

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



Παναγιώτα Σταθοπούλου

ΑΓΡΙΝΙΟ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Άσκηση 1 : Εισαγωγή στο εργαστήριο μικροβιολογίας

Άσκηση 2 : Παρασκευή και αποστείρωση θρεπτικών μέσων

Άσκηση 3 : Ασηπτικές μέθοδοι εργασίας στη μικροβιολογία

Άσκηση 4 : Προσδιορισμός του αριθμού βακτηρίων με διαδοχικές αραιώσεις

Άσκηση 5 : Καθαρές καλλιέργειες – ανάπτυξη βακτηρίων σε υγρά θρεπτικά μέσα

Άσκηση 6 : Χρώση και μικροσκοπική εξέταση μικροοργανισμών

Διδάσκουσες: Παναγιώτα Σταθοπούλου
Τσίντζου Αλέκα

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ :

Α.Μ. :

ΟΜΑΔΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ :

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ			
	Άσκηση 1-2	Άσκηση 3-4	Άσκηση 5-6
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	04/11/21 (Τμήμα Α/Β)	18/11/21 (Τμήμα Α/Β)	
	11/11/21 (Τμήμα Γ/Δ)	25/11/21 (Τμήμα Γ/Δ)	
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ			02/12/21 (Τμήμα Α/Β)
			09/12/21 (Τμήμα Γ/Δ)

ΦΟΡΜΑ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ		
1. Εξώφυλλο	Τίτλος άσκησης – Στοιχεία φοιτητή – Αριθμός ομάδας	
2. Εισαγωγή	Θεωρία πάνω στην οποία στηρίζεται η εργαστηριακή άσκηση – Στόχοι εργαστηριακής άσκησης	(2/10)
3. Πειράματα	Αναλυτική περιγραφή των πραγματοποιηθέντων πειραμάτων	(2/10)
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση	Αποτελέσματα των μετρήσεων (τιμές, διαγράμματα κτλ.) – Επεξήγηση τυχόν αποκλίσεων του αναμενόμενου – Συμπεράσματα που εξάγονται από την συγκεκριμένη άσκηση – Απαντήσεις σε ερωτήσεις	(6/10)
5. Βιβλιογραφία	Πηγές που χρησιμοποιήθηκαν	
		(10/10)

1^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η Γενική Μικροβιολογία αποτελεί έναν κλάδο της Βιολογίας που ασχολείται με την ανίχνευση, απομόνωση και μελέτη των μικροοργανισμών. Για την πραγματοποίηση αυτών των εργασιών απαιτείται κατάλληλη εργαστηριακή υποδομή και μεθοδολογία. Σκοπός αυτού του εργαστηριακού μαθήματος είναι η εξοικείωση σας με τον χώρο και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου, τους κανόνες ασφάλειας και τις βασικές αρχές απολύμανσης και αποστείρωσης.

Εξοπλισμός εργαστηρίου

Κάθε εργαστήριο Μικροβιολογίας θα πρέπει να περιέχει κατάλληλο εργαστηριακό πάγκο και νιπτήρα για κάθε εργαζόμενο. Επίσης το εργαστήριο θα πρέπει να έχει την κατάλληλη υποδομή:

- α) για το πλύσιμο και την αποστείρωση των υλικών και μικροσυσκευών που χρησιμοποιούνται κατά την εκτέλεση των μικροβιολογικών εργασιών όπως πλυντήριο, αυτόκαυστο, κλίβανο ξηρής αποστείρωσης,
- β) για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων όπως σύστημα απόσταξης νερού, ζυγούς, αναδευτήρες, πεχάμετρο,
- γ) για τη συντήρηση θρεπτικών υλικών, αντιδραστηρίων και μικροοργανισμών όπως ψυγεία, καταψύκτες, βαθύς καταψύκτες, τράπεζα υγρού αζώτου,
- δ) για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπως ανακινούμενους και θερμορυθμιζόμενους επωαστήρες, ειδική συσκευή για την καλλιέργεια των αναερόβιων μικροοργανισμών,
- ε) για τη μικροσκοπική μελέτη των μικροοργανισμών όπως κατάλληλα εξοπλισμένο οπτικό μικροσκόπιο,
- στ) για την απομόνωση των μικροοργανισμών όπως φίλτρα και φυγοκέντρους και
- ζ) για τη δημιουργία ασηπτικών συνθηκών εργασίας όπως ειδικές εστίες εργασίας (απαγωγοί).

Κανόνες ασφάλειας

Βασικός κανόνας της Μικροβιολογίας είναι ότι **κάθε μικροοργανισμός μπορεί να είναι εν δυνάμει παθογόνος και επικίνδυνος για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον.** Συνεπώς κάθε εργαστήριο Μικροβιολογίας θα πρέπει να ακολουθεί και να εφαρμόζει βασικούς κανόνες ασφάλειας οι οποίοι διαφέρουν ανάλογα με την επικινδυνότητα του κάθε μικροοργανισμού δηλαδή ανάλογα με το πόσο παθογόνος είναι στον άνθρωπο και με την ύπαρξη ή όχι μεθόδων πρόληψης και θεραπείας.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί κατατάσσονται σε 4 ομάδες επικινδυνότητας.

- Η **Ομάδα 1** περιλαμβάνει τους μικροοργανισμούς που δεν είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο όπως τα φυτοπαθογόνα βακτήρια *Pseudomonas savastanoi* και *Clavibacter michiganensis*.
- Η **Ομάδα 2** περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που μπορούν να μολύνουν και να προκαλέσουν ασθένειες στους εργαζόμενους του εργαστηρίου Μικροβιολογίας. Όμως, οι μικροοργανισμοί αυτής της ομάδας δεν μεταδίδονται εύκολα στο υπόλοιπο κοινωνικό σύνολο ενώ υπάρχουν επίσης γνωστοί μέθοδοι πρόληψης και θεραπείας για τις ασθένειες που προκαλούν όπως το βακτήριο *Clostridium tetani*.
- Η **Ομάδα 3** περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που μπορούν να μολύνουν και να προκαλέσουν ασθένειες τόσο στους εργαζόμενους του εργαστηρίου Μικροβιολογίας όσο και στο υπόλοιπο κοινωνικό σύνολο. Υπάρχουν γνωστοί μέθοδοι πρόληψης και θεραπείας για τις ασθένειες που προκαλούν οι μικροοργανισμοί της ομάδας αυτής όπως τα βακτήρια του γένους *Rickettsia*.
- Αντίθετα, η **Ομάδα 4** περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που αποτελούν κίνδυνο για ολόκληρη την κοινωνία. Οι μικροοργανισμοί της ομάδας αυτής, κυρίως ιοί, προκαλούν σοβαρότατες ασθένειες για τις οποίες δεν υπάρχουν αποτελεσματικοί μέθοδοι πρόληψης και θεραπείας.

Ανάλογα με τον εξοπλισμό τους και τα μέτρα που λαμβάνουν κατά την εκτέλεση εργασιών με μικροοργανισμούς των ανωτέρω ομάδων, τα εργαστήρια Μικροβιολογίας διακρίνονται σε εργαστήρια με επίπεδο ασφάλειας 1 έως 4. Όμως, κάθε εργαστήριο Μικροβιολογίας πρέπει να τηρεί τουλάχιστον τους ακόλουθους κανόνες:

- Το εργαστήριο πρέπει να διαθέτει πλήρες σύστημα πλυσίματος και αποστείρωσης υλικών και μικροσυσκευών που χρησιμοποιούνται κατά την εκτέλεση των μικροβιολογικών εργασιών.
- Το εργαστήριο πρέπει να είναι πάντα καθαρό και εξοπλισμένο με κατάλληλα απολυμαντικά υλικά. Επίσης, το υλικό κατασκευής της επιφάνειας των πάγκων εργασίας πρέπει να είναι μη διαπερατό στο νερό και ταυτόχρονα ανθεκτικό σε οξέα, βάσεις και απολυμαντικά υλικά.
- Το φαγητό, το ποτό και το κάπνισμα απαγορεύονται αυστηρά μέσα στο εργαστήριο.
- Κατά τη διάρκεια των μικροβιολογικών εργασιών πρέπει να φοράμε εργαστηριακή μπλούζα και η πόρτα του εργαστηρίου πρέπει να είναι κλειστή.
- Πριν από την έναρξη καθώς και μετά το πέρας κάθε μικροβιολογικής εργασίας πρέπει να πλένουμε τα χέρια μας και να απολυμαίνουμε το πάγκο εργασίας.

- Απαγορεύεται αυστηρά η χρήση πιπετών με το στόμα.
- Κατά τη διάρκεια των μικροβιολογικών εργασιών πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία αερολυμάτων (aerosols).

