυξη των παθογόνων μικροβίων και επομένως η απομόνωση τους και η ταυτοποίησή τους.

**3. Ποιοι παράγοντες επηρεάζουν τη διαλυτότητα;**

Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη διαλυτότητα[[2]](#footnote-2) μιας ουσίας είναι η μεταβολή της πίεσης και της θερμοκρασίας.

**Β΄ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

1. **Ποια είναι τα θρεπτικά και ποια τα μη θρεπτικά συστατικά που περιέχει ένα θρεπτικό υπόστρωμα; Τι γνωρίζετε για καθένα από αυτά;**

Α. Θρεπτικά συστατικά: πεπτόνες-εκχυλίσματα κρέατος/μυκήτων- σάκχαρα-αίμα-χολή και ασκητικό υγρό.

Β. Μη θρεπτικά συστατικά: άγαρ-εκλεκτικές-αναγωγικές ουσίες-δείκτες.

**3. Ποια είναι τα υλικά για την Παρασκευή των θρεπτικών υλικών;**

Για τη παρασκευή θρεπτικών υλικών χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες οι παρακάτω βασικές ουσίες:

**ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

* 1. **Πεπτόνες**: είναι προϊόντα από διάφορες λευκωματούχες ουσίες ύστερα από ειδική κατεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα[[3]](#footnote-3). Παρασκευάζονται από ζωικούς ιστούς (κρέας, ψάρια, γάλα και σπλάχνα ζώων). Είναι διαλυτές στο νερό και δεν καταστρέφονται ούτε πήζουν με τη θέρμανση, δηλαδή δεν αλλοιώνονται κάτω από 100ο C. Υπάρχουν στο εμπόριο με τη μορφή σκόνης. Οι πιο συνηθισμένες εκτός από την κοινή πεπτόνη είναι η τρυπτόζη, πρωτεόζη και η τρυπτόνη.
  2. **Σάκχαρα:** Αποτελούν βασικό συστατικό πολλών θρεπτικών υλικών για την τροφή των μικροβίων. Στο εμπόριο υπάρχουν είτε ως διαλύματα[[4]](#footnote-4), μέσα σε φύσιγγες, είτε ως σκόνη. Εκείνα που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι η γλυκόζη, η λακτόζη, η ραφινόζη, η ξυλόζη, το άμυλο κ.α.
  3. **Εκχύλισμα κρέατος:** Από το κρέας εκχειλίζονται στο νερό διάφορες ουσίες, αζωτούχες και μη, όπως και διάφορα άλατα. Οι ουσίες αυτές είναι διαλυτές στο νερό και δεν πήζουν με τη θέρμανση. Στο εμπόριο υπάρχουν είτε ως σκόνη είτε ως πολτός.
  4. **Εκχύλισμα ζυμών (μυκήτων):** ανάλογο προϊόν που παράγεται από την υδρόλυση της ζυθοζύμης. Είναι πλούσια σε αμινοξέα[[5]](#footnote-5) και βιταμίνες.
  5. **Αίμα:** Προστίθεται στα θρεπτικά υλικά αφ' ενός γιατί περιέχει θρεπτικές ουσίες και ένζυμα που ευνοούν την ανάπτυξη ορισμένων απαιτητικών μικροβίων (αιμόφιλος), αφ' ετέρου διότι με τα λευκώματα και τα ένζυμα εξουδετερώνουν τα βλαπτικά για την πιο πέρα ανάπτυξη των μικροβίων προϊόντα της ανταλλαγής της ύλης τους. Χρησιμοποιείται αίμα προβάτου, κουνελιού, αλόγου αλλά και ανθρώπου (αίμα που δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετάγγιση, αρκεί να είναι στείρο μικροβίων). Προστίθεται στα θρεπτικά υλικά σε αναλογία 5-10%.
  6. **Χολή και ασκητικό υγρό:** Χρησιμοποιείται κυρίως η χολή βοδιού που λαμβάνεται όπως και το ασκητικό υγρό, ασήπτως.
  7. **Έκχυμα:** προϊόν που παίρνουμε μετά την έκχυση βρασμένου νερού στο κρέας ή σε ζωικούς ιστούς. Είναι διαλυτά στο νερό.

**ΜΗ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

Ιδιότητες άγαρ και ποιος ο ρόλος του στη Παρασκευή των θρεπτικών υλικών;

• **Άγαρ:** Είναι ουσία φυτική ουσία που λαμβάνεται από θαλάσσια φύκια. Δεν διασπάται από τα μικρόβια και δεν είναι τοξική για αυτά. Χρησιμοποιείται ως στερεωτικό των υγρών θρεπτικών ουσιών, γιατί πήζει σε θερμοκρασία κάτω από 40°C και διαλύεται στο νερό (λειώνει) στους 80°C. Υπάρχει σε μορφή σκόνης και αποτελείται από πολυσακχαρίδια και άλατα ασβεστίου που δεν προσφέρουν θρεπτικές ουσίες στα μικρόβια.

Ποιες είναι οι αναγωγικές ουσίες και γιατί τις χρησιμοποιούμε στα θρεπτικά υλικά;

* **Αναγωγικές ουσίες**: χρησιμοποιούνται στα θρεπτικά υλικά σαν βοηθητικό στοιχείο, για να δημιουργήσουν αναερόβιο περιβάλλον. Αυτές είναι: θειογλυκολικό Να, το ασκορβικό οξύ κ.ά.

Ποιες είναι οι εκλεκτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες στα θρεπτικά υλικά;

* **Εκλεκτικές ουσίες:** η προσθήκη αυτών των ουσιών αποτελεί τη βάση για τη παρασκευή των εκλεκτικών θρεπτικών υλικών. Τέτοιες είναι:

α) **Χρωστικές:** κρυσταλλικό ιώδες, στίλβον πράσινο, κ.ά.. Το κρυσταλλικό ιώδες παρεμποδίζει την ανάπτυξη των Gram θετικών βακτηρίων.

Β) **Άλατα:** Μέσα στα θρεπτικά υλικά προστίθενται άλατα που χρησιμεύουν στα μικρόβια ως συμπληρωματικές ουσίες και ρυθμίζουν την πυκνότητα των ιόντων υδρογόνου. Επίσης χρησιμεύουν σαν ανασταλτικές ουσίες στην ανάπτυξη ορισμένων μικροβίων.

γ) **Ιόντα υδρογόνου (PH):** συνήθως τα μικρόβια αναπτύσσονται σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον. Θρεπτικό υλικό με όξινο περιβάλλον PH(5,6) είναι το Sabourand για του μύκητες, ενώ με πολύ αλκαλικό περιβάλλον PH(8,0) για τα δοκάκια της χολέρας είναι το Monsur άγαρ ή TTGA.

δ) **Αντιβιοτικά:** προστίθενται σε πολλά εκλεκτικά υλικά. Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροβίων της φυσιολογικής χλωρίδας και επιτρέπουν την ανάπτυξη των μικροβίων που θέλουμε να μελετήσουμε.

Τι είναι οι δείκτες και ποιος ο ρόλος τους στα θρεπτικά υλικά;

* **Δείκτες:** είναι ουσίες που αλλάζουν το χρώμα όταν μεταβληθεί το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Με τους δείκτες μπορούμε να παρακολουθήσουμε τυχόν μεταβολές του pH στα θρεπτικά υλικά, π.χ. το ουδέτερο ερυθρό στο θρεπτικό υλικό Mac Konkey. Όταν το PH γίνει όξινο από τη διάσπαση της λακτόζης, οι αποικίες του μικροβίου παίρνουν κόκκινο χρώμα, ενώ αν δεν διασπαστεί η λακτόζη οι αποικίες του μικροβίου παραμένουν άχρωμες. Δείκτες που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι: το ερυθρό της φαινόλης, το ερυθρό του μεθυλενίου το ουδέτερο ερυθρό, κυανό της βρωμοθυμόλης κ.ά.

• Τέλος το νερό αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος ενός θρεπτικού υλικού.

**Γ. ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**4. Ανάλογα με την σύστασή τους σε τι διακρίνονται τα θρεπτικά υλικά;**

1. **Υγρά:** Τα θρεπτικά συστατικά είναι διαλυμένα σε αποσταγμένο νερό (DH2O) (π.χ θρεπτικός ζωμός)

2. **Στερεά:** Τα θρεπτικά συστατικά είναι διαλυμένα σε DH2O και περιέχουν άγαρ σε αναλογία 2%.

3. **Ημίρευστα:** Τα θρεπτικά συστατικά είναι διαλυμένα σε DH2O και περιέχουν άγαρ σε αναλογία 1%.

**5. Ποιοι παράγοντες επηρεάζουν τη διαλυτότητα;**

Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη διαλυτότητα μιας ουσίας είναι η μεταβολή της πίεσης και της θερμοκρασίας.

**6. Ανάλογα με τη σύνθεσή τους σε τι διακρίνονται τα θρεπτικά υλικά;**

Διάκριση θρεπτικών υλικών ανάλογα με τη σύνθεσή τους (ονομαστικά).

Τι είναι εμπλουτισμένα και τι εκλεκτικά υλικά;

**1. Κοινά ή συνηθισμένα**: Επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροβίων χωρίς αυξημένες μεταβολικές ανάγκες. Τέτοια υλικά είναι το θρεπτικό άγαρ, ο θρεπτικός ζωμός κ.α.

**2. Μη εκλεκτικά**: Δεν περιέχουν αναστολείς. Επιτρέπουν την ανάπτυξη των περισσοτέρων μικροοργανισμών (αιματούχο & σοκολατόχρωμο άγαρ)

**3. Εκλεκτικά:** Περιέχουν ουσίες που επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός είδους μικροβίων και αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η απομόνωση του πρώτου. Τέτοια υλικά είναι το Chapman (περιέχει αλάτι NaCl 5% εκλεκτικό υλικό για το σταφυλόκοκκο), το Lowenstein (<λεβενστάιν>, για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης), το Loeffler (<λέφλερ>, για το κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας) κ.α. Περιέχουν ανασταλτικές ουσίες. Επιτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηρίων εκλεκτικά (Mac Conkey άγαρ, KVLB άγαρ)

**4. Εμπλουτισμένα:** Περιέχουν ουσίες που καταστέλλουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων και προάγουν την ανάπτυξη άλλων (ζωμός σεληνίτη), περιέχουν ορό αίματος, εκχύλισμα μυκήτων, σάκχαρα, αίμα (αιματούχο άγαρ) κ.α.

**5. Διαφοροποιητικά:** Περιέχουν ουσίες που καταδεικνύουν ιδιότητες των βακτηρίων (Mac Conkey άγαρ, Chapman)**.** Επιτρέπουν την αναγνώριση μιας ιδιότητας με ορατή αλλαγή στο υλικό ή στο καλλιέργημα. Τέτοια υλικά είναι το **Mc Conkey άγαρ** το οποίο υπάρχει σε τρεις τύπους:

- Το McConkey No1 επιτρέπει την ανάπτυξη μερικών GRAM θετικών κόκκων όπως των σταφυλοκόκκων και των αιμολυτικών στρεπτοκόκκων των ομάδων B, C, G (όχι όμως και της ομάδας Α) και όλων των εντερικών στρεπτοκόκκων δηλ. του εντερόκοκκου.

