ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟ ΛΥΚΕΙΟ

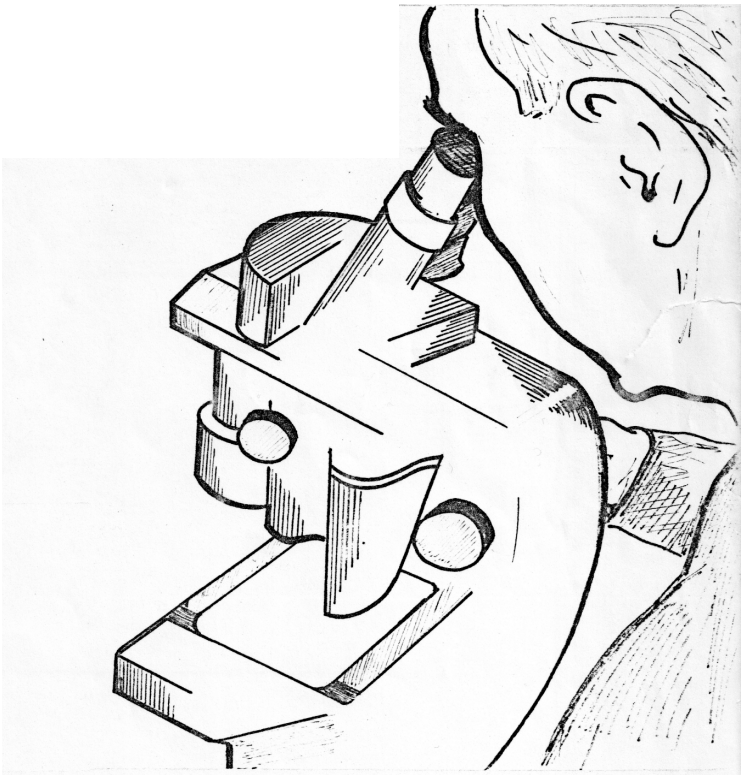
ΤΑΞΗ Β΄

(Βοηθών ιατρικών και βιολογικών εργαστηρίων)

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ Ι

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

(ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ)



Παραδόσεις του καθηγητή

Γ. Λ. ΘΕΟΔΩΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ
Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων
Επιμέλεια – Επεξεργασία: Γ. Παντάκης

ΑΘΗΝΑ 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Θρεπτικά υλικά 3
Άσκηση 1. **Συγκέντρωση και διάλυση ουσιών για την παρασκευή θρεπτικού ζωμού** 5
Άσκηση 2. **Διαύγαση και διόρθωση pH θρεπτικού άγαρ** 6
Άσκηση 3. **Αποστείρωση θρεπτικού άγαρ** 7
Άσκηση 4. **Διανομή θρεπτικού άγαρ σε τρυβλία** 8
Άσκηση 5. **Διανομή θρεπτικού άγαρ σε σωληνάρια** 8
Άσκηση 6. **Διανομή θρεπτικού ζωμού σε σωληνάρια** 9
Άσκηση 7. **Έλεγχος στειρότητας και συντήρηση θρεπτικών υλικών** 9
Άσκηση 8. **Παρασκευή θρεπτικού υλικού CHAPMAN (υλικά για σταφυλόκοκκους)** 10
Άσκηση 9. **Παρασκευή αιματούχου και σοκολατόχρωμου άγαρ (υλικά για στρεπτόκοκκους)** 11
Άσκηση 10. **Παρασκευή θρεπτικού υλικού LOWENSTEIN-JENSEN (υλικά για μυκοβακτηρίδια)** 12
Άσκηση 11. **Παρασκευή θρεπτικού υλικού του HOYLE (υλικά για κορυνοβακτηρίδια)** 13
Άσκηση 12. **Παρασκευή άγαρ MC CONKEY (υλικά για εντεροβακτηριακά)**..... 14
Άσκηση 13. **Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε υγρό θρεπτικό υλικό** 15
Άσκηση 14. **Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε τρυβλίο (τεθλασμένη γραμμή)** 16
Άσκηση 15. **Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε τρυβλίο (σε όλη την επιφάνεια)** 16
Άσκηση 16. **Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε σωληνάρια με κεκλιμένο άγαρ** 17
Άσκηση 17. **Αερόβια καλλιέργεια** 18
Άσκηση 18. **Αναερόβια καλλιέργεια σε ειδικά δοχεία** 19
Άσκηση 19. **Αναερόβια καλλιέργεια με αύξηση της αναγωγικής δύναμης** 19
Άσκηση 20. **Καλλιέργεια παρουσία CO_2** 20
ΧΡΩΣΕΙΣ 21
Άσκηση 21. **Παρασκευή και μονιμοποίηση επιχρίσματος** 22
Άσκηση 22. **Χρώση κυανού του μεθυλενίου** 23
Απαιτούμενα υλικά 24
Άσκηση 23. **Χρώση GRAM (τροποποιημένη κατά Hucker)** 24
Άσκηση 24. **Χρώση ZIEHL-NEELSEN** 25
Άσκηση 25. **Χρώση ALBERT (τροποποιηθείσα κατά Laybourn)** 26
Άσκηση 26. **Χρώση FONTANA** 27
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ 28
Άσκηση 27. **Χρώση VAN GIESON** 29
Άσκηση 28. **Χρώση ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ** 30
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑΤΩΝ 31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ 32