Πλύσιμο – Αποστείρωση – Απολύμανση

Το πλύσιμο, η αποστείρωση και η απολύμανση θεωρούνται ως το άλφα και το ωμέγα για κάθε εργαστήριο Μικροβιολογίας.

Πλύσιμο : Συνίσταται λοιπόν το προσεκτικό πλύσιμο όλων των μικροσυσκευών και υλικών που χρησιμοποιούνται σε μικροβιολογικές εργασίες. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στα υάλινα σκεύη τα οποία είναι πιθανό να περιέχουν σπόρια βακτηρίων και γι' αυτό θα πρέπει να τοποθετούνται για αρκετές ώρες (συνήθως ολονύκτια παραμονή) σε διάλυμα 1% υδροχλωρικού οξέος. Ακολούθως τα υαλικά ξεπλένονται καλά με νερό βρύσης και μετά με απιονισμένο νερό.

Απολύμανση : Με τον όρο **απολύμανση** ορίζουμε την πλήρη καταστροφή μόνο των επικίνδυνων παθογόνων μικροοργανισμών. Η απολύμανση εφαρμόζεται για την απομάκρυνση μολυσματικών παθογόνων μικροοργανισμών από χώρους και υλικά που χρησιμοποιούνται σε μικροβιολογικές εργασίες. Θα πρέπει να τονιστεί ότι με την απολύμανση δεν καταστρέφονται τα σπόρια των μικροοργανισμών. Κατά την χημική απολύμανση γίνεται χρήση χημικών ουσιών οι οποίες όμως δεν είναι τόσο πτητικές όπως το οξείδιο του αιθυλενίου. Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως ως απολυμαντικά είναι οι φαινόλες, αλκοόλες, οξειδωτικές ενώσεις (το ιώδιο, το χλώριο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου), αλκυλιωτικές ενώσεις (φορμαλδεΰδη, γλουταραλδεΰδη, οξείδιο του αιθυλενίου), ιόντα βαρέων μετάλλων (άλατα υδραργύρου και χαλκού) και απορρυπαντικά.

Αποστείρωση : Με τον όρο **αποστείρωση** ενός αντικειμένου εννοούμε την πλήρη καταστροφή όλων των μορφών ζωής συμπεριλαμβανομένων και των спорίων των βακτηρίων και των μυκήτων. Η διαδικασία της αποστείρωσης γίνεται έτσι ώστε τα θρεπτικά και όλα τα άλλα μέσα του εργαστηριακού εξοπλισμού, που θα χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό ή για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μικροοργανισμών να μην έχουν κανένα ζωντανό κύτταρο ή βιώσιμο σπόριο. Υπάρχουν οι ακόλουθοι μέθοδοι με τις οποίες μπορούμε να επιτύχουμε αποστείρωση σε ένα εργαστήριο Μικροβιολογίας: Α) αποστείρωση με θερμότητα, Β) χημική αποστείρωση, Γ) αποστείρωση με διήθηση, Δ) αποστείρωση με ακτινοβολίες.

Α) Η αποστείρωση με θερμότητα αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο αποστείρωσης και συνιστάται σε κάθε περίπτωση εκτός αν υπάρχει πρόβλημα εφαρμογής υψηλών θερμοκρασιών. Η θερμότητα που εφαρμόζεται μπορεί να είναι ξηρή ή υγρή. Οι μηχανισμοί καταστροφής των

μικροοργανισμών με ξηρή ή υγρή θερμότητα είναι διαφορετικοί. Αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε ξηρή κατάσταση. Ο θάνατος με ξηρή θέρμανση πρωταρχικά οφείλεται σε οξειδωτικές διαδικασίες ενώ με υγρή θέρμανση στη μετουσίωση μικροβιακών πρωτεϊνών.

1) Η **υγρή θέρμανση** είναι περισσότερο αποτελεσματική από τη ξηρή θέρμανση και ταυτόχρονα δεν απαιτεί την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για την αποστείρωση θρεπτικών υλικών ενώ δεν ενδείκνυται για την αποστείρωση αδιάβροχων υλικών ή υλικών που είναι πολύ καλά κλεισμένα μέσα σε άλλα αντικείμενα. Η μέθοδος που συνήθως χρησιμοποιείται στα διάφορα μικροβιολογικά εργαστήρια είναι υδρατμοί με πίεση (αυτόκαυστο). Μέσα στο αυτόκαυστο δημιουργούνται υδρατμοί λόγω της θέρμανσης του νερού που περιέχει. Οι υδρατμοί έχουν πίεση μεγαλύτερη της ατμοσφαιρικής και συνεπώς μπορούν να έχουν θερμοκρασία μεγαλύτερη των 100°C . Όσο μεγαλύτερη είναι η πίεση τόσο μεγαλύτερη και η θερμοκρασία των υδρατμών. Η αποστείρωση με αυτόκαυστο κυρίως εφαρμόζεται με θέρμανση για 15 λεπτά στους 121°C που αντιστοιχεί σε πίεση 1,1 ατμοσφαιρών. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι ο ενδεδειγμένος χρόνος αποστείρωσης ποικίλει και εξαρτάται από το είδος και τον όγκο των διαφόρων αντικειμένων.



Σχήμα 3. Απλό αυτόκαυστο.

Η **παστερίωση** είναι μία μέθοδος υγρής θέρμανσης που την εφάρμοσε πρώτος ο Pasteur στη μύρα και το κρασί. Η μέθοδος συντελεί στην απαλλαγή των θερμοευαίσθητων υγρών από παθογόνους μικροοργανισμούς εφαρμόζοντας θερμοκρασίες χαμηλότερες των 100°C . Η παστερίωση συνήθως εφαρμόζεται με θέρμανση για 60 λεπτά στους 56°C ή για 10 λεπτά στους $65-70^{\circ}\text{C}$. Ουσιαστικά η παστερίωση είναι μία μέθοδος απολύμανσης αφού με τη διαδικασία αυτή δεν απομακρύνονται σπόρια βακτηρίων και μυκήτων.

Η **τμηματική αποστείρωση** ενός θρεπτικού υλικού (tyndallization) είναι μία μέθοδος που προτάθηκε από τον Tyndall το 1877. Με τη μέθοδο αυτή αποστειρώνεται το θρεπτικό μέσο σε

υγρό περιβάλλον υπό ατμοσφαιρική πίεση και στους 100°C για 30 λεπτά την ημέρα επί 3 διαδοχικές ημέρες. Με τον τρόπο αυτό όσα σπόρια επιβίωσαν από την πρώτη αποστείρωση, βλαστάνουν στο διάστημα των τριών ημερών και πεθαίνουν ως βλαστητικά πλέον κύτταρα με την επόμενη εφαρμογή των 100°C.

2) Η **ξηρή θέρμανση** μπορεί να χρησιμοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Η **πυράκτωση** (γυμνή φλόγα) εφαρμόζεται για την αποστείρωση μεταλλικών κυρίως αντικειμένων όπως βιολογικοί κρίκοι (κρικοφόροι στυλεοί), λαβίδες, βελόνες τα οποία χρησιμοποιούμε στις διάφορες μικροβιολογικές εργασίες. Η **ξηρή αποστείρωση** (ξηρός κλίβανος) χρησιμοποιείται για την αποστείρωση αντικειμένων στα οποία δεν μπορούν να διεισδύσουν οι υδρατμοί του αυτόκαυστου και τα οποία αντέχουν στις υψηλές θερμοκρασίες. Η ξηρή αποστείρωση επιτυγχάνεται με την εφαρμογή θερμοκρασίας 160-180°C επί μία ώρα τουλάχιστον. Η μέθοδος αυτή είναι ακατάλληλη για την αποστείρωση θρεπτικών υλικών καλλιέργειας μικροοργανισμών ενώ αντίθετα ενδείκνυται για την αποστείρωση μεταλλικών και γυάλινων αντικειμένων. Προϋποθέσεις για να έχουμε επιτυχημένη αποστείρωση με τη χρησιμοποίηση ξηρού κλιβάνου είναι: α) να έχουν πλυθεί και στεγνώσει καλά τα αντικείμενα, αφαιρώντας κάθε ξένη ουσία και ρύπο και β) θα πρέπει να υπάρχουν κενοί χώροι ανάμεσα στα αντικείμενα που έχουμε τοποθετήσει στον ξηρό κλίβανο, για να μπορεί έτσι να κυκλοφορεί ο θερμός αέρας.