- Το McConkey No2 επιτρέπει την ανάπτυξη του εντεροκόκκου και γενικά των ανθεκτικών στη χολή GRAM θετικών κόκκων.

- Το McConkey No3 αναστέλλει την ανάπτυξη όλων των GRAM θετικών κόκκων. Το υλικό αυτό περιέχει λακτόζη η οποία όταν διασπάται δίνει ένα κόκκινο χρώμα στις αποικίες.

**6. Συντήρησης:** Περιέχουν συστατικά για επιβίωση μικροβίων για μεγάλο χρονικό διάστημα (Stuart, Amies, Cary-Blair,Skim milk, Brucellabroth, Γλυκερόλη)

7.Ποιες προϋποθέσεις πρέπει να έχει ένα θρεπτικό υλικό για να θεωρείται κατάλληλο για χρήση;

1. Όταν περιέχει τις κατάλληλες θρεπτικές ή άλλες ουσίες σε ορισμένη αναλογία.

2. Όταν έχει την κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου (pH)[[6]](#footnote-6).

3. Όταν είναι στείρο μικροβίων.

8.Ποια θρεπτικά υλικά πρέπει να έχει οπωσδήποτε ένα εργαστήριο;

Ένα εργαστήριο πρέπει να έχει οπωσδήποτε τα κοινά θρεπτικά ή συνήθη θρεπτικά υλικά:

* Θρεπτικό ζωμό. Παρασκευάζεται από εκχύλισμα κρέατος μοσχαριού, πεπτόνη και χλωριούχο νάτριο, που διαλύονται σε απεσταγμένο νερό.
* Θρεπτικό άγαρ. Περιέχει τα ίδια συστατικά με το ζωμό και άγαρ σε αναλογία 1,5-2 gr%
* Πεπτονούχο ύδωρ. Περιέχει πεπτόνη και χλωριούχο νάτριο σε απεσταγμένο νερό. Οι πεπτόνες είναι προϊόντα υδρολύσεως πρωτεϊνών και τις παίρνουμε κυρίως από το κρέας, τα ψάρια, το γάλα και εκχυλίσματα ζυμομυκήτων.
* Αιματούχο άγαρ: αναπτύσσονται όλα τα αερόβια μικρόβια.

**Δ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**9. Ποια είναι τα στάδια παρασκευής θρεπτικών υλικών:**

Η παρασκευή ενός θρεπτικού υλικού είναι η αρχή της σωστής, γενικότερα, λειτουργίας ενός Μικροβιολογικού εργαστηρίου. Πρέπει να γίνεται προσεκτικά και με τη σωστή ενδεικνυόμενη σειρά. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται ο έλεγχος του pH καθώς και ο έλεγχος της στειρότητας καθώς αυτά είναι στάδια εκτίμησης και αξιολόγησης της εργασίας μας. Τα στάδια παρασκευής ενός θρεπτικού υλικού είναι συνοπτικά τα εξής:

|  |
| --- |
| 1. .Συγκέντρωση και ζύγιση των υλικών.  2. .Διάλυση των συστατικών  3. .Διαύγαση ή διήθηση  4. .Έλεγχος του pH  5. .Αποστείρωση  6. .Διανομή  7. .Έλεγχος της στειρότητας  8. .Διατήρηση και φύλαξη |

10.Στάδια παρασκευής θρεπτικού υλικού: ποια είναι η σκοπιμότητα- διατήρηση και χρήση αυτών;

Όποια και να είναι τα μέτρα που παίρνουμε κατά την παρασκευή, την αποστείρωση και τη διανομή ενός θρεπτικού υλικού, μπορεί στο τέλος να είναι μολυσμένο. Γι' αυτό πρέπει να γίνει ***έλεγχος της στειρότητας*** του υλικού με επώαση στους 37°C για 24 ή 48 ώρες οπότε αν υπάρχουν μικρόβια ή σπόροι θα αναπτυχθούν (αποικίες στα στερεά θρεπτικά υλικά, θόλωση, ίζημα ή υμένιο στα υγρά). Ο έλεγχος στειρότητας είναι πιο απαραίτητος για τα θρεπτικά υλικά που αποστειρώθηκαν με διήθηση ή τυνταλισμό. Η ***διατήρηση των θρεπτικών υλικών*** γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Στα υγρά θρεπτικά υλικά η εξάτμιση του νερού προκαλεί αύξηση της πυκνότητας των συστατικών τους και μπορεί έτσι να ανασταλεί η ανάπτυξη των μικροβίων. Η αποξήρανση των υλικών που περιέχουν άγαρ τα καθιστά γρήγορα ακατάλληλα, γιατί μειώνεται η ποσότητα του ελεύθερου νερού που είναι απαραίτητο για τη ζωή των μικροβίων. Τα υλικά διατηρούνται περισσότερο αν δεν τα έχουμε μοιράσει (στις φιάλες). Όλα τα θρεπτικά υλικά διατηρούνται στο ψυγείο στους 4°C περίπου μέχρι την ημέρα που θα χρησιμοποιηθούν. Σημειώνεται ότι ο μέγιστος χρόνος διαφύλαξης δεν ξεπερνά την μία εβδομάδα.Τα τρυβλία τοποθετούνται στο ψυγείο ανάποδα (το υλικό προς τα πάνω) για να κρατούν περισσότερο τους υδρατμούς.

Τα ***θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται*** δια την ανάπτυξη και ανεύρεση μικροβίων μέσα στα εκκρίματα του ανθρώπινου οργανισμού με σκοπό την απομόνωση και την ταυτοποίηση του παθογόνου μικροβίου που είναι υπεύθυνο για την πρόκληση φλεγμονής ή λοίμωξης σε κάποιο σημείο του σώματος του ανθρώπου.

11. Τι καλείται αποστείρωση θρεπτικών υλικών και ποιους τρόπους αποστείρωσης αυτών γνωρίζετε;

Αποστείρωση καλείται η καταστροφή ή η απομάκρυνση των παθογόνων των μη παθογόνων μικροβίων και των σπόρων με φυσικά, χημικά ή μηχανικά μέσα.

Φυσικά μέσα είναι η θερμότητα και η υπεριώδης ακτινοβολία, χημικά είναι η φορμαλδεΰδη και το οξείδιο του αιθυλενίου και μηχανικά μέσα είναι οι υπέρηχοι και η διήθηση μέσα σε πορώδη τοιχώματα ή διηθητικές μεμβράνες.

12. Τι είναι ρυθμιστικά διαλύματα και πως παρασκευάζονται;

Ρυθμιστικά ή buffers είναι τα διαλύματα που διατηρούν το pH τους είναι σταθερό, ανεξάρτητα από το είδος των χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν μέσα τους. Αυτά είναι διαλύματα ασθενών οξέων ή βάσεων με κάποιο άλας.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονται με τον εξής τρόπο:

* Παρασκευάζεται 1 λίτρο διαλύματος βασικού οξέος (διάλυμα Α)
* Παρασκευάζεται 1 λίτρο διαλύματος όξινου άλατος (διάλυμα Β)
* Ανακατεύουμε διαφορετικές κάθε φορά ποσότητες των διαλυμάτων Α και Β.
* Παίρνουμε πολλά ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικό pH.

**Ε..ΚΟΙΝΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ (ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ, ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ, ΧΡΗΣΗ);**

**13.Ποια είναι τα Κοινά ή συνηθισμένα θρεπτικά υλικά και ποια η χρήση τους;**

Για να μπορέσουμε να καλλιεργήσουμε του μικροοργανισμούς ώστε αυτοί να αναπτυχθούν και να καλλιεργηθούν, θα πρέπει να τους παρέχουμε τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά και τις κατάλληλες συνθήκες διαβίωσης.

Τέτοια υλικά είναι το θρεπτικό άγαρ, ο θρεπτικός ζωμός κ.ά. Επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροβίων χωρίς αυξημένες μεταβολικές ανάγκες. **Το θρεπτικό άγαρ** είναι από τα πιο κοινά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο για τις πρωτοκαλλιέργειες.

Άλλα κοινά θρεπτικά υλικά είναι:

• Ο **πεπτικός ζωμός του Filde**. Διαφέρει από το κοινό ζωμό στο ότι αντί για εκχύλισμα κρέατος περιέχει προϊόν ενζυματικής πέψης ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου με τρυψίνη και HCl (υδροχλωρικό οξύ).

• Ο **πεπτικός ζωμός του Hartley**. Διαφέρει από τον κοινό ζωμό στο ότι αντί του εκχυλίσματος κρέατος περιέχει προϊόν ενζυματικής, με παγκρεατικό υγρό, πέψης καρδιάς βοδιού ή κρέατος.

• Άλλοι ζωμοί όπως ο πεπτικός ζωμός Todd-Hewitt, πεπτικός ζωμός κρέατος ίππου κ.α

|  |
| --- |
| ΑΣΚΗΣΗ 1: Συγκέντρωση και διάλυση ουσιών για την Παρασκευή θρεπτικού ζωμού |

Βασικές γνώσεις : Ο θρεπτικός ζωμός ανήκει στα κοινά θρεπτικά υλικά και περιέχει υδατικό εκχύλισμα κρέατος, πεπτόνη και χλωριούχο νάτριο (NaCl) Παλαιότερα το εκχύλισμα κρέατος παρασκευαζόταν στο εργαστήριο από γραμμωτές μυϊκές ίνες ή από καρδιά βοδιού. Σήμερα υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο και είναι προτιμότερο γιατί και καλύτερο είναι και φθηνότερο και πιο εύχρηστο.

 3 gr Ο βασικός ζωμός παρασκευάζεται ως εξής:

- Εκχύλισμα κρέατος (beef extract)

- Πεπτόνη .....................................10 gr

- NaCl........................................... 5 gr

- DH2O............................... έως 1000 ml

Ελέγχεται και ρυθμίζεται το pH στο 7.4, μοιράζεται σε φιάλες ή σωληνάρια και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο (121°C για 15')

Στο εμπόριο υπάρχει έτοιμος ζωμός με τη μορφή αποξηραμένης και υγροσκοπικής σκόνης. Ο ζωμός αυτός παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στη φιάλη.

 

Εικόνα1. Λυχνία Bunsen. Εικόνα2. Φιάλη Erlenmayer.