Θρεπτικά υλικά

Γενικά

Τα μικρόβια για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν έχουν ανάγκη από κατάλληλη θερμοκρασία και ατμόσφαιρα και από κατάλληλες θρεπτικές ουσίες. Τα θρεπτικά υλικά είναι μίγματα διαφόρων ουσιών, τα οποία προσφέρουν τις ευνοϊκές συνθήκες για τη διατροφή και πολλαπλασιασμό των μικροβίων in vitro. Μερικές από τις ουσίες αυτές είναι πράγματι 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.

Πρώτες ύλες

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

- Πεπτόνες: Παρασκευάζονται από διάφορες λευκωματούχες ουσίες ύστερα από ειδική κατεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα[1]. Είναι διαλυτές στο νερό και δεν καταστρέφονται ούτε πήζουν με τη θέρμανση. Υπάρχουν στο εμπόριο με τη μορφή σκόνης. Οι πιο συνηθισμένες εκτός από την **κοινή πεπτόνη** είναι η τρυπτόζη, πρωτεόζη και η τρυπτόνη.
- Σάκχαρα: Αποτελούν βασικό συστατικό πολλών θρεπτικών υλικών. Στο εμπόριο υπάρχουν είτε ως διαλύματα , μέσα σε φύσιγγες, είτε ως σκόνη. Εκείνα που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι η **γλυκόζη**, η **λακτόζη**, η ραφινόζη, η ξυλόζη, το άμυλο κ.α.
- 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.
- 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.
- 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%.
- Άγαρ: Είναι ουσία φυτικής προέλευσης και χρησιμοποιείται ως στερεωτικό των υγρών θρεπτικών ουσιών. Υπάρχει σε μορφή σκόνης και αποτελείται από πολυσακχαρίδια και άλατα ασβεστίου που δεν προσφέρουν θρεπτικές ουσίες στα μικρόβια. Λαμβάνεται από θαλάσσια φυτά (φύκια), διαλύεται στο νερό στους 80°C και πήζει σε θερμοκρασία κάτω από 40°C.

---

[1] Ενζυμα που διασπούν τις πρωτείνες.

- Χολή και ασκιτικό υγρό: Χρησιμοποιείται κυρίως η χολή βοδιού που λαμβάνεται όπως και το ασκιτικό υγρό, ασήπτως.
- Τέλος εκτός από το νερό που αποτελεί και το μεγαλύτερο μέρος ενός θρεπτικού υλικού, μπορεί να περιέχει εκχύλισμα μυκήτων, δείκτες κ.α.