Β) Η χημική αποστείρωση εφαρμόζεται όταν πρόκειται να αποστειρωθούν υλικά και αντικείμενα ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Στη χημική αποστείρωση χρησιμοποιούνται ενώσεις που είναι συγχρόνως πολύ πτητικές ώστε να απομακρύνονται μετά το τέλος της αποστείρωσης. Στη χημική αποστείρωση χρησιμοποιούνται κυρίως η φορμαλδεύδη και το οξείδιο του αιθυλενίου. Η φορμαλδεύδη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χαμηλής θερμοκρασίας υδρατμούς (στους 73°C) εξασφαλίζοντας την θανάτωση όλων των μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων και των σπορίων των βακτηρίων. Το οξείδιο του αιθυλενίου χρησιμοποιείται για την αποστείρωση ιατρικών εργαλείων τα οποία είναι ευαίσθητα στη θέρμανση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο παραπάνω ενώσεις είναι ιδιαίτερα τοξικές (το οξείδιο του αιθυλενίου είναι και εκρηκτικό) και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με ιδιαίτερη προσοχή.

Γ) Η αποστείρωση με διήθηση εφαρμόζεται σε υδάτινα διαλύματα τα οποία είναι ευαίσθητα στη θέρμανση. Η αποστείρωση επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων κυκλικών μεμβρανών (συχνά με ταυτόχρονη εφαρμογή πίεσης) διαφόρων μεγεθών. Οι μεμβράνες αυτές έχουν διάμετρο πόρου από 0,015 έως 12 μm . Μεμβράνες με διάμετρο πόρου 0,015 μm συγκρατούν τους ιούς ενώ με πόρους 0,10 μm όλα τα βακτήρια και τις ζύμες. Στα μικροβιολογικά εργαστήρια συνήθως χρησιμοποιούνται μεμβράνες με πόρους 0,22 μm . Φίλτρα με πόρους 0,45 μm

χρησιμοποιούνται για τον αποκλεισμό εντεροβακτηρίων από το πόσιμο νερό ενώ φίλτρα με πόρους 0,80 μm χρησιμοποιούνται για τον αποκλεισμό των βακτηρίων του αέρα όπου απαιτείται. Σε ειδικές περιπτώσεις, ο αέρας μπορεί να αποστειρωθεί με ταχεία διέλευσή του από ειδικά φίλτρα που είναι γνωστά ως φίλτρα HEPA (High Efficiency Particle Arresters = υψηλής απόδοσης δεσμευτές σωματιδίων).

Δ) Η αποστείρωση με ακτινοβολίες εφαρμόζεται σε υλικά που δεν αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες όπως διάφορα είδη πλαστικών που χρησιμοποιούνται σε μικροβιολογικές εργασίες (τριβλία, σύρριγγες). Η πλέον αποτελεσματική μέθοδος είναι η χρησιμοποίηση ιονίζουσας ακτινοβολίας (π.χ. ακτίνες γ) με την οποία επιτυγχάνεται η θανάτωση και των σπορίων των βακτηρίων. Το υψηλό κόστος αυτής της μεθόδου περιορίζει τη χρήση της μόνο σε βιομηχανίες. Στα μικροβιολογικά εργαστήρια εφαρμόζεται η υπεριώδης ακτινοβολία 250-260 nm η οποία θανατώνει τα κύτταρα των μικροοργανισμών αλλά δεν καταστρέφει αποτελεσματικά και τα σπόρια τους. Ένα ακόμα μειονέκτημα της υπεριώδους ακτινοβολίας είναι ότι λόγω της χαμηλής ενέργειας της έχει μικρή διεισδυτικότητα και για αυτό χρησιμοποιείται συνήθως ως αποστειρωτικός παράγοντας του αέρα και επίπεδων επιφανειών σε συνδυασμό συνήθως με χημικές μεθόδους απολύμανσης (καθαρισμός της επιφάνειας με αλκοόλη ή σαπούνι).

2^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

Εισαγωγή

Τα θρεπτικά υλικά περιέχουν τις κατάλληλες ενώσεις για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών. Οι ετερότροφοι οργανισμοί καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μια πηγή ενέργειας (ένα σάκχαρο), μια πηγή αζώτου, βιταμίνες και διάφορα ανόργανα άλατα. Οι αυτότροφοι οργανισμοί καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει κύρια ή αποκλειστικά ανόργανα άλατα ενώ τα αναερόβια βακτήρια καλλιεργούνται συνήθως σε αναγμένα θρεπτικά υλικά. Τα θρεπτικά υλικά πρέπει να είναι πάντα αποστειρωμένα και να έχουν το κατάλληλο pH. Στο εμπόριο κυκλοφορούν αρκετά τέτοια υλικά, υγρά (broth) και στερεά (agar), με τη μορφή σκόνης. Η σύνθεσή τους, η εκλεκτικότητα τους και ο τρόπος παρασκευής τους αναγράφεται στο κουτί που τα περιέχει. Με βάση τη σύνθεση τους, τα θρεπτικά υλικά διακρίνονται ως εξής: α) τα κοινά θρεπτικά υλικά στα οποία αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών, β) τα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά τα οποία περιέχουν αντιβιοτικά ή άλλες ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών, εκτός από το μικροοργανισμό που υποπευόμαστε και αναζητάμε και γ) τα διαχωριστικά ή διαφοροποιητικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση ενός μικροοργανισμού με βάση την εικόνα που βλέπουμε στην καλλιέργεια.

Αποστείρωση

Οι πιο κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση των θρεπτικών μέσων περιγράφηκαν στην Εργαστηριακή Άσκηση 1. Για τη δράση της θερμότητας ενάντια στους μικροοργανισμούς μεγάλη σημασία έχει η περιεκτικότητά τους σε νερό αφού αυτή καθορίζει τη θερμοκρασία στην οποία νεκρώνεται ένας μικροοργανισμός κυρίως εξαιτίας της μετουσίωσης των πρωτεϊνών του αλλά και εξαιτίας της αποικοδόμησης, με υδρόλυση ή οξείδωση, ουσιωδών κυτταρικών συστατικών. Η θερμότητα που εφαρμόζεται για αποστείρωση μπορεί να είναι ξηρή ή υγρή. Η αποστείρωση με υγρή θερμότητα είναι πιο αποτελεσματική από τη ξηρή αποστείρωση διότι η θανάτωση των μικροβίων είναι αποτέλεσμα κυρίως μετουσίωσης των πρωτεϊνών πράγμα που πετυχαίνεται εύκολα με την παρουσία νερού. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, έχουμε πλήρη αποστείρωση, με υγρή θερμότητα, ύστερα από θέρμανση στους 121° C για 15 λεπτά.

Η θερμοκρασία αυτή των υδρατμών αντιστοιχεί σε πίεση 15 lb/inch² ή 1,1 ατμόσφαιρες, θα πρέπει να τονισθεί ότι ο απλός βρασμός (100° C σε ατμοσφαιρική πίεση) δεν είναι ασφαλής μέθοδος αποστείρωσης αφού με αυτό δεν καταστρέφονται όλα τα βακτήρια και κύρια τα σπόρια τους.

Πίνακας 1. Συνθήκες που χρειάζονται για πλήρη αποστείρωση με υγρή θέρμανση

Χρόνος	Θερμοκρασία	Πίεση
min	°C	lb/inch ² atm
15	121	15 1,1
10	126	20 1.5
3	134	30 2,2

Η υγρή αποστείρωση με πίεση επιτυγχάνεται με μια συσκευή που μοιάζει με την μαγειρική χύτρα και που ονομάζεται αυτόκαυστο (Σχήμα 3). Μέσα στο αυτόκαυστο εισέρχονται υδρατμοί με πίεση ή οι υδρατμοί δημιουργούνται σ' αυτό ύστερα από βράσιμο του νερού που περιέχει. Πριν την έναρξη της αποστείρωσης και μετά την έναρξη του βρασμού πρέπει απαραίτητα να αφεθεί για λίγα λεπτά η βαλβίδα εξόδου ανοικτή για να εξέλθει ο ατμοσφαιρικός αέρας που αντικαθίσταται με τους υδρατμούς που δημιουργούνται. Όταν κλεισθεί η βαλβίδα εξόδου η θερμοκρασία και η πίεση των υδρατμών αυξάνονται μέχρι που ανοίγει αυτόματα η ρυθμιστική βαλβίδα (βαλβίδα που ρυθμίζεται ανάλογα με την επιθυμητή θερμοκρασία αποστείρωσης)· από την στιγμή αυτή χρονομετρείται η διάρκεια της αποστείρωσης.



Σχήμα 3. Απλό αυτόκαυστο.