Απαιτούμενα υλικά

1. Λυοφιλοποιημένος έτοιμος ζωμός από το εμπόριο (Nutrient Broth)

2. Αποσταγμένο νερό (DH2O)

3. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας

4. Κωνική φιάλη Erlenmayer

5. Λυχνία Bunsen

Πορεία

1. Ζυγίζουμε τόση σκόνη όσο χρειάζεται για να παρασκευάσουμε 250 ml θρεπτικό ζωμό. Η σκόνη αυτή είναι εξαιρετικά υγροσκοπική - δεν πρέπει να αφήνουμε το κουτί ανοιχτό για πολλή ώρα. Ο υπολογισμός της ποσότητας που θα ζυγίσουμε γίνεται βάσει των οδηγιών που έχει πάνω η φιάλη. Πάνω στη φιάλη αναγράφονται επίσης η σύνθεση και το pH που πρέπει να έχει το τελικό διάλυμα.

2. Αδειάζουμε το υλικό που ζυγίσαμε μέσα στην κωνική φιάλη.

3. Προσθέτουμε στην κωνική φιάλη 250 ml DH2O. Το πιο συνηθισμένο μέσο διάλυσης είναι το DH2O εκτός αν υπάρχουν διαφορετικές οδηγίες. Το DH2O θα πρέπει να προέρχεται από γυάλινη συσκευή και όχι από μεταλλική για να μην περιέχει ίχνη μετάλλων (χαλκός, σίδηρος κλπ) τα οποία έχουν βακτηριοστατικές ή βακτηριοκτόνους ιδιότητες.

4. Θερμαίνουμε ενώ παράλληλα αναδεύουμε (ανακατεύουμε) με τη βοήθεια ενός γυάλινου ραβδιού ή πιπέτας, το διάλυμα στη λυχνία Bunsen. Αυτό βοηθά στη γρηγορότερη και καλύτερη διάλυση της σκόνης (ιδίως όταν είναι πολύ αφυδατωμένη). Η θέρμανση πρέπει να περιορίζεται στην απολύτως αναγκαία γιατί η παρατεταμένη έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα, την πηκτικότητα και το χρώμα του θρεπτικού υλικού.

|  |
| --- |
| Άσκηση 2. Διαύγαση και διόρθωση pH θρεπτικού άγαρ |

Βασικές γνώσεις: Επιδιώκουμε πάντα την παρασκευή διαυγών θρεπτικών υλικών, τα οποία επιτρέπουν τη μελέτη των χαρακτήρων των καλλιεργημάτων των μικροβίων. Αυτό επιτυγχάνεται στα μεν αφυδατωμένα θρεπτικά υλικά του εμπορίου με απλή διήθηση από διηθητικό ηθμό, στα δε περιέχοντα ζωμό εκχυλίσεως, με θέρμανση στους 120°C για 20 λεπτά, οπότε καθιζάνουν τα άλατα που προκαλούν θόλωση.

Η διόρθωση του pH των θρεπτικών υλικών πριν από την αποστείρωση, είναι απαραίτητη γιατί τα περισσότερα από τα παθογόνα για τον άνθρωπο μικρόβια αναπτύσσονται σε ορισμένη τιμή του pH (7 - 7,2 - 7,6) και επί πλέον, με τη διόρθωση του pH αποφεύγεται η υδρόλυση των συστατικών, ιδιαίτερα του άγαρ, και η καθίζηση των αλάτων κατά την αποστείρωση. Υπάρχουν βέβαια και άλλα μικρόβια που απαιτούν άλλες τιμές του pH όπως π.χ οι γαλακτοβάκιλλοι, το δονάκιο της χολέρας κ.α.

Η τιμή του pH ποικίλλει ανάλογα της θερμοκρασίας και μετρείται πάντα όταν το υλικό έχει θερμοκρασία κάτω των 50\_°C.Το pH των θρεπτικών υλικών παρουσιάζει πτώση κατά την αποστείρωση με το αυτόκαυστο, η οποία μάλιστα πολλές φορές είναι σημαντική, γι'αυτό πρέπει κατά τη διόρθωση να λαμβάνεται πρόνοια, έτσι ώστε το τελικό προϊόν μετά την αποστείρωση νε έχει το επιθυμητό pH. Η διόρθωση του pH των θρεπτικών υλικών γίνεται μετά την παρασκευή τους και πριν από την τελική αποστείρωση, χρησιμοποιώντας κανονικά (Ν) ή δεκατοκανονικά (Ν/10) διαλύματα οξέων (HCl) ή βάσεων (NaOH).

Το θρεπτικό άγαρ είναι βασικά ένας θρεπτικός ζωμός με στερεωτικό άγαρ (βλέπε σελ. 3). To pH ρυθμίζεται στο 7.6. Το θρεπτικό άγαρ λειώνει στους 92°C και πήζει στους 42°C. Υπάρχει και αυτό έτοιμο στο εμπόριο με τη μορφή αφυδατωμένης σκόνης αν και μπορούμε να το παρασκευάσουμε εύκολα από θρεπτικό ζωμό, αν προσθέσουμε σ'αυτόν 2% (12-15 gr στα 1000 ml) άγαρ[[7]](#footnote-7) .

**Το θρεπτικό άγαρ** είναι από τα πιο κοινά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο για τις πρωτοκαλλιέργειες.

Απαιτούμενα υλικά

1. 250 ml θρεπτικού ζωμού, όπως τα παρασκευάσαμε στην προηγούμενη πράξη.

2. Άγαρ

3. Διηθητικό χαρτί

4. Γυάλινο χωνί

5. Ηλεκτρονικό pH-μετρο ή ταινία εμποτισμένη με δείκτη ηλιοτροπίου.

6. Διάλυμα HCl N/10

7. Διάλυμα NaOH N/10 8. Πιπέτα Pasteur

Πορεία

1. Παρασκευάζουμε 250 ml θρεπτικού ζωμού.

2. Ζυγίζουμε και διαλύουμε μέσα στο ζωμό 3 gr στερεωτικού άγαρ.

3. Εάν το υλικό που παρασκευάσαμε είναι θολό ή έχει διάφορα αδιάλυτα σωματίδια, διηθούμε προσεκτικά μέσα από το διηθητικό χαρτί, με τη βοήθεια του γυάλινου χωνιού μεταγγίζοντας το υλικό σε μια άλλη κωνική φιάλη.

4. Με το pH-μετρο μετράμε το pH και ελέγχουμε αν είναι μέσα στα επιθυμητά όρια.

5. Εαν είναι περισσότερο όξινο από ότι πρέπει (pH < 7.6) προσθέτουμε με την πιπέτα Pasteur μια-μια σταγόνες από το διάλυμα της βάσης (NaOH).

6. Εαν είναι περισσότερο βασικό από ότι πρέπει (pH > 7.6) προσθέτουμε με την πιπέτα Pasteur μια-μια σταγόνες από το διάλυμα της οξέος (HCl).

7. Μόλις ρυθμιστεί το pH το θρεπτικό υλικό είναι έτοιμο για την αποστείρωση.

|  |
| --- |
| Άσκηση 3. Αποστείρωση θρεπτικού άγαρ |

Βασικές γνώσεις: Η αποστείρωση των θρεπτικών υλικών γίνεται κατά κανόνα στο αυτόκαυστο, σύμφωνα με τις οδηγίες που υπάρχουν για κάθε υλικό. Για τα περισσότερα υλικά η αποστείρωση γίνεται στους 121°C για 15 λεπτά, ενώ γι' αυτά που περιέχουν σάκχαρα, τα οποία είναι ευαίσθητα στις ψηλές θερμοκρασίες, γίνεται στους 110 °C ή στους 100 °C ή με τη μέθοδο του τυνταλλισμού (100 °C για 30-60' επί τρεις συνεχείς μέρες). Επίσης η αποστείρωση μπορεί να γίνει και με άλλους τρόπους όπως π.χ με διήθηση σε ειδικές συσκευές και με ειδικά φίλτρα. Κατά την αποστείρωση πρέπει να τηρούνται οι κανόνες απο-στείρωσης που ισχύουν σε κάθε περίπτωση.

Απαραίτητα υλικά

1. 250 ml θρεπτικού άγαρ, διαυγασμένο και με σωστό pH.

2. Ανυδρόφιλο βαμβάκι

3. Σπάγκος

4. Λαδόχαρτο

5. Υαλογράφος

6. Αυτόκαυστο

7. Ταινία έλεγχου αποστείρωσης (προαιρετικά)

Πορεία

1. Πωματίζουμε την κωνική φιάλη με ανυδρόφιλο βαμβάκι

2. Σκεπάζουμε το πώμα της κωνικής φιάλης με ένα κομμάτι λαδόχαρτο έτσι ώστε να περισσεύει αρκετά.

3. Δένουμε γύρω-γύρω από το στόμιο το λαδόχαρτο με ένα κομμάτι σπάγγο ή με την ειδική ταινία ελέγχου της αποστείρωσης. Η διαδικασία αυτή γίνεται για να μην εκτιναχθεί το υλικό κατά την αποστείρωση και για να μη μολύνεται κατά τη φύλαξη.

4. Σημειώνουμε με τον υαλογράφο το όνομα του υλικού που έχουμε φτιάξει ή τα αρχικά του (π.χ MC(McConkey), Ba (Blood agar-αιματούχο) κλπ).

5. Τοποθετούμε στο αυτόκαυστο και αποστειρώνουμε στους 121°C για 15 λεπτά.

6. <προαιρετικά> Ελέγχουμε το αν πέτυχε η αποστείρωση με την ειδική ταινία. Η ταινία αυτή έχει κάποιες άσπρες ρίγες (από ειδική ουσία), που όταν η αποστείρωση γίνει κανονικά, γίνονται μαύρες.

|  |
| --- |
| Άσκηση 4. Διανομή θρεπτικού άγαρ σε τρυβλία |

Βασικές γνώσεις: Μετά τη αποστείρωση και για να μπορέσουμε να χρησιμοποιήσουμε το θρεπτικό υλικό πρέπει να το μοιράσουμε σε μικρότερες ποσότητες. Διακρίνουμε δύο περιπτώσεις: α) το θρεπτικό υλικό να είναι στερεό και β) το θρεπτικό υλικό να είναι υγρό.

Η διανομή του υλικού σε τρυβλίο μας δίνει μεγάλη επιφάνεια για τον εμβολιασμό και την ανάπτυξη των μικροβίων. Μας δίνει επίσης τη δυνατότητα να παρατηρούμε καλύτερα τους φυσικούς χαρακτήρες των μικροβίων (χρώμα, μέγεθος, μορφή αποικιών κλπ), να μελετούμε τη σχέση με την οποία τα μικρόβια βρίσκονται στο παθολογικό υλικό και να αριθμούμε τις αποικίες. Με τη διασπορά τέλος των μικροβίων σε μεγάλη επιφάνεια, μπορούμε να τα απομονώσουμε.

Απαιτούμενα υλικά

1. 250 ml θρεπτικού άγαρ (αποστειρωμένο)

2. Τρυβλία Petri (περίπου 13-15). Τα τρυβλία μπορεί να είναι είτε γυάλινα είτε πλαστικά μιας χρήσης. Αν είναι γυάλινα θα πρέπει να είναι πολύ καλά πλυμένα και αποστειρωμένα.