Διαίρεση

Τα θρεπτικά υλικά διαιρούνται:

- Ανάλογα με την **κατάσταση** στη οποία βρίσκονται σε:
  1. Υγρά: Τα θρεπτικά συστατικά είναι διαλυμένα σε αποσταγμένο νερό (DH_2O) (π.χ θρεπτικός ζωμός)
  2. Στερεά: Τα θρεπτικά συστατικά είναι διαλυμένα σε DH_2O και περιέχουν άγαρ σε αναλογία 2%.
  3. Ημίρευστα: Τα θρεπτικά συστατικά είναι διαλυμένα σε DH_2O και περιέχουν άγαρ σε αναλογία 1%.
- Ανάλογα με τη **σύνθεσή** τους διακρίνονται σε
  1. Κοινά ή συνηθισμένα: Επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροβίων χωρίς αυξημένες μεταβολικές ανάγκες. Τέτοια υλικά είναι το **θρεπτικό άγαρ**, ο **θρεπτικός ζωμός** κ.α.
  2. Εμπλουτισμένα: Εκτός από τα συστατικά των κοινών θρεπτικών υλικών, περιέχουν ορό αίματος, εκχύλισμα μυκήτων, σάκχαρα, αίμα (**αιματούχο άγαρ**) κ.α.
  3. Εκλεκτικά: Περιέχουν ουσίες που επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός είδους μικροβίων, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η απομόνωση του πρώτου. Τέτοια υλικά είναι το **Chapman** (περιέχει αλάτι NaCl 5% και ευνοεί την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου), το **Lowenstein** (<λεβενστάιν>, για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης), το **Loeffler** (<λέφλερ>, για το κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας) κ.α.
  4. Διαφοροποιητικά: Επιτρέπουν την αναγνώριση μιας ιδιότητας με ορατή αλλαγή στο υλικό ή στο καλλιέργημα. Τέτοια υλικά είναι το **McConkey** 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 A) 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.

Προϋποθέσεις

Ένα θρεπτικό υλικό θεωρείται κατάλληλο για χρήση όταν συμπληρώνει τις εξής προϋποθέσεις:

1. Όταν περιέχει τις κατάλληλες θρεπτικές ή άλλες ουσίες σε ορισμένη αναλογία.
2. Όταν έχει την κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου (pH).
3. Όταν είναι στείρο μικροβίων.

Παρασκευή θρεπτικών υλικών

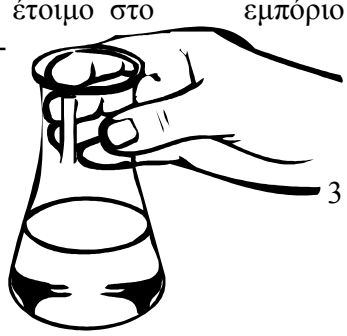
Η παρασκευή ενός θρεπτικού υλικού είναι η αρχή της σωστής, γενικότερα, λειτουργίας ενός Μικροβιολογικού εργαστηρίου. Πρέπει να γίνεται προσεκτικά και με τη σωστή ενδεικνυόμενη σειρά. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται ο έλεγχος του pH καθώς και ο έλεγχος της στειρότητας καθώς αυτά είναι στάδια εκτίμησης και 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	✓
4. .Διόρθωση του pH	✓
5. .Αποστείρωση	✓
6. .Διανομή	✓
7. Έλεγχος της στειρότητας	✓
8. .Διατήρηση και φύλαξη	✓

Άσκηση 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.



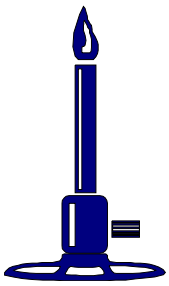
Ο βασικός ζωμός παρασκευάζεται ως εξής:
- Εκχύλισμα κρέατος (beef extract) 3 gr
- Πεπτόνη .....10 gr
- NaCl ..... 5 gr
- DH_2O..... εως 1000 ml

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

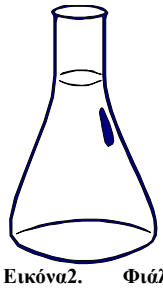
Στο εμπόριο υπάρχει έτοιμος ζωμός με τη μορφή αποξηραμένης και υγροσκοπικής σκόνης, που έχει κατασκευαστεί με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης. Ο ζωμός αυτός παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στη φιάλη.