Όργανα - Υλικά

- εκχύλισμα ζύμης
- πεπτόνη
- NaCl
- Αποσταγμένο νερό
- Φιάλες 250 ml με βιδωτό καπάκι
- Αποστειρωμένα τρυβλία
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Αυτόκαυστο
- Ζυγός
- Ογκομετρικοί σωλήνες 100 ml
- Αποστειρωμένες πιπέτες
- Κλίβανος επώασης 37⁰ C
- Μικροβιολογικοί κρίκοι
- Λύχνοι Bunsen
- Αποστειρωμένες πιπέτες, 1ml

Πειραματικό μέρος

A. Παρασκευή και αποστείρωση θρεπτικού μέσου

1) Υγρό θρεπτικό μέσο: Σε ένα μπουκάλι των 250ml με βιδωτό καπάκι προσθέσατε :

0.5g εκχύλισμα ζύμης

0.5g πεπτόνη

0.5g NaCl

Αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml

2) Στερεό θρεπτικό μέσο: Σε ένα μπουκάλι των 250ml με βιδωτό καπάκι προσθέσατε :

0.5g εκχύλισμα ζύμης

0.5g πεπτόνη

0.5g NaCl

1,5g άγαρ

Αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml

Σημειώστε το όνομα σας στα μπουκάλια και τοποθετήστε τα στο αυτόκαυστο για υγρή αποστείρωση. Το πάμα των μπουκαλιών πρέπει να είναι μισάνοιχτο έτσι ώστε να είναι δυνατή η αντικατάσταση του αέρα με υδρατμούς και συνεπώς να γίνει σωστή αποστείρωση. Όταν το

μπουκάλι με το αποστειρωμένο άγαρ σας επιστραφεί (προσοχή θα είναι πολύ ζεστό) αφήστε το στον πάγκο μέχρι να κρυώσει τόσο ώστε να μπορείτε άνετα να το πιάσετε με το χέρι (μη το ξεχάσετε στον πάγκο, να θυμάστε ότι το άγαρ πήζει στους 46° C). Για ταχύτερο κρύωμα τοποθετείστε το μπουκάλι με το άγαρ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55° C. Μοιράστε το περιεχόμενο του μπουκαλιού σε 6 τριβλία (περίπου 15 ml στο καθένα) με την εξής διαδικασία: ανοίξτε το μπουκάλι κοντά στη φλόγα, κρατείστε το πώμα από το μπουκάλι με το μικρό δάκτυλο του αριστερού χεριού σας, περάστε, με το δεξί χέρι, το λαιμό του μπουκαλιού στιγμιαία από τη φλόγα και μεταφέρετε 100 ml του θρεπτικού άγαρ σ' ένα αποστειρωμένο ογκομετρικό κύλινδρο που προηγούμενα έχει προθερμανθεί με τοποθέτηση του στο υδατόλουτρο των 55° C. Μη ξεχάσετε να κάψετε στιγμιαία το χείλος του ογκομετρικού κυλίνδρου πριν την προσθήκη του άγαρ. Το υπόλοιπο άγαρ (20 ml) τοποθετείται ξανά στο υδατόλουτρο αφού θα χρησιμοποιηθεί στο επόμενο κομμάτι της άσκησης.

Μισο-ανοίξτε το τριβλίο με το αριστερό χέρι (προσοχή, τα δάκτυλα έρχονται σε επαφή μόνο με απομακρυσμένες από το εσωτερικό του καλύμματος επιφάνειες), προσθέστε στο τριβλίο περίπου 10 ml του θρεπτικού άγαρ. Επανατοποθετείστε το κάλυμμα του τριβλίου στη θέση του, περάστε το χείλος του ογκομετρικού στιγμιαία από τη φλόγα και επαναλάβετε την ίδια διαδικασία για την προσθήκη άγαρ στα υπόλοιπα τριβλία. Εναλλακτικά η μεταφορά μπορεί να γίνει και με πιπέττα των 10 ml, αφού προηγουμένως σημειώσετε εξωτερικά το σημείο της πιπέττας που αντιστοιχεί σε 15 ml.

Όταν στερεοποιηθεί το περιεχόμενο τους, τα τριβλία τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο και στο εσωτερικό της πλαστικής σακούλας η οποία κλείνεται αεροστεγώς και αποθηκεύεται στο ψυγείο (4° C) μέχρι να χρησιμοποιηθούν τα τριβλία σε προσεχή πειράματα. Ένα από τα τριβλία τοποθετείται στον κλίβανο των 30° C για έλεγχο τυχούσας επιμόλυνσης.

Στην περίπτωση του στερεού θρεπτικού υποστρώματος, μετά την αποστείρωσή του, το υλικό μεταφέρεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C και κατόπιν μοιράζεται σε τρυβλία ή σωλήνες. Κατά τη διάρκεια του μοιράσματος δουλεύουμε κοντά σε αναμμένο λύχνο αποφεύγοντας έτσι τις επιμολύνσεις. Τα τρυβλία αφήνονται στον πάγκο εργασίας για να στερεοποιηθεί το στερεό θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια συσκευάζονται σε σακούλες το ένα πάνω από το άλλο και τοποθετούνται στο ψυγείο όπου μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Χρειάζεται να παρασκευάσετε 500ml στερεού θρεπτικού υλικού. Πόση ποσότητα από κάθε συστατικό πρέπει να ζυγιστεί; Πόσο νερό χρειάζεται; Περιγράψτε τη διαδικασία εργασίας.
2. Ποια από τα συστατικά που χρησιμοποιήσατε για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών δεν αποτελεί θρεπτικό συστατικό για τους μικροοργανισμούς;
3. Ποια η σημασία του ποιοτικού έλεγχου κατά την παρασκευή των θρεπτικών συστατικών;

3^η Εργαστηριακή Άσκηση

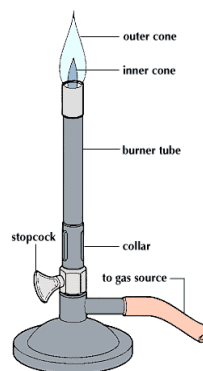
ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού στο περιβάλλον και για αυτόν το λόγο θα πρέπει να λαμβάνονται όλα τα κατάλληλα μέτρα ώστε να αποφεύγονται μη επιθυμητές επιμολύνσεις. Ο λύχνος Bunsen θεωρείται ως ένα απαραίτητο εργαλείο για τη δημιουργία ενός στοιχειωδώς αποστειρωμένου περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια μικροβιολογικών εργασιών.

Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

- Κλίβανος επώασης 37° C
- Τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό
- Μικροβιολογικοί κρίκοι
- Λύχνοι Bunsen
- Αποστειρωμένες πιπέτες, 1ml



Πειραματική Διαδικασία

A. Ασηπτική χρήση πιπετών

Για την ασηπτική μεταφορά υγρών με πιπέτα από ένα δοκιμαστικό σωλήνα σε έναν άλλο ακολουθήσατε την εξής διαδικασία:

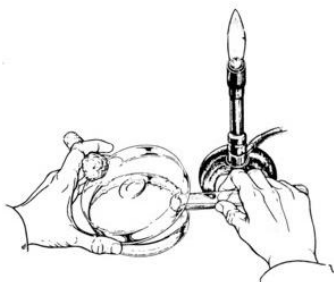
1. Τοποθετήσατε την αποστειρωμένη πιπέτα κοντά στον αναμμένο λύχνο Bunsen.
2. Αφαιρέσατε με προσοχή το περιτύλιγμα της πιπέτας και περάστε το κάτω μέρος της στιγμιαία πάνω από τη φλόγα του λύχνου.
3. Κρατήστε στο αριστερό σας χέρι το δοκιμαστικό σωλήνα με το αποστειρωμένο νερό, αφαιρέσατε το πώμα του με το μικρό δάκτυλο του δεξιού χεριού και περάστε το ανοικτό του άκρο στιγμιαία πάνω από τη φλόγα του λύχνου.
4. Αναρροφήσατε 1ml αποστειρωμένο νερό και αμέσως μετά τοποθετήσατε το πώμα από το δεξί σας δάκτυλο πίσω στο δοκιμαστικό σωλήνα με το αποστειρωμένο νερό.
5. Στη συνέχεια, κρατήστε στο αριστερό σας χέρι το δοκιμαστικό σωλήνα με το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό, αφαιρέσατε το πώμα του με το μικρό δάκτυλο του δεξιού χεριού, περάστε το

ανοικτό του άκρο στιγμιαία πάνω από τη φλόγα του λύχνου, αδειάστε το περιεχόμενο της πιπέτας στο σωλήνα και τοποθετήσατε το πώμα από το δεξί σας δάκτυλο πίσω στο δοκιμαστικό σωλήνα με το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. Αμέσως μετά, τοποθετήσατε τη χρησιμοποιημένη πιπέτα στο δοχείο με το απολυμαντικό υγρό.