3 Λυχνία Bunsen

Πορεία

1. Αν το αποστειρωμένο μας υλικό έχει πήξει (έχει παγώσει) το τοποθετούμε πάνω στη φλόγα (όπου υπάρχει πλέγμα αμιάντου) και το ζεσταίνουμε μέχρι να λειώσει καλά. ΠΡΟΣΟΧΗ! Δεν πρέπει να αφήνουμε το υλικό να βράσει πολύ γιατί μπορεί να φουσκώσει και να χυθεί.

2. Αφήνουμε το υλικό να παγώσει λίγο (40-45°C), για να μπορούμε να το μοιράσουμε χωρίς να καιγόμαστε και κυρίως για να μη μαζευτούν πολλοί υδρατμοί στο κάλυμμα του τρυβλίου που μπορεί να μας δημιουργήσουν προβλήματα κατά την καλλιέργεια.

3. Απλώνουμε τα τρυβλία γύρω από την λυχνία Bunsen. Η διαδικασία της διανομής γίνεται απαραίτητα κοντά στη φλόγα όπου υπάρχουν συνθήκες σχετικής αντισηψίας (για να μη μολυνθεί το υλικό).

4. Καίμε το στόμιο της κωνικής φιάλης στη φλόγα (για πολύ λίγο).

5. Μοιράζουμε το υλικό στα τρυβλία ανασηκώνοντας λίγο το κάλυμμα κάθε τρυβλίου με το άλλο χέρι. Η ποσότητα του υλικού που βάζουμε σε κάθε τρυβλίο είναι περίπου 15 ml όση δηλ. χρειάζεται για να καλυφθεί ο πυθμένας του τρυβλίου και λίγο παραπάνω.

6. Περνάμε τη φλόγα από την επιφάνεια του υλικού κάθε τρυβλίου για να σπάσουν οι φυσαλίδες και να γίνει λείο και ομοιόμορφο.

7. Σημειώνουμε με τον υαλογράφο σε μια άκρη του καλύμματος τα αρχικά του υλικού που περιέχει.

8. Αφήνουμε να παγώσουν χωρίς να τα κουνάμε για να πήξουν. Όταν βεβαιωθούμε ότι έπηξαν τα στοιβάζουμε το ένα πάνω στο άλλο ανάποδα.

|  |
| --- |
| Άσκηση 5. Διανομή θρεπτικού άγαρ σε σωληνάρια |

Βασικές γνώσεις

Η διανομή ενός στερεού θρεπτικού υλικού σε σωληνάρια είναι απαραίτητη όταν θέλουμε να μελετήσουμε τις βιοχημικές ιδιότητες κάποιου μικροβίου (διάσπαση σακχάρων, υδρόλυση πρωτεϊνών, παραγωγή υδρόθειου κλπ), όταν θέλουμε να μελετήσουμε την κίνησή του, όταν θέλουμε να δημιουργήσουμε σχετικά αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες για την ανάπτυξή του, ή όταν θέλουμε να διατηρήσουμε κάποιο μικροβιακό στέλεχος κλπ.

Απαιτούμενα υλικά

1. 100 ml θρεπτικό άγαρ, αποστειρωμένο.

2. Δοκιμαστικοί σωλήνες (περίπου 20). Χρησιμοποιούμε πάντα δοκιμαστικούς σωλήνες χημικά πολύ

καθαρούς, πωματισμένους με ανυδρόφιλο βαμβάκι και αποστειρωμένους.

3. Στατώ στήριξης σωληναρίων.

4. Λυχνία Bunsen

Πορεία

1. Λειώνουμε το θρεπτικό υλικό (αν είναι παγωμένο) και το αφήνουμε να παγώσει λίγο όπως και με τα τρυβλία.

2. Τοποθετούμε τους σωλήνες στο στατώ δίπλα από τη φλόγα της λυχνίας Bunsen.

3. Βγάζουμε το πώμα της φιάλης και καίμε το στόμιο της στη φλόγα.

4. Με τα τρία δάκτυλα του δεξιού χεριού κρατάμε τη φιάλη λίγο κάτω από το στόμιο και με το αριστερό χέρι το σωλήνα (αντίθετα για τους αριστερόχειρες)

5. Με τα δύο ελεύθερα δάκτυλα του δεξιού χεριού βγάζουμε και κρατάμε το πώμα του σωλήνα (ΠΡΟΣΟΧΗ! να μην ακουμπήσει πουθενά το πώμα και μολυνθεί)

6. Καίμε το στόμιο της φιάλης

7. Καίμε το στόμιο του σωλήνα

8. Ρίχνουμε μέσα στο σωλήνα περίπου 5 ml υλικού.

9. Καίμε πάλι το στόμιο του σωλήνα και πωματίζουμε.

10. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία μέχρι να τελειώσει το υλικό μας.

11. Αφήνουμε τα σωληνάρια για να πήξει το υλικό. Εάν αφήσουμε τα σωληνάρια σε κεκλιμένη θέση η επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μετά την πήξη είναι κεκλιμένη, ενώ αφήνοντας τα σωληνάρια σε κατακόρυφη θέση σε ένα στατώ παίρνουμε το υλικό σε στήλη.

|  |
| --- |
| Άσκηση 6. Διανομή θρεπτικού ζωμού σε σωληνάρια |

Βασικές γνώσεις : Η διανομή του υγρού θρεπτικού υλικού γίνεται πάντα σε σωληνάρια. Η διαδικασία είναι ίδια μ' αυτήν του στερεού σε σωληνάρια μόνο που εδώ τα σωληνάρια τοποθετούνται μόνο σε κατακόρυφη θέση, η ποσότητα του υλικού μπορεί να ποικίλει και τα σωληνάρια μπορεί να είναι και μικρά.

Με τον εμβολιασμό ενός παθολογικού υλικού σε υγρό θρεπτικό υλικό σε σωληνάριο, μπορούμε να επιτύχουμε εύκολη ανάπτυξη των δύσκολων μικροβίων, να μελετήσουμε τις αναπνευστικές τους ιδιότητες, να αραιώσουμε ένα μικροβιακό πληθυσμό για το τεστ ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, να φυλάξουμε κάποιο στέλεχος για λίγο κλπ.

Απαιτούμενα υλικά

Τα ίδια με τη "Διανομή θρεπτικού άγαρ σε σωληνάριο"

Πορεία

Τα ίδια με τη "Διανομή θρεπτικού άγαρ σε σωληνάριο"

|  |
| --- |
| Άσκηση 7. Έλεγχος στειρότητας και συντήρηση θρεπτικών υλικών |

Βασικές γνώσεις : Όποια και να είναι τα μέτρα που παίρνουμε κατά την παρασκευή, την αποστείρωση και τη διανομή ενός θρεπτικού υλικού, μπορεί στο τέλος να είναι μολυσμένο. Γι' αυτό πρέπει να γίνει έλεγχος της στειρότητας του υλικού με επώαση στους 37°C για 24 ή 48 ώρες οπότε αν υπάρχουν μικρόβια ή σπόροι θα αναπτυχθούν (αποικίες στα στερεά θρεπτικά υλικά, θόλωση, ίζημα ή υμένιο στα υγρά). Ο 10 Ασκήσεις Βιολογικού Εργαστηρίου - Μικροβιολογικό έλεγχος στειρότητας είναι πιο απαραίτητος για τα θρεπτικά υλικά που αποστειρώθηκαν με διήθηση ή τυνταλισμό.

Η διατήρηση των θρεπτικών υλικών γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η ξήρανσή τους. Στα υγρά θρεπτικά υλικά η εξάτμιση του νερού προκαλεί αύξηση της πυκνότητας των συστατικών τους και μπορεί έτσι να ανασταλεί η ανάπτυξη των μικροβίων. Η αποξήρανση των υλικών που περιέχουν άγαρ τα καθιστά γρήγορα ακατάλληλα, γιατί μειώνεται η ποσότητα του ελεύθερου νερού που είναι απαραίτητο για τη ζωή των μικροβίων.

Τα υλικά διατηρούνται περισσότερο αν δεν τα έχουμε μοιράσει (στις φιάλες). Όλα τα θρεπτικά υλικά διατηρούνται στο ψυγείο στους 4°C περίπου. Τα τρυβλία τοποθετούνται στο ψυγείο ανάποδα (το υλικό προς τα πάνω) για να κρατούν περισσότερο τους υδρατμούς.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, τα κοινά θρεπτικά υλικά επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροβίων χωρίς αυξημένες μεταβολικές ανάγκες. Έχουμε ήδη δει δυο κοινά θρεπτικά υλικά, το θρεπτικό ζωμό και το θρεπτικό άγαρ.

Άλλα κοινά θρεπτικά υλικά είναι:

• Ο πεπτικός ζωμός του Filde. Διαφέρει από το κοινό ζωμό στο ότι αντί για εκχύλισμα κρέατος περιέχει προϊόν ενζυματικής πέψης ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου με τρυψίνη και HCl (υδροχλωρικό οξύ).

• Ο πεπτικός ζωμός του Hartley. Διαφέρει από τον κοινό ζωμό στο ότι αντί του εκχυλίσματος κρέατος περιέχει προϊόν ενζυματικής, με παγκρεατικό υγρό, πέψης καρδιάς βοδιού ή κρέατος.

• Άλλοι ζωμοί όπως ο πεπτικός ζωμός Todd-Hewitt, πεπτικός ζωμός κρέατος ίππου κ.α

Απαιτούμενα υλικά

1. Κάποιο θρεπτικό υλικό (υγρό ή στερεό) αποστειρωμένο και μοιρασμένο σε τρυβλία και σωληνάρια

Προτιμότερο είναι να έχουμε ένα στερεό υλικό σε τρυβλία και κάποιο υγρό υλικό σε σωληνάρια.

2. Επωαστικός κλίβανος

3. Ψυγείο

Πορεία

1. Τοποθετούμε τα τρυβλία και τα σωληνάρια με το θρεπτικό υλικό στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες. Τα σωληνάρια θα πρέπει να είναι στερεωμένα είτε σε στατώ, είτε σε μεταλλικό καλάθι.

2. Βγάζουμε τα τρυβλία από τον κλίβανο και ελέγχουμε για τυχόν ανάπτυξη αποικιών.

3. Βγάζουμε τα σωληνάρια και ελέγχουμε για τυχόν θόλωση, ίζημα ή υμένιο.

3. Τοποθετούμε τα τρυβλία στοιβαγμένα ανάποδα στο ψυγείο.

4. Τοποθετούμε τα σωληνάρια όπως είναι στο ψυγείο.