Απαιτούμενα υλικά

1. Λυοφιλοποιημένος έτοιμος ζωμός από το εμπόριο (Nutrient Broth)
2. Αποσταγμένο νερό (DH_2O)
3. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
4. Κωνική φιάλη Erlenmayer
5. Λυχνία Bunsen



Εικόνα1. Λυχνία Bunsen.



Εικόνα2. Φιάλη Erlenmayer.

Πορεία

1. Ζυγίζουμε τόση σκόνη όσο χρειάζεται για να παρασκευάσουμε 250 ml θρεπτικό ζωμό. Η σκόνη αυτή είναι εξαιρετικά υγροσκοπική και γι' αυτό 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 DH_2O. Το πιο συνηθισμένο μέσο διάλυσης είναι το DH_2O εκτός αν υπάρχουν διαφορετικές οδηγίες. Το DH_2O 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 επι 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 (N) ή δεκατοκανονικά (N/10) διαλύματα οξέων (HCl) ή βάσεων (NaOH).

Το **θρεπτικό άγαρ** είναι βασικά ένας θρεπτικός ζωμός με στερεωτικό άγαρ (βλέπε σελ. 3). Το 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[2]. 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

---

2 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.

8. Πιπέτα Pasteur

Πορεία

1. Παρασκευάζουμε 250 ml θρεπτικού ζωμού.
2. Ζυγίζουμε και διαλύουμε μέσα στο ζωμό 3 gr στερεωτικού άγαρ.
3. Εαν 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.

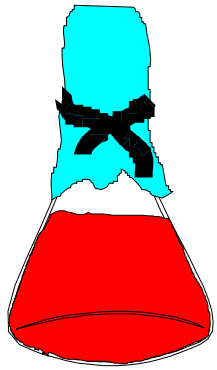
Άσκηση 3. Αποστείρωση θρεπτικού άγαρ

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 αποστείρωσης 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)



Εικόνα3. Κωνική φιάλη με θρεπτικό υλικό έτοιμη για την αποστείρωση.

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

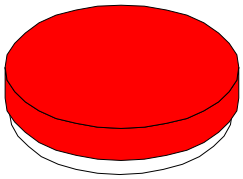
Βασικές γνώσεις

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



Εικόνα4. Τρυβλίο Petri.

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

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 1N. 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
   DH_2O..... 100 ml

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 **Monkton**:

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
DH_2O..... εως 1000 ml

ΠΡΟΣΟΧΗ: Τα άλατα του σεληνίου είναι δηλητήρια για τα ζώα και τον άνθρωπο.

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 ($NaHSeO_3$) .....4,0 gr
Πεπτόνη.....5,0 gr
Λακτόζη .....4,0 gr
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 9,5 gr
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο ($KH_2PO_4.2H_2O$) 0,5 gr
DH_2O..... 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.

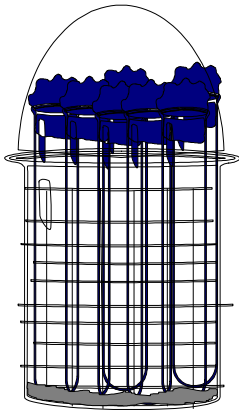
- Τέλος υπάρχουν και άλλα υλικά όπως το άγαρ με κυανούν του μεθυλενίου και ηωσίνης (**EMB υλικό**), το **SS-άγαρ**, το **υλικό Kligler** κλπ.

Απαιτούμενα υλικά

1. Αφυδατωμένη σκόνη άγαρ Mc Conkey
2. Υλικά για την παρασκευή θρεπτικών υλικών

Πορεία

1. Εργαζόμαστε όπως και με όλα τα άλλα υλικά.



Εικόνα5. Μεταλλικό καλάθι με σωληνάρια προς επώαση.

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.