6. Ο δοκιμαστικός σωλήνας με το θρεπτικό υλικό τοποθετείται σε κλίβανο επώασης 37⁰C για μερικές ημέρες και ελέγχεται περιοδικά για την ανάπτυξη ή όχι μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα επωάζεται και δοκιμαστικός σωλήνας ο οποίος έχει μολυνθεί με μικροοργανισμούς και χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας.

B. Ασηπτική χρήση μικροβιολογικού κρίκου

Επαναλάβετε που ακολουθήσατε για την ασηπτική μεταφορά υγρών με πιπέτα με τη μόνη διαφορά ότι η μεταφορά θα γίνει τώρα με το μικροβιολογικό κρίκο. Ο μικροβιολογικός κρίκος είναι ουσιαστικά ένα μικρό κυκλικό κομμάτι μεταλλικού σύρματος (νικελοχρωμίου) το οποίο είναι αφενός ανθεκτικό στην πυράκτωση και αφετέρου ψύχεται γρήγορα μετά την πυράκτωση του. Συνοπτικά, η διαδικασία που θα ακολουθηθεί είναι η εξής: πυράκτωση του κρίκου στη φλόγα του λύχνου, ψύξη του κρίκου για λίγα δευτερόλεπτα κοντά όμως στη φλόγα, εμφύσηση του κρίκου στο δοκιμαστικό σωλήνα με το αποστειρωμένο νερό και στη συνέχεια εμφύσηση του στο δοκιμαστικό σωλήνα με το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. Ο δοκιμαστικός σωλήνας με το θρεπτικό υλικό τοποθετείται σε κλίβανο επώασης 37⁰C για μερικές ημέρες και ελέγχεται περιοδικά για την ανάπτυξη ή όχι μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα επωάζεται και δοκιμαστικός σωλήνας ο οποίος έχει μολυνθεί με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου με μικροοργανισμούς και χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας.



Σχήμα 1.



Σχήμα 2.

Γ. Ασηπτική μεταφορά υγρών

Με τον ίδιο τρόπο γίνεται ουσιαστικά και η ασηπτική μεταφορά υγρών από ένα σωλήνα, φιάλη, δοχείο ή μπουκάλι. Αφού ανοιχθεί το δοχείο με το υγρό, περνάμε το λαιμό της φιάλης στιγμιαία πάνω από τη φλόγα του λύχνου και μετά προχωράμε στη μεταφορά του υγρού.

Δ. Επίστρωση τριβλίων με μικροβιολογικό κρίκο.

Με την τεχνική αυτήν πετυχαίνεται η απομόνωση αποικιών από μια καλλιέργεια μικροβίων. Στην αρχή της επίστρωσης οι μικροοργανισμοί είναι τόσο κοντά ο ένας στον άλλο έτσι ώστε να μη δίνουν ξεχωριστές αποικίες όταν αναπτυχθούν, καθώς όμως η επίστρωση προχωρεί, όλο και λιγότεροι μικροοργανισμοί απομένουν στο σύρμα του νικελοχρωμίου και γι' αυτό οι μικροοργανισμοί που επιστρώνονται στην επιφάνεια του άγαρ είναι όλο και λιγότεροι και συνεπώς πιο απομακρυσμένοι μεταξύ τους. Οι μικροοργανισμοί όταν πολλαπλασιασθούν δίνουν ξεχωριστές αποικίες.

Οι μικροοργανισμοί μιας καλλιέργειας επιστρώνονται στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού άγαρ που περιέχεται σε ένα τριβλίο με την ακόλουθη πορεία:

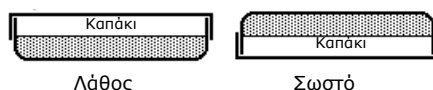
1. Στο χώρο της δουλειάς σας θα πρέπει να έχετε, εκτός από το λυχνάρι bunsen και τον κρίκο, την καλλιέργεια που θα επιστρώσετε και τριβλίο με στερεό θρεπτικό άγαρ.

2. Αποστειρώστε το νικελοχρώμιο και αφού ανοίξετε με τη γνωστή πια διαδικασία την καλλιέργεια, βουτήξτε το στο υγρό της καλλιέργειας.

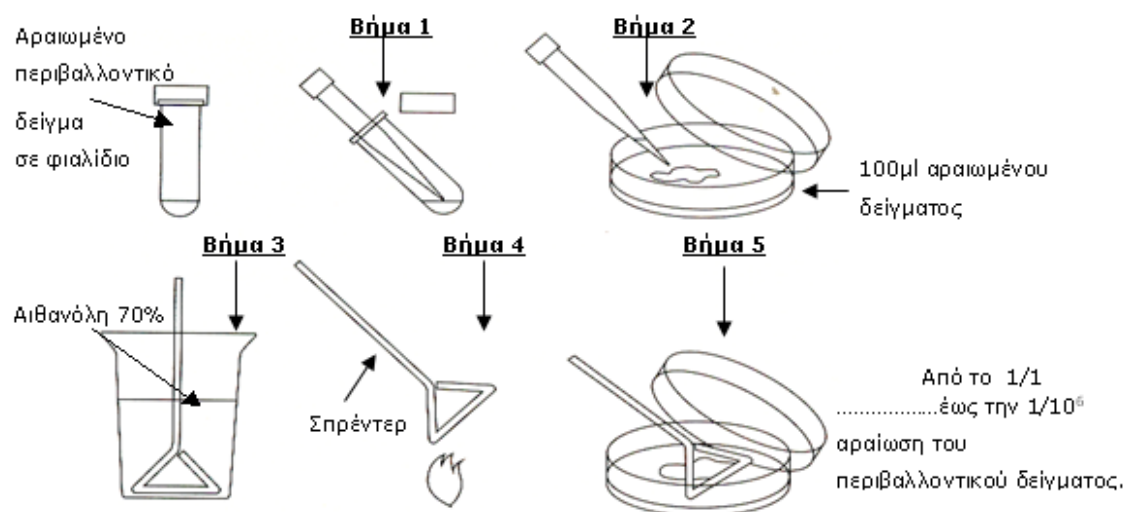
3. Με το αριστερό χέρι υψώστε λίγο το καπάκι του τριβλίου με το άγαρ και ξεκινώντας από το πιο απομακρυσμένο, από σας, σημείο της περιφέρειας της πλάκας (σημειώστε το, εξωτερικά, με το μαρκαδόρο), επιστρώστε το υλικό όπως δείχνει το σχήμα 2.

Όταν φθάσει η επίστρωση στο κέντρο του τριβλίου, στρίψτε το τριβλίο κατά 180° και συνεχίστε την ίδια κίνηση απομακρυνόμενοι από το σημείο που βρίσκεται (η περιστροφή του τριβλίου είναι απαραίτητη διότι διαφορετικά το χείλος του τριβλίου παρεμποδίζει την επίστρωση αφού δεν είναι δυνατό το κράτημα του νικελοχρωμίου με σταθερή γωνία).

4. Αφού τοποθετηθεί το καπάκι τα τριβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε κλίβανο επώασης (συνήθως 37° C) μέχρι την επόμενη άσκηση.



Σχήμα 3. Η σωστή τοποθέτηση του τριβλίου είναι πάντα με το καπάκι προς τα κάτω.



Σχήμα 4. Επιστρώσεις από αραιώσεις περιβαλλοντικού δείγματος.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Πώς διακρίνεται η ανάπτυξη των βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό υλικό και πως σε στερεό;
2. Πότε χρησιμοποιούμε επίστρωση τρυβλίου με τον βαμβakoφόρο στυλεό και πότε με τον μικροβιολογικό κρίκο;
3. Περιγράψτε τα δυο τρυβλία που τοποθετήθηκαν ανοιχτά εσωτερικά και εξωτερικά του εργαστηρίου. Δώστε μια εξήγηση για τις διαφορές που παρατηρείτε.

Βιβλιογραφία

1. Κολλιάς, Σ. (1996). Πρακτική Μικροβιολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
2. Κολλιάς, Σ. (1992). Ασκήσεις Μικροβιολογίας. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
3. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών (1998). Ασκήσεις Γενικής και Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Πάτρα.

4^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανάπτυξης μιας καλλιέργειας:

- Με Μικροσκοπία π.χ. είναι δυνατόν να μετρηθεί ο αριθμός των μικροοργανισμών σ' ένα δείγμα γνωστού όγκου.
- Με φωτομετρία μπορεί να υπολογισθεί η πυκνότητα των βακτηρίων σε μια καλλιέργεια αφού όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των βακτηρίων που περιέχεται σ' ένα θρεπτικό μέσο τόσο μεγαλύτερη η θολότητα της καλλιέργειας και μικρότερη η ποσότητα του φωτός που φτάνει στο φωτοευαίσθητο κύτταρο του φωτόμετρου.
- Η μάζα των κυττάρων, όπως εκφράζεται από το ξηρό βάρος των βακτηρίων, αποτελεί μια άλλη μέθοδο για τη μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης.
- Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε με μέτρηση ορισμένων προϊόντων των βακτηρίων όπως π.χ. συσσώρευση οξέος ή αλκάλεως.