5. Πριν την τελική χρήση (ενοφθαλμισμός) ελέγχουμε εκ νέου.

|  |
| --- |
| Άσκηση 8. Παρασκευή θρεπτικού υλικού CHAPMAN (υλικά για σταφυλόκοκκους) |

Βασικές γνώσεις: Οι σταφυλόκοκκοι έχουν την ιδιότητα να επιζούν και να πολλαπλασιάζονται μέσα σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε μεγάλη πυκνότητα, μέσα στα οποία τα περισσότερα από τα συνήθη μικρόβια αναστέλλονται. Προκειμένου να απομονώσουμε σταφυλοκόκκους από ένα μικροβιοβριθές υλικό (π.χ κόπρανα), εμβολιάζουμε μέσα σε θρεπτικό υλικό, όπως ο αλατούχος ζωμός, το πεπτονούχο ύδωρ, ο ζωμός του Robertson, που περιέχουν χλωριούχο νάτριο 7-10%.

Το πιο διαδεδομένο θρεπτικό υλικό για σταφυλόκοκκους είναι το Chapman. Στο υλικό αυτό υπάρχουν πολλοί τύποι, τόσο εμπειρικοί όσο και του εμπορίου. Ένας τύπος που συνίσταται ( Εμμαν. Αρσένη - Μικροβιολογία) είναι:

Θρεπτικό άγαρ ...........................100 ml

Μαννιτόλη ................................. 1 gr

Χλωριούχο νάτριο .....................7.5 gr

Ερυθρό της φαινόλης 0.2% .......0.5 ml

Ρυθμίζεται το pH στο 8,3 με διάλυμα NaOH 1Ν. Αποστειρώνεται στους 121°C για 15' και μοιράζεται σε τρυβλία. Στο υλικό αυτό οι αποικίες του χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου εμφανίζονται μετά από 48 ώρες με χροιά κίτρινη μέχρι πορτοκαλί.

Άλλα υλικά εκλεκτικά για την ανάπτυξη των σταφυλοκόκκων είναι τα εξής: Υλικό με χλωριούχο λίθιο και τελλουριώδες κάλιο (Ludlan), άγαρ με γάλα, άγαρ με κρόκο αυγού, άγαρ με μονοακετυλική γλυκερίνη, άγαρ με πολυμυξίνη Β 75 mg%.

Απαιτούμενα υλικά

1. Υλικά παρασκευής για 100 ml θρεπτικού άγαρ (δες σελ.6)

2. Μαννιτόλη

3. Χλωριούχο νάτριο

4. Ερυθρό της φαινόλης

5. Διάλυμα NaOH 1N

Πορεία

1. Παρασκευάζουμε το θρεπτικό άγαρ

2. Προσθέτουμε εν' όσον διαλύουμε, τη μαννιτόλη, το χλωριούχο νάτριο και το ερυθρό της φαινόλης σε αναλογία σύμφωνη με τις παραπάνω οδηγίες.

3. Διορθώνουμε το pH στο 8,3.

|  |
| --- |
| Άσκηση 9. Παρασκευή αιματούχου και σοκολατόχρωμου άγαρ (υλικά για στρεπτόκοκκους) |

Βασικές γνώσεις : Η καλλιέργεια των στρεπτοκόκων δεν απαιτεί ειδικά εκλεκτικά υλικά γιατί αυτοί, όπως και οι πνευμονιόκοκκοι, αναπτύσσονται στο αιματούχο και το σοκολατόχρωμο άγαρ όπως και στους αντίστοιχους ζωμούς. Για την ενίσχυση της παραγωγής των αντιγόνων των β-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων βοηθά η καλλιέργεια μέσα στο ζωμό Todd-Hewitt.

Για την αναγνώριση των αποικιών τους βοηθά η προσθήκη κρυσταλλικού ιώδους σε αναλογία 1:500,000 μέσα στο αιματούχο άγαρ. Το ορούχο ύδωρ του Hiss ευνοεί επίσης την ανάπτυξη των στρεπτοκόκκων και των πνευμονιοκόκκων.

Απαιτούμενα υλικά

1. Βάση αιματούχου άγαρ (Blood Agar Base). Υπάρχει έτοιμη στο εμπόριο. Υπολογίζουμε την ποσότητα για παρασκευή 250 ml άγαρ.

2. Αίμα (μπαίνει σε αναλογία 7-10%, περίπου 15 ml στα 250 ml για την άσκηση). Το αίμα μπορούμε να το προμηθευτούμε από κάποια Αιμοδοσία (ασκοί που έχουν λήξει αλλά δεν είναι μολυσμένοι) ή από αιμοληψία με κιτρικό αντιπηκτικό.

3. Υλικά παρασκευής θρεπτικών υλικών.

Πορεία

1. Παρασκευάζουμε τη βάση του αιματούχου άγαρ.

2. Μοιράζουμε σε 2 κωνικές φιάλες από 100 ml.

3. Αποστειρώνουμε

4. Αφήνουμε να κατέβει η θερμοκασία του στους 42-45°C (να είναι ανεκτό από το χέρι)

5. Στη συνέχεια δουλεύουμε δίπλα στη λυχνία Bunsen.

6. Προσθέτουμε το αίμα με ήπια ροή στα τοιχώματα της φιάλης.

7. Ταυτόχρονα αναδεύουμε με ήπιες κινήσεις.

8. Μοιράζουμε το υλικό της μιας φιάλης σε τρυβλία.

9. Θερμαίνουμε την άλλη φιάλη λίγο (≈50°C) μέχρι να αρχίσουν να βγαίνουν ατμοί, όχι περισσότερο γιατί υπάρχει κίνδυνος να σχηματιστούν κροκίδες και να καταστραφεί το υλικό. Κατά τη θέρμανση του αιματούχου άγαρ, η αιμοσφαιρίνη του αίματος μετατρέπεται σε μεθαιμοσφαιρίνη και το υλικό παίρνει το χρώμα σοκολάτας.

10.Μοιράζουμε σε τρυβλία.

11.Επειδή τα υλικά αυτά σχηματίζουν εύκολα φυσαλίδες, πριν πήξει το υλικό μας, καίμε την επιφάνεια του υλικού με τη φλόγα.

|  |  |
| --- | --- |
| Άσκηση 10. Παρασκευή θρεπτικού υλικού LOWENSTEIN | JENSEN (υλικά για μυκοβακτηρίδια) |

Βασικές γνώσεις: Το υλικό εκλογής για την καλλιέργεια των μυκοβακτηριδίων είναι το Lowenstein-Jensen. Επίσης για τις ανακαλλιέργειες του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης αλλά και για τη διατήρηση καλλιεργειών στρεπτοκόκκων και άλλων μικροβίων, χρησιμοποιούμε το υλικό Dorset:

Εναιώρημα αυγών..................... 75 ml

Θρεπτικός ζωμός....................... 25 ml

Πράσινο του μαλαχίτη 2%........ 1,25 ml

Για την πρώτη απομόνωση του μυκοβακτηριδίου υστερεί του υλικού Lowenstein-Jensen. Επίσης ένα άλλο υγρό θρεπτικό υλικό, που επιτρέπει την ομοιομερή ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης, είναι το υλικό του Dubos. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τις δοκιμές ευαισθησίας στα αντιβιοτικά ή για τις δοκιμές των βιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων των μικροβίων.

Απαιτούμενα υλικά

1. Διάλυμα Α. Περιέχει:

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο .... 0,4 gr

Θειικό μαγνήσιο ..................... 0,04 gr

Κιτρικό μαγνήσιο ................... 0,1 gr

Ασπαραγίνη ............................ 0,6 gr

Γλυκερίνη ............................... 2,0 ml

DH2O...................................... 100 ml 13

2. Διάλυμα πράσινου του μαλαχίτη 2%

3. 3-4 αυγά όρνιθας

Πορεία

1. Παρασκευάζουμε 100 ml από το διάλυμα Α σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες.

2. Αποστειρώνουμε το διάλυμα στους 121°C για 25'.

3. Παρασκευάζουμε εναιώρημα από τα 4 αυγά ανακατεύοντας μέσα σε ποτήρι ζέσεως.

4. Προσθέτουμε 170 ml από το εναιώρημα των αυγών μέσα στο διάλυμα (πρέπει να έχει κρυώσει αρκετά).

5. Προσθέτουμε 4 ml από το διάλυμα του μαλαχίτη.

|  |
| --- |
| Άσκηση 11. Παρασκευή θρεπτικού υλικού του HOYLE (υλικά για κορυνοβακτηρίδια) |

Βασικές γνώσεις: Για την καλλιέργεια των κορυνοβακτηριδίων χρησιμοποιούμε τα παρακάτω θρεπτικά υλικά:

• **Ορούχο υλικό Loeffler:**

Ορός βοδιού (ή άλλου ζώου) .......75 ml

Θρεπτικός ζωμός..........................25 ml

Γλυκόζη........................................1,0 gr

Η αποστείρωση και η διανομή του υλικού αυτού γίνεται με ειδικές συνθήκες (αποστείρωση σε 115°C, διανομή σε σωληνάρια με βιδωτό πώμα και πήξη σε θερμοκρασία 75-80°C για 2 ώρες.

• **Υλικό του Hoyle:** Η παρασκευή του περιγράφεται παρακάτω.

**• Υλικό του Mc Leod:**

Αυτό είναι σοκολατόχρωμο άγαρ που περιέχει τελλουριούχο κάλιο και αίμα κουνελιού το οποίο όμως θερμαίνεται στους 75°C για 15'. Σε αυτό δε γίνεται καλή επίστρωση γι' αυτό και δεν υπερτερεί του υλικού Hoyle.

• **Ζωμός του Μonkton**:

Χρησιμοποιείται σαν εμπλουτιστικό υλικό γιατί σ' αυτόν τα κορυνοβακτηρίδια αναπτύσσονται ταχύτερα των άλλων μικροβίων.

Απαιτούμενα υλικά

1. Υλικό Hoyle

θρεπτικό άγαρ.................................100 ml

Αιμόλυμα........................................5 ml

Τελλουριούχο κάλιο 3.5% .............1 ml

Το αιμόλυμα το παρασκευάζουμε από αίμα που έχει αιμολυθεί με εναλλασσόμενη κατάψυξη και απόψυξη.

Πορεία

1. Παρασκευάζουμε και αποστειρώνουμε το θρεπτικό άγαρ.

2. Αφήνουμε να κρυώσει (≈55°C).

3. Προσθέτουμε στο διάλυμα το αιμόλυμα και το αλάτι.