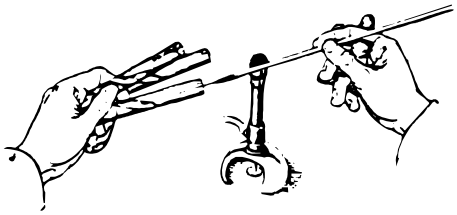
Απαιτούμενα υλικά

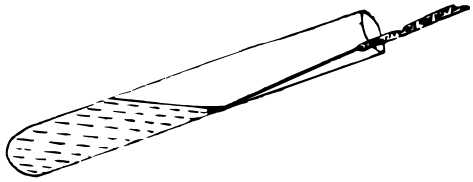
1. Τρυβλίο στο οποίο έχουμε καλλιεργήσει κάποιο μικρόβιο ή οποιοδήποτε άλλο ύποπτο για μικρόβια υλικό (πτύελα, σκόνη εργαστηρίου κ.α)
2. Σωληνάρια με κάποιο υγρό θρεπτικό υλικό
3. Κρικοφόρος ή βαμβακοφόρος στειλεός
4. Λυχνία Bunsen

Εικόνα6. Κρικοφόρος στειλεός.

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

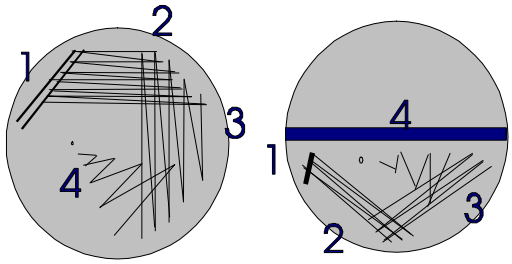
Ο ενοφθαλμισμός ενός παθολογικού υλικού σε στερεό θρεπτικό υλικό γίνεται ή σε τρυβλία ή σε σωληνάρια. Ο ενοφθαλμισμός σε τρυβλία μπορεί να γίνει με τους εξής 5 τρόπους:

- ⇨ 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 άλλο καλλιέργημα)
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 την κλειστή άκρη ενός αποστειρωμένου σωληναρίου αιμολύσεως (Wassermann).



Εικόνα7. Τεθλασμένη γραμμή α. Σε ολόκληρο το τρυβλίο β. Στο μισό τρυβλίο.

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:

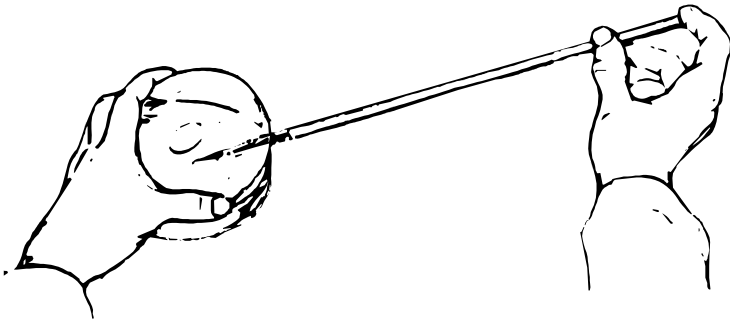
Ο ενοφθαλμισμός σε όλη την επιφάνεια ενός υλικού σε τρυβλίο εφαρμόζεται όταν θέλουμε να γίνει ομοιογενής ανάπτυξη του μικροβίου σε όλη την επιφάνεια του υλικού προκειμένου να κάνουμε το τεστ ευαισθησίας. (περιγράφεται παρακάτω)

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 βελο-

νοκάτοχο 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 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 τρυβλία, 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 μικροαερόφιλα μικρόβια.



Εικόνα8. Ενοφθαλμισμός τρυβλίου με πιπέτα.