Οι μέθοδοι αυτές ποικίλουν και η ακρίβεια τους εξαρτάται από τους μικροοργανισμούς στους οποίους εφαρμόζονται. Ακολουθεί περιγραφή της κλασικότερης μεθόδου που βρίσκει εφαρμογή στα πιο πολλά βακτήρια και που ποσοτικοποιεί μόνο τα κύτταρα που είναι ικανά να δώσουν αποικίες.

Επειδή κάθε ζωντανό κύτταρο σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης δίνει μια αποικία θυγατρικών κυττάρων, που είναι ορατή με γυμνό μάτι, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η ιδιότητα αυτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων που βρίσκονται σ' ένα δείγμα. Για να εφαρμοσθεί η μέθοδος αυτή με επιτυχία θα πρέπει να ληφθεί πρόνοια έτσι ώστε ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται σ' ένα τριβλίο να είναι προσιτός σε αρίθμηση· αυτό πετυχαίνεται με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος πριν την επίστρωση του σε τριβλία με άγαρ. Ο υπολογισμός του αριθμού των βακτηρίων στο αρχικό δείγμα γίνεται αν πολλαπλασιασθεί ο αριθμός των αποικιών που μετρίεται για μια συγκεκριμένη αραιώση του δείγματος επί το συντελεστή της αραιώσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται συνήθως ανά κ. εκ. (ml) της αρχικής καλλιέργειας, γι' αυτό και θα πρέπει ο αριθμός που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό του αριθμού αποικιών επί το συντελεστή της αραιώσης να διαιρεθεί δια του όγκου (ml) του αρχικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

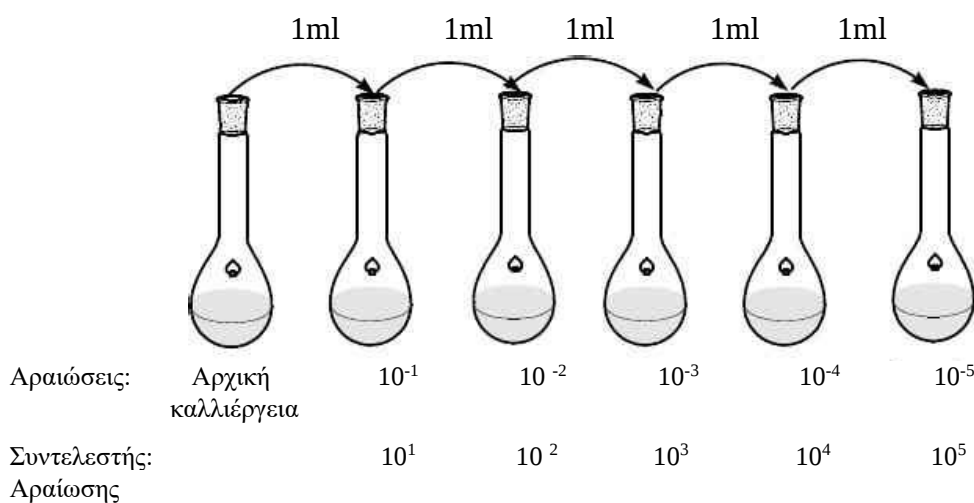
- Αποστειρωμένο νερό
- Σωλήνες για αραιώσεις (5 για κάθε τριάδα)
- Σωλήνες με αιώρημα δείγματος εδάφους
- Τριβλία με άγαρ (5 για κάθε τριάδα)
- Τριβλία αποστειρωμένα
- Αποστειρωμένες πιπέτες
- Θάλαμος επώασης 37° C

Πειραματική διαδικασία

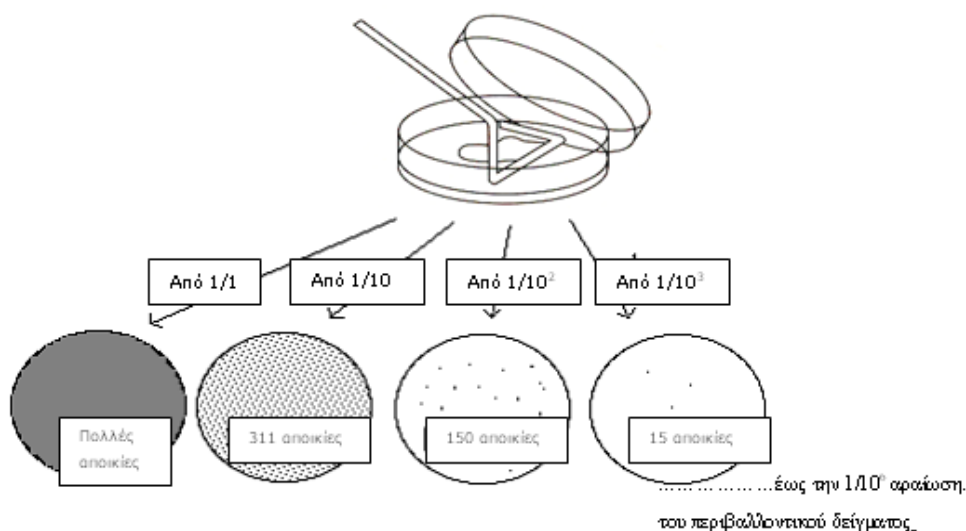
A. Επίστρωση

1. Προσθέστε ασηπτικά με πιπέτα 1 ml αποστειρωμένου νερού σε καθένα από 5 αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες (χρησιμοποιείτε την ίδια πιπέτα αλλά περνάτε την κάθε φορά από τη φλόγα).

2. Προσθέστε με πιπέτα 0,1 ml του δείγματος εδάφους (αιώρημα κόκκων εδάφους σε νερό). Αναμίξτε το περιεχόμενο καλά με κτύπημα του σωλήνα με το δάκτυλο σας (Σχήμα 6). Με καινούργια πιπέτα μεταφέρετε 0,1 ml από τον σωλήνα 1 στο σωλήνα 2. Πάντα με καινούργια πιπέτα επαναλάβετε την ίδια πορεία από σωλήνα 2 στο σωλήνα 3, από σωλήνα 3 στον 4 και από τον 4 στο σωλήνα 5. Στο σωλήνα 5 το αρχικό δείγμα έχει αραιωθεί 100.000 φορές.



3. Σε 5 τριβλία με θρεπτικό άγαρ (της άσκησης 2) που είναι αριθμημένα 1 μέχρι 5 προσθέστε με πιπέττα 0,1 ml από το περιεχόμενο του αντίστοιχου σωλήνα. Αρχίστε από το σωλήνα 5 και το τριβλίο 5 και με την ίδια πιπέττα προχωρήστε μέχρι το τριβλίο 1. Το δείγμα προστίθεται σ' ένα σημείο της περιφέρειας στο τριβλίο, ακολουθεί άπλωμα με το βιολογικό κρίκο και μεταφορά στον επωαστικό θάλαμο όπου επωάζονται ανάποδα στους 37° C μέχρι την επόμενη άσκηση.



Σχήμα. Αραιά αναπτυγμένοι βακτηριακοί πληθυσμοί σε επιστρώσεις που αντιστοιχούν σε διαφορετικές αραιώσεις περιβαλλοντικού δείγματος

4. Μετρείστε τις αποικίες που σχηματίζονται μετά από 2-3 μέρες και υπολογίστε τον αριθμό βακτηρίων που υπάρχει σε κάθε ml (cfu/ml) του αρχικού δείγματος.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια η όλη άσκηση θα μπορούσε να γίνει με διπλά τριβλία και στους υπολογισμούς να ληφθεί ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών για τη συγκεκριμένη αραιώση.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Γιατί ο όγκος του δείγματος που εμβολιάζεται είναι καθορισμένος;
2. Τι σημαίνει το cfu/ml;
3. Σημειώστε αναλυτικά τον τρόπο παρασκευής όλων των αραιώσεων που χρησιμοποιήσατε. (υπολογισμοί και όγκοι από κάθε διάλυμα)
4. Μετρήστε τις αποικίες που σχηματίζονται στο τριβλίο μετά από 2-3 μέρες επώασης στους 37 ° C και υπολογίστε τον αριθμό βακτηρίων που υπάρχει σε κάθε ml (cfu/ml) του αρχικού δείγματος.

Βιβλιογραφία

1. Κολλιάς, Σ. (1996). Πρακτική Μικροβιολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
2. Κολλιάς, Σ. (1992). Ασκήσεις Μικροβιολογίας. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
3. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών (1998). Ασκήσεις Γενικής και Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Πάτρα.