4. Αναμιγνύουμε

5. Μοιράζουμε σε τρυβλία.

|  |
| --- |
| Άσκηση 12. Παρασκευή άγαρ MC CONKEY (υλικά για εντεροβακτηριακά) |

Βασικές γνώσεις; Το **άγαρ Mc Conkey** είναι το βασικό διαφοροποιητικό υλικό για την απομόνωση των **εντεροβακτηριακών** και περιέχει χολή, λακτόζη και δείκτη ουδέτερο ερυθρό. Οι αποικίες των μικροβίων που ζυμώνουν τη λακτόζη γίνονται ρόδινες ενώ οι υπόλοιπες παραμένουν άχροες. Φέρεται έτοιμο στο εμπόριο με τη μορφή αφυδατωμένης σκόνης από την οποία παρασκευάζεται το τελικό προϊόν σύμφωνα με τις οδηγίες της φιάλης. Η σύνθεση του είναι η εξής:

Πεπτόνη..................................... 10,0 gr

Ταυροχολικό νάτριο.................. 5,0 gr

Λακτόζη .................................... 10,0 gr

Άγαρ.......................................... 20,0 gr

Ουδέτερο ερυυθρό 2%.............. 3,5 ml

DH2O................................. εως 1000 ml

Δια μεταβολής του είδους της χολής και με την προσθήκη κρυσταλλικού ιώδους παρασκευάζονται οι διάφοροι τύποι του Mc Conkey (No1, No2, No3).

Άλλα υλικά για την ανάπτυξη των εντεροβακτηριακών είναι:

• Το **Δεσοξυχολικό κιτρικούχο άγαρ** (ή DC υλικό): Οι αποικίες των διαπώντων τη λακτόζη μικροβίων είναι ρόδινες στο υλικό αυτό, των μη διασπώντων άχροες, ενώ του πρωτέα και μερικών σαλμονελλών μερικές φορές έχουν μαύρο κέντρο.

• **Ζωμός του σεληνίτη:** Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται ως εμπλουτιστικό για την απομόνωση σαλμονελλών από τα κόπρανα. Υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο με την εξής σύνθεση:

Σεληνιακό νάτριο (NaHSeO3)..........4,0 gr

Πεπτόνη.............................................5,0 gr

Λακτόζη ............................................4,0 gr

Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na2HPO4.12H2O) 9,5 gr

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH2PO4.2H2O) 0,5 gr

DH2O........................................ έως 1000 ml

• **Τετραθειονικός ζωμός**: Αυτός χρησιμοποιείται σαν εμπλουτιστικό υλικό για την απομόνωση των σαλμονελλών από τα κόπρανα. Αναστέλλει την ανάπτυξη των κολοβακτηριδίων, όχι όμως και των πρωτέων.

• Τέλος υπάρχουν και άλλα υλικά όπως το άγαρ με κυανούν του μεθυλενίου και ηωσίνης (ΕΜΒ υλικό), το SS-άγαρ, το υλικό Kligler κλπ.

Απαιτούμενα υλικά

1. Αφυδατωμένη σκόνη άγαρ Mc Conkey

2. Υλικά για την παρασκευή θρεπτικών υλικών

Πορεία

Εργαζόμαστε όπως και με όλα τα άλλα υλικά.

|  |
| --- |
| Άσκηση 17. Αερόβια καλλιέργεια |
| Τι είναι- τεχνική |

Βασικές γνώσεις

Αναερόβια μικρόβια ή αναερόβια βακτήρια είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που δεν μπορούν να αναπτυχθούν ή θανατώνονται σε περιβάλλον που υπάρχει οξυγόνο (Ο2). [Αναεροβίωση = Ζωή χωρίς αέρα].

1.       Αυτός ο αρκετά απλουστευμένος ορισμός δίνει στους μη ειδικούς μια ιδέα για την ιδιαίτερη συμπεριφορά αυτών των βακτηρίων.

2.       Γενικά τα βακτήρια μπορούν να διαιρεθούν σε 3 κατηγορίες:

3.       Αυστηρά αερόβια, που για να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν χρειάζονται Ο2.  Ως παράδειγμα αναφέρεται η ψευδομονάδα (*Pseudomonas aeruginosa*).

4.       Αυστηρά αναερόβια, που θανατώνονται από το Ο2, π.χ. το βακτήριο που προκαλεί τέτανο (*Clostridium tetani*).

5.       Δυνητικά αναερόβια, δηλ. βακτήρια που επιβιώνουν στο περιβάλλον είτε υπάρχει είτε δεν υπάρχει Ο2.  Τέτοια βακτήρια είναι το κολοβακτηρίδιο (*Escherichia coli*) και ο σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus).*

Το νόσημα που προκαλείται από κάποιο βακτήριο (αερόβιο ή αναερόβιο) ονομάζεται λοίμωξη.

Φυσιολογικά αναερόβια βακτήρια υπάρχουν στο στόμα, στο έντερο, στον κόλπο της γυναίκας και στο δέρμα.  Στα σημεία αυτά μαζί με αερόβια αποτελούν τη λεγόμενη φυσιολογική χλωρίδα.  Σημειώνεται ότι φυσιολογικά τα αναερόβια βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας είναι 10 έως 100 φορές περισσότερα από τα αερόβια, ανάλογα με τη θέση λήψης του δείγματος.

Καλλιεργούμε πάντα τα μικρόβια σε συνθήκες ανάλογες με τις μεταβολικές τους ανάγκες. Τα μικρόβια, ανάλογα με το πώς χρησιμοποιούν το οξυγόνο για τις καύσεις τους χωρίζονται σε α) **αερόβια**, β) **αναερόβια** και γ) **μικοαερόφιλα.** Η θερμοκρασία επώασης είναι συνήθως 37°C καθώς μας ενδιαφέρουν κυρίως τα μικρόβια που αναπτύσσονται στη θερμοκρασία του σώματος.

Η αερόβια καλλιέργεια γίνεται μέσα σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή (37°C) και υπάρχει ποσό υγρασίας (≈50% σχετική υγρασία). Η επώαση μπορεί να γίνει και σε υδατόλουτρο σταθερής και ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, προκειμένου να επωασθεί μικρός αριθμός σωληναρίων. Στον επωαστικό κλίβανο τα σωληνάρια τοποθετούνται σε στατώ ή συρμάτινα καλάθια (με βαμβάκι τον πυθμένα), τα δε τρυβλία μεμονωμένα ή το ένα πάνω στο άλλο (όχι πάνω από 5) και ανεστραμμένα δηλ. το κάλυμμα προς το δάπεδο για να παραμένουν οι υδρατμοί επί του υλικού και να μη συμπυκνώνονται στο κάλυμμα.

Αν η επώαση είναι παρατεταμένη, πρέπει να φροντίσουμε να μην αποξηρανθούν τα υλικά μας είτε χρησιμοποιώντας φιαλίδιο με βιδωτό πώμα (Bizoux) είτε περιτυλίγοντας το στόμιο των σωληναρίων με παραφίλμ (Parafilm), της περιφέρειας των τρυβλίων με λευκοπλάστη ή ταινία. Η υγρασία προέρχεται από βρεγμένο βαμβάκι ή ποτήρι με νερό που τοποθετείται στον κλίβανο.

Απαιτούμενα υλικά

1. Τρυβλία και σωληνάρια εμβολιασμένα με κάποιο μικρόβιο.

2. Συρμάτινα καλάθια ή στατώ

3. Ένα ποτήρι ζέσεως

4. Ταινία ή παραφίλμ

Πορεία

1. Γεμίζουμε το ποτήρι ζέσεως με νερό και το τοποθετούμε στον κλίβανο για να εξασφαλίσουμε υγρασία.

2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια μέσα στο συρμάτινο καλάθι (με βαμβάκι στον πάτο) και βάζουμε το καλάθι στον κλίβανο.

3. Ασφαλίζουμε τα τρυβλία, αν παραμείνουν πολύ, με ταινία που τοποθετείται γύρω-γύρω από το καπάκι και τα τοποθετούμε στον κλίβανο.

4. Μετά από 24-48 ώρες ελέγχουμε για πιθανόν ανάπτυξη των μικροβίων.

|  |
| --- |
| Άσκηση 18. Αναερόβια καλλιέργεια σε ειδικά δοχεία |

Βασικές γνώσεις: Η αναερόβια καλλιέργεια επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση των προς επώαση καλλιεργημάτων σε ειδικά δοχεία, από τα οποία αφαιρείται το οξυγόνο. Σε περίπτωση όμως που δε διαθέτουμε το ειδικό δοχείο και τα μέσα για τη δέσμευση του οξυγόνου, μπορούμε να πετύχουμε αναερόβια καλλιέργεια με άλλους τρόπους με τους οποίους επιδιώκεται η αύξηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του υλικού (πάνω από 43 mV). Η αναερόβια καλλιέργεια σε ειδικά δοχεία γίνεται με έναν από τους παρακάτω 2 τρόπους:

1. **Δέσμευση του οξυγόνου από πυρογαλλικό οξύ**. Γίνεται σε ειδικό δοχείο όπου τοποθετούνται στον πυθμένα πυρογαλλικό οξύ και καυστικό νάτριο. Από τη χημική ένωση των ουσιών αυτών απορροφάται όλο το οξυγόνο.

2. **Δέσμευση του οξυγόνου από υδρογόνο**. Η δέσμευση αυτή γίνεται παρουσία καταλύτη (σπογγώδες παλλάδιο), είτε από υδρογόνο που διοχετεύεται στη συσκευή αφού αφαιρεθεί ο αέρας, είτε από υδρογόνο που παράγεται μέσα στο ειδικό δοχείο σαν αποτέλεσμα κάποιας χημικής αντίδρασης που πραγματοποιείται. Ο έλεγχος της δέσμευσης του οξυγόνου γίνεται με ειδικό δείκτη που αποχρωματίζεται μέσα σε 20-30 λεπτά.

Απαιτούμενα υλικά

1. Θρεπτικό υλικό σε τρυβλία ή σωληνάρια εμβολιασμένο με κάποιο μικρόβιο.

2. Ειδική συσκευή αναεροβίου καλλιέργειας.

Πορεία

1. Ετοιμάζουμε τα τρυβλία όπως και στην αερόβια καλλιέργεια.

2. Εργαζόμαστε στη συνέχεια ανάλογα με τις οδηγίες της συσκευής που διαθέτουμε (αν διαθέτουμε).

|  |
| --- |
| Άσκηση 19. Αναερόβια καλλιέργεια με αύξηση της αναγωγικής δύναμης |

Βασικές γνώσεις: Η αναερόβια καλλιέργεια με αύξηση της αναγωγικής δύναμης του υλικού γίνεται με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

1. **Βρασμός του θρεπτικού υλικού**. Με το βρασμό επιτυγχάνουμε παροδική αύξηση της αναγωγικής δύναμης, εκτός αν προσθέσουμε στην επιφάνεια του υλικού υγρή παραφίνη, βαζελίνη κλπ.

2. **Καλλιέργεια σε υψηλή στήλη**. Αυτή γίνεται με νύξη, με εμβολιασμό του μικροβίου στον πυθμένα του σωληναρίου (υλικό στους 45-50°C), ή με εμβολιασμό σε όλη τη μάζα του υλικού. Στην επιφάνεια του υλικού τοποθετείται παραφίνη ή βαζελίνη.

3. **Συγκαλλιέργεια αναεροβίων** με αερόβια μικρόβια. Σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό και στο κάλυμμα, εμβολιάζεται αναερόβιο μαζί με αερόβιο μικρόβιο, κατά προτίμηση χορτοβακτηρίδιο το οποίο καταναλώνει γρήγορα το οξυγόνο του τρυβλίου (που έχει κλειστεί αεροστεγώς) και έτσι δημιουργείται αναερόβιο περιβάλλον (περιγράφεται παρακάτω).

4. **Καλλιέργεια παρουσία αναγωγικών ουσιών**:

• Μέσα στον μετά κρέατος ζωμό του Robertson διότι το κρέας αυξάνει την αναγωγική ιδιότητα του υλικού.

• Μέσα στον θειογλυκολικό ζωμό. Ο θειογλυκολικός ζωμός είναι θρεπτικός ζωμός που περιέχει θειογλυκολικό νάτριο και μικρή ποσότητα άγαρ μέσα στον οποίο διατηρείται αρκετό διάστημα χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό.

• Σε κοινά θρεπτικά υλικά παρουσία σιδήρου. Χρησιμοποιούνται τεμάχια σιδήρου από κοινό σύρμα ή καρφιά τα οποία πυρακτώνονται σε φλόγα, ψύχονται μέσα σε αποστειρωμένο ζωμό και τοποθετούνται σε σωληνάρια με κοινό η σακχαρούχο σωμό. Ο σίδηρος αυξάνει την αναγωγική ικανότητα του υλικού.

Απαιτούμενα υλικά

1. Καλλιέργημα από κάποιο αερόβιο μικρόβιο (χορτοβακτηρίδιο).

2. Τρυβλία με κάποιο στερεό θρεπτικό υλικό. Θα πρέπει να έχει, κατά τη διανομή, τοποθετηθεί και μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού και στο καπάκι του τρυβλίου.

3. Ύποπτο για αναερόβια μικρόβια υλικό (ούρα, φαρυγγικό επίχρισμα κ.α.)

Πορεία

1. Παρασκευάζουμε εναιώρημα από 2-3 αποικίες από το αερόβιο μικρόβιο.

2. Εμβολιάζουμε το εναιώρημα στο καπάκι του τρυβλίου (σε όλη την επιφάνεια).

3. Εμβολιάζουμε το ύποπτο υλικό στο θρεπτικό μας υλικό (σε τεθλασμένη γραμμή).

4. Κλείνουμε το καπάκι και το σφραγίζουμε με ταινία λευκοπλάστης.

5. Επωάζουμε κανονικά στον κλίβανο.

|  |
| --- |
| Άσκηση 20. Καλλιέργεια παρουσία CO2 |
| Τι είναι - τεχνική |

Βασικές γνώσεις:

Αερόβια επώαση

Επωαστικός κλίβανος

Θερμοκρασία 35-37οC

Σχετική υγρασία 50%

Σχεδόν για όλες τις καλλιέργειες

Τα τρυβλία τοποθετούνται ανεστραμένα

∆ιάρκεια επώασης: συνήθως 18-24h

Σε πολυήμερη επώαση → σφράγισμα των τρυβλίων

Οι τρόποι για την καλλιέργεια αυτή είναι:

• **Σε φιάλη αναερόβιου καλλιέργειας**: Με αεραντλία αφαιρείται ο αέρας και εισάγεται CO2 από οβίδα.

• **Σε ειδικό αεροστεγές δοχείο**: Με την πραγματοποίηση χημικής αντιδράσεως (π.χ HCl και CaCO3) παράγεται αρκετή ποσότητα CO2, το οποίο ως πιο βαρύ από τον αέρα καταλαμβάνει τα κάτω στρώματα του δοχείου.

• **Με εισαγωγή αερίου CO2**. Αυτή γίνεται με σύριγγα σε φιάλες αιμο-καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας CO2 από οβίδα ή συσκευή Kipp.

• **Με κερί**. Τοποθετείται αναμένο κερί σε δοχείο που έχουν τοποθετηθεί τα καλλιεργήματα και το κλείνουμε ερμητικά. Οταν σβήσει το κερί θα έχει παραχθεί αρκετό CO2 για την επώαση (5-10%).

Απαιτούμενα υλικά

1. Παθολογικό υλικό, ύποπτο για αναερόβια (ή μικροαερόφιλα) μικρόβια εμβολιασμένο σε κάποιο στερεό θρεπτικό υλικό (σε τρυβλία ή σωλήνες) με κάποια από τις ειδικές τεχνικές εμβολιασμού για αναερόβια μικρόβια.

2. Ένα γυάλινο βάζο (αρκετά μεγάλο ώστε να χωρά μέσα τα καλλιεργήματα) με καπάκι που κλείνει ερμητικά. 3. Ένα κερί.

Πορεία

1. Βάζουμε τα τρυβλία ή τους σωλήνες μέσα στο γυάλινο βάζο.

2. Τοποθετούμε το κερί όρθιο μέσα στο βάζο και το ανάβουμε.

3. Κλείνουμε ερμητικά το βάζο.

4. Μόλις σβήσει το κερί (επειδή δεν υπάρχει αρκετό οξυγόνο να συντηρήσει την καύση) το περιβάλλον είναι έτοιμο για την επώαση.

5. Τοποθετούμε το βάζο στον επωαστικό κλίβανο ή οπουδήποτε αλλού ανάλογα με τις απαιτήσεις επώασης.

**2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΠΤΙΚΉΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΕΝΕΩΡΗΜΑΤΟΣ**

**Νεφλομετρία**

**Φωτομετρία**

**3.ΧΡΩΣΕΙΣ**

Γενικά: Με τον όρο χρώση εννοούμε το σύνολο των διαδικασιών, με τις οποίες η δημιουργία χρωστικών αντιθέσεων που προκύπτει από την προσθήκη των κατάλληλων χρωστικών ουσιών, μας δίνει πολλές χρήσιμες πληροφορίες για το εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου.

Σε όλες τις χρωστικές μεθόδους τα σημαντικά προς απάντηση ερωτήματα είναι: Γιατί κάποιο συστατικό του κυττάρου μπορεί να χρωματιστεί, γιατί τα συστατικά παραμένουν βαμμένα μετά την απομάκρυνση της χρωστικής και γιατί δε βάφονται όλα τα συστατικά.

Η προσθήκη ή η είσοδος μιας χρωστικής σε ένα κύτταρο, μικρόβιο κλπ μπορεί να οφείλεται σε φυσικοχημικό (pH), οσμωτικό, ή φαινόμενο διαπίδυσης καθώς επίσης στην ύπαρξη υδρόφοβων ομάδων, υδρογόνου ή ειδικών υποδοχέων ή τέλος στις δυνάμεις Van der Waals και τις Coulomb.

Τρόποι χρώσης

Οι τρόποι της χρώσης των μικροβίων διακρίνονται ανάλογα με τη χρώση του μικροβίου ή του υποστρώματος σε θετικές και αρνητικές, ανάλογα με τη χρήση ενός ή περισσοτέρων χρωστικών διαλυμάτων σε απλές και σύνθετες και ανάλογα με την ιδιαιτερότητα ή όχι της τεχνικής του χρωστικού αντικειμένου ή του επιδιωκόμενου αποτελέσματος σε κοινές και ειδικές, όπως π.χ. οξεάντοχη, χρώση βλεφαρίδων ή ελύτρου, χρώση σπόρων, μυκήτων, DNA, εγκλείστων κλπ.

Διάκριση χρωστικών ουσιών

Οι χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη χρώση των μικροβίων και των κυττάρων διακρίνονται σε:

Αιματοξυλίνη

Αιματείνη

Φυτικές Βραζιλείνη

Ορσείνη

**ΦΥΣΙΚΕΣ**  Κρόκος

Ζωικές Καρμίνιο

Πικρικό οξύ

Αουράνθια

Πορτοκαλόχρουν G

Όξινες Εωσίνη

Ερυθροσίνη

Όξινη φουξίνη

Ιώδεις: ιώδες γεντιανής, κρυσταλλικό, του μεθυλίου κλπ.

Πράσινες: του μεθυλίου, Litgh (στίλβον) του μαλαχίτη κλπ.

**ΤΕΧΝΗΤΕΣ** Βασικές Κυανές: μεθυλίου, τολουιδίνης κλπ.

Ερυθρές: Βασική φουξίνη, της φαινόλης, του Κονγκό κλπ.

Μαύρες: Ινδολίνη, του Colin, του Σουδάν

Ουδέτερες Ουδέτερο ερυθρό, Giemsa, May-Grunwald, Leishmann κλπ.

**4.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ**

|  |
| --- |
| Άσκηση 13. Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε υγρό θρεπτικό υλικό |

Βασικές γνώσεις:Η διαδικασία της τοποθέτησης ενός παθολογικού υλικού σε ένα θρεπτικό υλικό, προκειμένου να αναπτυχθεί για να μπορέσουμε να το μελετήσουμε λέγεται **ενοφθαλμισμός ή εμβολιασμός ή σπορά του υλικού.**

Ακολουθείται, ανάλογα με το θρεπτικό υλικό που έχουμε και το σκοπό που θέλουμε να πετύχουμε, συγκεκριμένη τεχνική διαδικασία για να πετύχουμε καλύτερη απομόνωση των μικροβίων, εξασφαλίζοντας παράλληλα άσηπτες συνθήκες.

Ο **ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΥΓΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ** γίνεται όταν θέλουμε να εμβολιάσουμε μικρή ποσότητα υλικού ή όταν γίνεται ανακαλλιέργεια από στερεό υλικό. Γίνεται συνήθως με τη βοήθεια ενός κρίκου αλλά μπορεί επίσης στις πρωτοκαλλιέργειες να γίνει με βαμβακοφόρο στειλεό και με πιπέττα όταν θέλουμε να εμβολιάσουμε μεγαλύτερη ποσότητα μικροβιακού εναιωρήματος.

Απαιτούμενα υλικά

1. Τρυβλίο στο οποίο έχουμε καλλιεργήσει κάποιο μικρόβιο ή οποιοδήποτε άλλο ύποπτο για μικρόβια υλικό (πτύελα, σκόνη εργαστηρίου κ.α)

2. Σωληνάρια με κάποιο υγρό θρεπτικό υλικό

3. Κρικοφόρος ή βαμβακοφόρος στειλεός

4. Λυχνία Bunsen

Πορεία

1. Δουλεύουμε συνέχεια κοντά στη φλόγα όπως φαίνεται στο σχήμα.

2. Πυρακτώνουμε το κρίκο στη φλόγα.

3. Αφήνουμε λίγο να κρυώσει

4. Παίρνουμε λίγο από το μικροβιακό υλικό.

5. Αποπωματίζουμε ένα σωληνάριο

6. Καίμε λίγο το στόμιο του σωληναρίου.

7. Βυθίζουμε τον κρίκο μέσα στο υγρό θρεπτικό υλικό.

8. Κινούμε τον κρίκο για λίγο πάνω-κάτω

9. Βγάζουμε τον κρίκο

10.Καίμε πάλι το στόμιο και πωματίζουμε το σωληνάριο.