Εργαστηριακή Άσκηση 5

ΚΑΘΑΡΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΥΓΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Όλα τα κύτταρα μίας αποικίας μικροοργανισμών που σχηματίζεται σε στερεό θρεπτικό μέσο (ύστερα από επίστρωση ή έκχυση σε πλάκες) προέρχονται από τις διαδοχικές διαιρέσεις ενός κυττάρου γι' αυτό και είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους. Αν όλα ή μέρος των κυττάρων μιας αποικίας μεταφερθούν σε κατάλληλα αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο η καλλιέργεια που προκύπτει είναι **καθαρή**, αποτελείται δηλαδή από ένα μόνο είδος μικροοργανισμών.

Με την άσκηση αυτή θα αναπτύξετε καθαρές καλλιέργειες από αποικίες που δημιουργήσατε με προηγούμενες ασκήσεις. Οι καλλιέργειες αυτές θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την εκτίμηση της βακτηριακής ανάπτυξης και την επίδραση διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων.

Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

- Τριβλία με ξεχωριστές αποικίες μικροοργανισμού
- Φιάλες με θρεπτικό υλικό
- Μικροβιολογικοί κρίκοι
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Θάλαμος επώασης 37° C
- Λουτρό πάγου

Πειραματική διαδικασία

A. Παραγωγή καθαρών καλλιεργειών σε αιώρημα.

Στα τριβλία που περιέχουν μεγάλες ξεχωριστές αποικίες (τριβλία με επίστρωση ή έκχυση κατά πλάκες) σημαδέψτε με το μαρκαδόρο το σημείο της εξωτερικής επιφάνειας του τριβλίου που αντιστοιχεί στην κάθε αποικία από την οποία επιδιώκεται η ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας.

Αφού ανυψώσετε το κάλυμμα του τριβλίου μόνο όσο είναι απαραίτητο, ακουμπείτε την αποικία με το σύρμα ενός αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου και μεταφέρετε μέρος της

αποικίας άσηπτα σε φιάλες που περιέχουν θρεπτικό ζωμό. Οι φιάλες που μολύνθηκαν με τις αποικίες αφού αριθμηθούν επωάζονται, στους 30° C, μέχρι το επόμενο εργαστήριο.

B. Καμπύλη ανάπτυξης καθαρής καλλιέργειας.

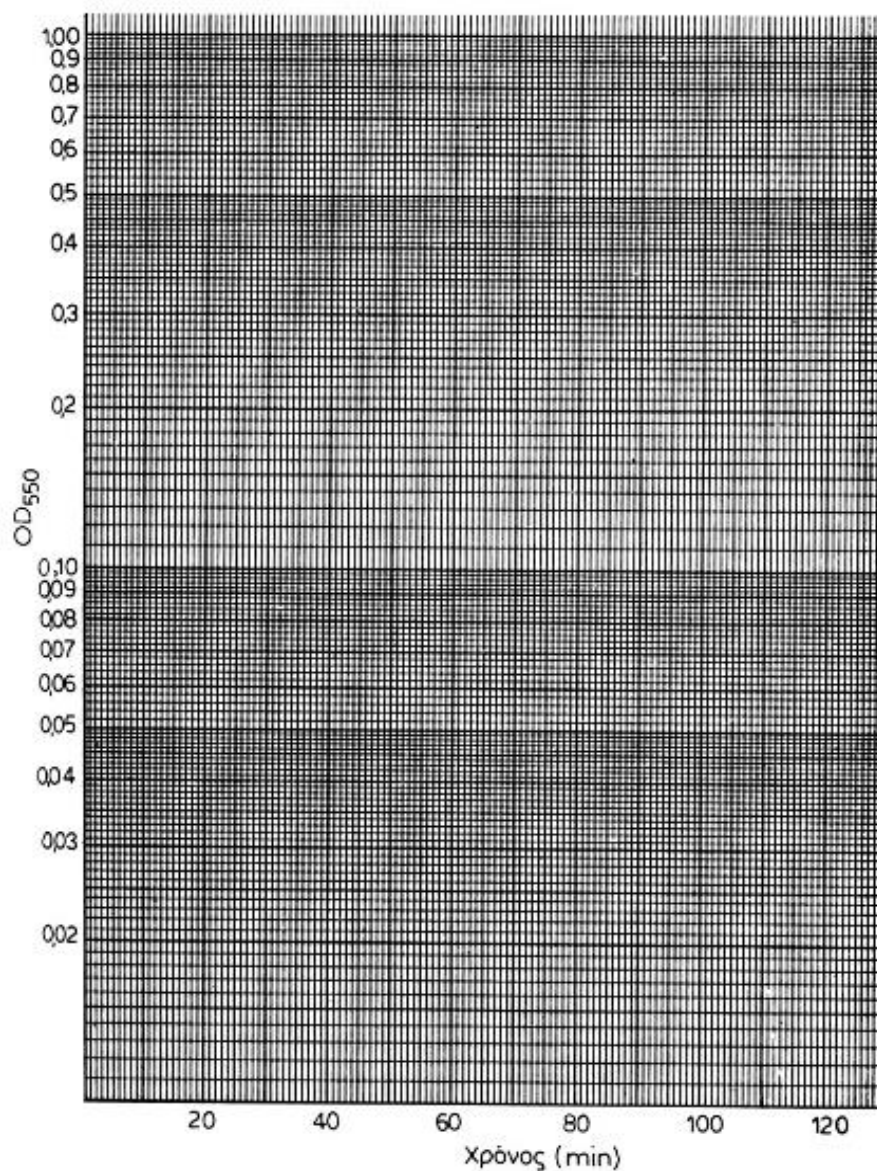
Από μια καθαρή καλλιέργεια η οποία έχει αφεθεί να κρυνώσει (θερμοκρασία δωματίου) παίρνουμε 20 ml και αφού υπολογίσουμε την οπτική απορρόφηση, σε μήκος κύματος 550 nm (OD₅₅₀), αραιώνουμε την καλλιέργεια με θρεπτικό ζωμό έτσι ώστε να έχουμε OD₅₅₀ μεταξύ 0,02 και 0,05. Η σχέση συγκέντρωσης βακτηρίου - OD₅₅₀ στο κατώτερο μέρος της φωτομετρικής κλίμακας είναι γραμμική γι' αυτό και η επιθυμητή OD₅₅₀ λαμβάνεται ύστερα από ανάλογες αραιώσεις. Ακολουθεί επώαση στους 30° C με αντίστοιχη καταγραφή του χρόνου. Από κάθε ομάδα δύο φοιτητών, ο ένας θα πάρει δείγματα στα 15, 30, 50, 70 και 90 min, και ο άλλος θα μετρά την OD₅₅₀.

Ο πρώτος φοιτητής θα βάλει σε γραφική παράσταση τα αποτελέσματα σε ημιλογαριθμικό χαρτί έτσι ώστε ο δεύτερος φοιτητής να μπορεί να ελέγξει ότι οι χρόνοι που παίρνει τα δείγματα βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Ο δεύτερος φοιτητής θα προσδιορίσει τον αριθμό ζωντανών βακτηρίων με διαδοχικές αραιώσεις όπως περιγράφονται στην προηγούμενη άσκηση. Να υπολογίσετε τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης και το μέσο χρόνο γενιάς. Υπολογίστε πόσα βακτήρια αντιστοιχούν στη μονάδα του OD₅₅₀.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Να κατασκευάσετε την καμπύλη ανάπτυξης της καθαρής καλλιέργειας που σας δόθηκε.
2. Να υπολογίσετε τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης.
3. Να υπολογίσετε το χρόνο γενιάς.