11.Αποστειρώνουμε ξανά τον κρίκο με πυράκτωση στη φλόγα.

12.Σημειώνουμε πάνω στο σωληνάριο το υλικό που εμβολιάσαμε (π.χ "αποικία από πιθανό στρεπτόκοκκο" ή "πτύελα") και την ημερομηνία. Καλό είναι να αριθμούνται τα σωληνάρια βάσει ενός βιβλίου που κρατείται πλήρες ιστορικό του εμβολιασμού και της καλλιέργειας.

|  |
| --- |
| ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η ίδια διαδικασία γίνεται όταν έχουμε βαμβακοφόρο στειλεό. Όταν θέλουμε να εμβολιάσουμε μεγαλύτερη ποσότητα μικροβιακού εναιωρήματος, ρίχνουμε μια ποσότητα με αποστειρωμένη πιπέτα στο υγρό θρεπτικό υλικό και ακολούθως ομογενοποιούμε αναδεύοντας το μίγμα. |

|  |
| --- |
| Άσκηση 14. Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε τρυβλίο (τεθλασμένη γραμμή) |

Βασικές γνώσεις: Ο **ενοφθαλμισμός** ενός παθολογικού υλικού σε στερεό θρεπτικό υλικό γίνεται ή σε τρυβλία ή σε σωληνάρια. Ο ενοφθαλμισμός σε τρυβλία μπορεί να γίνει με τους εξής 5 τρόπους:

* Σε τεθλασμένη γραμμή.
* Σε όλη την επιφάνεια
* Με νύξη
* Με νύξη και επίστρωση
* Σε όλη τη μάζα

Ο ενοφθαλμισμός σε τρυβλία με τον τρόπο της τεθλασμένης γραμμής, εφαρμόζεται όταν θέλουμε να πάρουμε μεμονωμένες αποικίες.

Απαιτούμενα υλικά

1. Θρεπτικό υλικό σε τρυβλίο.

2. Παθολογικό υλικό (αποικία ή υγρό από κάποιο άλλοκαλλιέργημα)

3. Κρικοφόρος ή βαμβακοφόρος στειλεός ή πιπέτα Pasteur με κλειστό το λεπτό άκρο στη φλόγα, αποστειρωμένο και ελαφρά λυγισμένο.

4. Μερικές φορές , κυρίως όταν το ύποπτο υλικό μας είναι κάποιο υγρό, χρησιμοποιούμε αντί του κρίκου τηνκλειστή άκρη ενός αποστειρωμένου σωληναρίου αιμολύσεως (Wassermann).

Πορεία

1. Εμβολιάζουμε αρχικά με κρίκο σε μια μικρή περιοχή του τρυβλίου (1).

2. Με τον κρίκο ή την πιπέτα Pasteur ξεκινώντας από την περιοχή (1), επιστρώνουμε σε τεθλασμένη ή οριζόντιες γραμμές στο νοητό τέταρτο του τρυβλίου (2).

3. Πυρακτώνουμε τον κρίκο και αφήνουμε λίγο να κρυώσει.

4. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία και στις περιοχές (3) και (4). Στην περιοχή (4) αντί για πολλές γραμμές φέρουμε μια τεθλασμένη προς το κέντρο.

|  |
| --- |
| Άσκηση 15. Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε τρυβλίο (σε όλη την επιφάνεια) |

Βασικές γνώσεις: Εκτός από την μέθοδο ενοφθαλμισμού με τεθλασμένη γραμμή, που περιγράψαμε στην προηγούμενη άσκηση, έχουμε και άλλες μεθόδους ανάλογα με το σκοπό που γίνεται η καλλιέργεια, Αυτές είναι:

Ο ενοφθαλμισμός σε όλη την επιφάνεια ενός υλικού σε τρυβλίο εφαρμόζεται όταν θέλουμε να γίνει ομοιογενής ανάπτυξη του μικροβίου σε όλη την επιφάνεια του υλικού προκειμένου να κάνουμε το τεστ ευαισθησίας. (περιγράφεται παρακάτω)

Με τον εμβολιασμό με νύξη μελετάμε μερικές ιδιότητες των μικροβίων μέσα στη μάζα του θρεπτικού υλικού, όπως π.χ η παραγωγή του ενζυμου DNAase. Το μικροβιακό υλικό το παίρνουμε με βελονοκάτοχο από υγρό καλλιέργημα και τρυπάμε την πλάκα του υλικού στο τρυβλίο σε διάφορα σημεία που να απέχουν τουλάχιστον 1 cm.

Η μέθοδος με νύξη και επίστρωση, είναι συνδυασμός της "επίστρωσης σε τεθλασμένη γραμμή" και της "νύξης" και και χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να μελετήσουμε ιδιότητες των μικροβίων και παράλληλα να επιτύχουμε απομόνωση των αποικιών. Χρησιμοποιούμε βελονοκάτοχο και κρίκο ή πιπέτα Pasteur.

Τέλος, ο ενοφθαλμισμός σε όλη τη μάζα είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του αριθμού των αποικιών μέσα σε οποιοδήποτε υγρό υλικό. Το θρεπτικό υλικό, πριν ακόμα το μοιράσουμε σε τρυ-βλία, θερμαίνεται για να λειώσει και αφού παγώσει στους 40-45°C, εμβολιάζεται με το μικροβιακό εναιώρημα, αναμιγνύεται, μοιράζεται σε τρυβλία και μετά την πήξη επωάζεται στον κλίβανο. Επίσης με τον τρόπο αυτό μπορούν να αναπτυχθούν και μικρο-αερόφιλα μικρόβια.

Απαιτούμενα υλικά

1. Μικροβιακό εναιώρημα. Παρασκευάζεται εύκολα με τη διάλυση μιας αποικίας μικροβίων σε μικρή ποσότητα θρεπτικού ζωμού, DH2O ή άλλου υγρού.

2. Θρεπτικό υλικό σε τρυβλίο

Πορεία

1. Καλύπτουμε την επιφάνεια του υλικού στο τρυβλίο με το μικροβιακό εναιώρημα.

2. Αφήνουμε για λίγα λεπτά.

3. Απορρίπτουμε την ποσότητα του υγρού που περισσεύει.

4. <προαιρετικά> Επωάζουμε στον επωαστικό κλίβανο για μερικές ώρες και τοποθετούμε τους δίσκους με τα αντιβιοτικά στην επιφάνεια του τρυβλίου.

|  |
| --- |
| Άσκηση 16. Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε σωληνάρια με κεκλιμένο άγαρ |

Βασικές γνώσεις: Ένα στερεό θρεπτικό υλικό μπορεί να βρίσκεται σε σωληνάρια ή με τη μορφή του κεκλιμένου ή την επίπεδη μορφή. Διακρίνουμε γενικά τους παρακάτω τρόπους ενοφθαλμισμού τους.

1. Επίστρωση σε οριζόντιες γραμμές: Γίνεται σε κεκλιμένο άγαρ όταν θέλουμε να αναπτυχθεί το μικρόβιο σε μεγάλη επιφάνεια του υλικού.

2. Σε κεντρική γραμμή: Γίνεται επίσης σε κεκλιμένο άγαρ για τη διατήρηση μικροβιακών στελεχών και αποφεύγουμε έτσι τη μεγάλη εξάπλωση του μικροβίου.

3. Σε σημεία: Αποτελεί παραλλαγή της κεντρικής γραμμής και γίνεται για να πάρουμε ακόμα πιο μικρή ανάπτυξη του μικροβίου.

4. Με νύξη: Γίνεται με βελονοκάτοχο κατά μήκος της κεκλιμένης επιφάνειας του θρεπτικού υλικού για τους ίδιους λόγους όπως και στο τρυβλίο.

5. Σε όλη τη μάζα: Γίνεται όπως και στο τρυβλίο και βοηθάει την ανάπτυξη των αναεροβίων μικροβίων.

Απαιτούμενα υλικά

1. Στερεό θρεπτικό υλικό σε σωληνάρια (κατά προτίμηση κεκλιμένα)

2. Εναιώρημα μικροβίων

3. Βελονοκάτοχο

Πορεία

1. Βαπτίζουμε το βελονοκάτοχο μέσα στο εναιώρημα των μικροβίων.

2. Εμβολιάζουμε το θρεπτικό υλικό με νύξη του υλικού όσο πιο βαθιά μπορούμε.

3. Τραβώντας προς τα έξω το βελονοκάτοχο χαράζουμε απαλά μια κυματοειδή γραμμή όπως φαίνεται στο σχήμα (περίπτωση στ).

4. Αποστειρώνουμε ξανά τον κρίκο στη φλόγα.

1. **in vitro**: χρησιμοποιείται για την περιγραφή μιας βιολογικής διαδικασίας όταν αυτή πραγματοποιείται στο δοκιμαστικό σωλήνα**, in vivo**: χρησιμοποιείται για την περιγραφή μιας βιολογικής διαδικασίας όταν αυτή πραγματοποιείται σε ένα ζωντανό μικροοργανισμό. [↑](#footnote-ref-1)
2. **Διαλυτότητα** μιας ουσίας είναι η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα της ουσίας αυτής σε γραμμάρια, που μπορεί να διαλυθεί σε 100ml διαλύτη. [↑](#footnote-ref-2)
3. Ένζυμα που διασπούν τις πρωτεΐνες. [↑](#footnote-ref-3)
4. **Διάλυμα** είναι ένα υγρό ομογενές μίγμα από δύο ή περισσότερες ουσίες. Οι ουσίες αυτές δεν διακρίνονται μεταξύ τους με γυμνό μάτι ή μικροσκόπιο και δεν διαχωρίζονται με απλές μεθόδους.

   **Διαλύτης** είναι το υγρό μέσα στο οποίο είναι διαλυμένες οι ουσίες. [↑](#footnote-ref-4)
5. **Αμινοξύ**: Δομικός λίθος (μονομερές) των πρωτεϊνών, που αποτελείται από ένα άτομο Η, μια αμινομάδα, μια καρβοξυλομάδα και μια πλευρική ομάδα (R), ενωμένα σ΄ένα κοινό άτομο άνθρακα. [↑](#footnote-ref-5)
6. Το **pH** είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου. Εκφράζει την οξύτητα ενός διαλύματος. Όσο πιο μεγάλο είναι το pH, τόσο πιο αλκαλικό είναι το διάλυμα και όσο πιο μικρό είναι το pH, τόσο πιο όξινο είναι το διάλυμα. [↑](#footnote-ref-6)
7. Δε θα πρέπει να συγχέεται ο όρος "άγαρ" από τον όρο "θρεπτικό άγαρ" καθώς το πρώτο δηλώνει μόνο τη στερεωτική, μη θρεπτική, ουσία που παίρνεται από τα φύκια, ενώ το δεύτερο αναφέρεται σε θρεπτικό υλικό. [↑](#footnote-ref-7)