Βιβλιογραφία

1. Κολλιάς, Σ. (1996). Πρακτική Μικροβιολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
2. Κολλιάς, Σ. (1992). Ασκήσεις Μικροβιολογίας. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
3. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών (1998). Ασκήσεις Γενικής και Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Πάτρα.
4. Αρσένη, Α. (1982). Μικροβιολογία: θεωρία – πράξη. Αθήνα.
5. Αρσένη, Α. (1982). Καλλιέργειες Μικροβίων. Αθήνα

Εργαστηριακή Άσκηση 6

ΧΡΩΣΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Εισαγωγή

Η χρώση κατά Gram θεωρείται απαραίτητη για την αρχική ταξινόμηση των βακτηρίων και συνεπώς χρησιμοποιείται ευρέως στη Βακτηριολογία. Με βάση τη μέθοδο Gram, τα βακτήρια διακρίνονται σε Gram θετικά και σε Gram αρνητικά. Για τη χρώση κατά Gram απαιτούνται τα ακόλουθα: α) μια βασική χρωστική (διάλυμα οξαλικού αμμωνίου – κρυσταλλικού ιώδους) με την οποία χρωματίζονται όλα τα βακτήρια, β) ένα στερεωτικό χρώσης (διάλυμα Lugol – ιωδίου) με το οποίο αυξάνει η συγγένεια μεταξύ των κυττάρων και της χρωστικής, γ) ένας αποχρωστικός παράγοντας (95% αλκοόλη ή ακετόνη) ο οποίος αποχρωματίζει μόνο τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια και δ) μια δεύτερη βασική χρωστική (counter stain = αντιχρωστική) (διάλυμα σαφρανίνης) η οποία χρωματίζει τα αποχρωματισμένα βακτήρια, δηλαδή τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, με ένα χρώμα διαφορετικό από εκείνο που προσδίδει η πρώτη βασική χρωστική. Με τη μέθοδο αυτή, τα κατά Gram θετικά βακτήρια χρωματίζονται με ένα γαλάζιο ή ιώδες χρώμα (το χρώμα της πρώτης χρωστικής) ενώ τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια χρωματίζονται με ένα κόκκινο χρώμα (το χρώμα της δεύτερης χρωστικής). Η διαφορετική συμπεριφορά των βακτηρίων στη χρώση κατά Gram οφείλεται σε διαφορές στη δομή των κυτταρικών τους τοιχωμάτων.

Πειραματικό μέρος

Όργανα - Υλικά

- Μικροσκόπιο
- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Λαβίδες
- Μικροβιολογικοί κρίκοι
- Λύχνοι Bunsen
- Κεδρέλαιο
- Απορροφητικό ή διηθητικό χαρτί
- Υδροβολείς

Χρωστικά διαλύματα

- Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου - κρυσταλλικού ιώδους
- Διάλυμα Lugol - ιωδίου
- 95% Αλκοόλη
- Διάλυμα σαφρανίνης

Παρασκευή χρωστικών διαλυμάτων

Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου - κρυσταλλικού ιώδους

A. Διαλύουμε 2 gr κρυσταλλικού ιώδους σε 20 ml 95% αλκοόλη

B. Διαλύουμε 0,8 gr οξαλικού αμμωνίου σε 80 ml αποσταγμένο νερό

Αναμιγνύουμε το διάλυμα A με το διάλυμα B. Το διάλυμα που προκύπτει φιλτράρεται (με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού) και φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη.

Διάλυμα Lugol - ιωδίου

Αναμιγνύουμε 1 gr ιωδίου με 2 gr ιωδιούχου καλίου σε 100 ml αποσταγμένο νερό.

Διάλυμα αποχρωματισμού

95% αλκοόλη (για βραδύ αποχρωματισμό) ή ακετόνη (για ταχύτατο αποχρωματισμό).

Διάλυμα σαφρανίνης

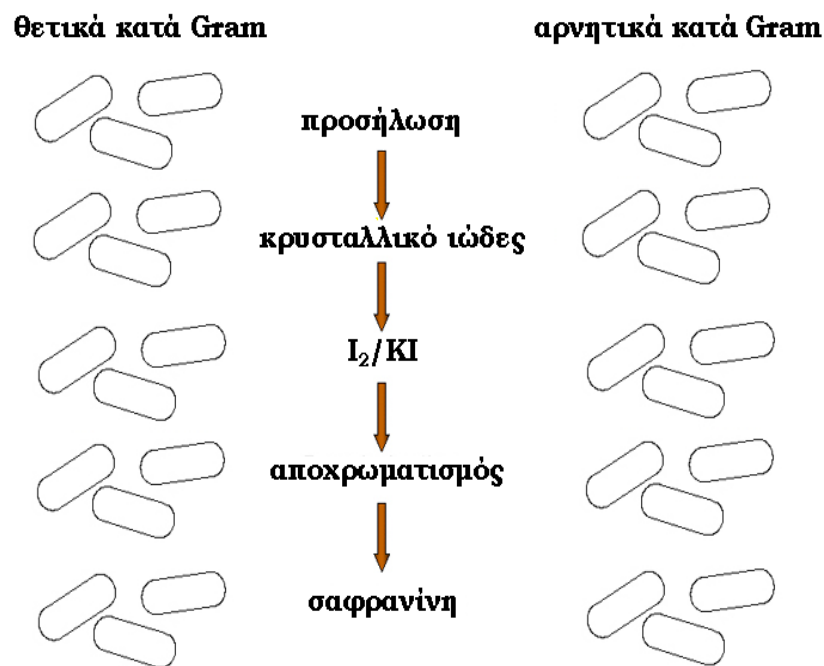
Φτιάχνουμε ένα μητρικό διάλυμα διαλύοντας 2,5 gr σαφρανίνης σε 100ml 95% αλκοόλη. Το διάλυμα εργασίας περιέχει 10 ml από το μητρικό διάλυμα αραιωμένο μέχρι 100 ml με αποσταγμένο νερό.

Πειραματική διαδικασία

1. Τοποθετούμε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μια μικρή σταγόνα από το μικροβιακό μας εναιώρημα.
2. Περνάμε προσεκτικά την αντικειμενοφόρο πάνω από τη φλόγα του λύχνου Bunsen έως ότου απομακρυνθεί η περίσσεια του υδάτινου διαλύματος και σχηματισθεί ένα στρώμα μονιμοποιημένων βακτηριακών κυττάρων πάνω στην αντικειμενοφόρο.
3. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα χρωματίζονται με διάλυμα οξαλικού αμμωνίου - κρυσταλλικού ιώδους για ένα λεπτό.
4. Ακολουθεί ξέπλυμα με νερό και επώαση των κυττάρων με διάλυμα Lugol-ιωδίου για ένα λεπτό.
5. Στη συνέχεια ξεπλένουμε με νερό και προσθέτουμε αιθυλική αλκοόλη 95% για 30 περίπου δευτερόλεπτα.
6. Ακολουθεί ξέπλυμα με άφθονο νερό και επώαση των κυττάρων με διάλυμα σαφρανίνης για χρόνο 20 –30 δευτερόλεπτα.
7. Στη συνέχεια ξεπλένουμε με νερό και στεγνώνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με διηθητικό χαρτί.
8. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση του μικροβιακού δείγματος. Αν τα μικρόβια που μελετάμε είναι Gram θετικά, τότε χρωματίζονται μπλε – μωβ. Αντίθετα αν το χρώμα τους είναι κόκκινο τότε είναι Gram αρνητικά. Ενδεικτικά, στα Gram θετικά βακτήρια περιλαμβάνονται οι σταφυλόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι ενώ στα Gram αρνητικά ανήκουν τα εντεροβακτήρια και οι ψευδομονάδες.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Παρατηρώντας το παρασκεύασμα που ετοιμάσατε χρησιμοποιώντας την αρχική άγνωστη καλλιέργεια, σημειώστε αν το βακτήριο είναι Gram θετικό ή Gram αρνητικό.
2. Χρωματίστε τα κύτταρα στην εικόνα που ακολουθεί με τα χρώματα που πιστεύετε ότι αυτά λαμβάνουν κατά τα διάφορα στάδια της χρώσης Gram.



Βιβλιογραφία

1. Κολλιάς, Σ. (1996). Πρακτική Μικροβιολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
2. Κολλιάς, Σ. (1992). Ασκήσεις Μικροβιολογίας. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
3. Αρσένη, Α. (1982). Μικροβιολογία: θεωρία – πράξη. Αθήνα.
4. Αρσένη, Α. (1982). Καλλιέργειες Μικροβίων. Αθήνα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Α. Συσκευές αποστείρωσης



Εικόνα 1. Αυτόκαυστο



Εικόνα 2. Κλίβανος αποστείρωσης
ξηρής θερμότητας.

Β. Συσκευές επώασης



Εικόνα 3. Επωαστήρας ανάδευσης με σταθερή θερμοκρασία μέσω αέρα (shaking incubator)



Εικόνα 4. Θάλαμος επώασης σταθερής θερμοκρασίας (incubator) για καλλιέργειες πάνω σε στερεά μέσα.

Γ. Άλλες συσκευές – όργανα



Εικόνα 5. Ζυγός ακριβείας



Εικόνα 6. Αναδευτήρας σωληναρίων (Vortex mixer)

Δ. Σκεύη και αναλώσιμα εργαστηρίου μικροβιολογίας



Τρυβλία



Γυάλινες
κωνικές φιάλες



Δοκιμαστικοί
σωλήνες



Κυψελίδες



Βαμβακοφόρος
στυλεός



Μικροβιολογικός
κρίκος



Γυάλινη ράβδος για
επίστρωση



Πλαστική πιπέτα
pasteur