Απαιτούμενα υλικά

1. Μικροβιακό εναιώρημα. Παρασκευάζεται εύκολα με τη διάλυση μιας αποικίας μικροβίων σε μικρή ποσότητα θρεπτικού ζωμού, DH_2O ή άλλου υγρού.
2. Θρεπτικό υλικό σε τρυβλίο

Πορεία

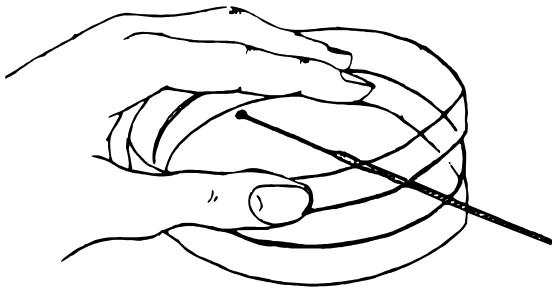
1. Καλύπτουμε την επιφάνεια του υλικού στο τρυβλίο με το μικροβιακό εναιώρημα.
2. Αφήνουμε για λίγα λεπτά.
3. Απορρίπτουμε την ποσότητα του υγρού που περισσεύει.
4. <προαιρετικά> Επωάζουμε στον επωαστικό κλίβανο για μερικές ώρες και τοποθετούμε τους δίσκους με τα αντιβιοτικά στην επιφάνεια του τρυβλίου.

Άσκηση 16. Ενοφθαλμισμός παθολογικού υλικού σε σωληνάρια με κεκλιμένο άγαρ

Βασικές γνώσεις

Ενα 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.



Εικόνα9. Ενοφθαλμισμός τρυβλίου με κρικοφόρο στειλεό.

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.

Άσκηση 17. Αερόβια καλλιέργεια

Βασικές γνώσεις

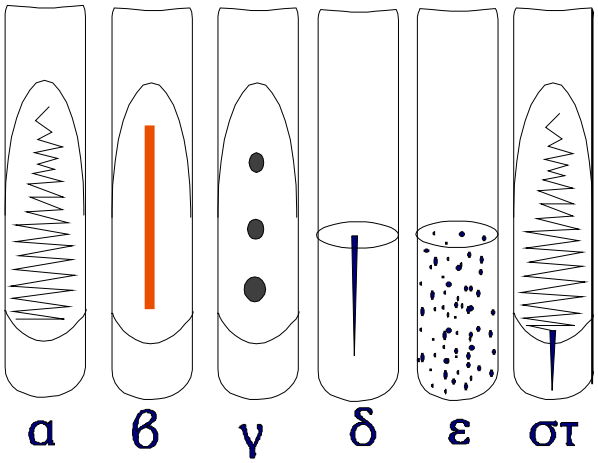
Καλλιεργούμε πάντα τα μικρόβια σε συνθήκες ανάλογες με τις μεταβολικές τους ανάγκες. Τα μικρόβια, ανάλογα με το πώς χρησιμοποιούν το οξυγόνο για τις καύσεις τους χωρίζονται σε α) αερόβια, β) αναερόβια και γ) μικοαερόφιλα. Η θερμοκρασία επώασης είναι συνήθως 37°C καθώς μας ενδιαφέρουν κυρίως τα μικρόβια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



Εικόνα10. Ενοφθαλμισμός σωληναρίων: α. σε οριζόντιες γραμμές, β. σε κεντρική γραμμή, γ. σε σημεία, δ. με νύξη, ε. σε όλη τη μάζα, στ. με νύξη και επίστρωση.

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. <u>Δέσμευση του οξυγόνου από πυρογαλλικό οξύ</u>. 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. <u>Δέσμευση του οξυγόνου από υδρογόνο</u>. 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

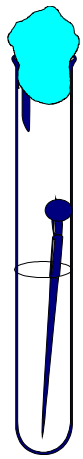
Η αναερόβια καλλιέργεια με αύξηση της αναγωγικής δύναμης του υλικού γίνεται με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

1. <u>Βρασμός του θρεπτικού υλικού</u>. Με το βρασμό επιτυγχάνουμε παροδική αύξηση της αναγωγικής δύναμης, εκτός αν προσθέσουμε στην επιφάνεια του υλικού υγρή παραφίνη, βαζελίνη κλπ.
2. <u>Καλλιέργεια σε υψηλή στήλη</u>. 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. <u>Συγκαλλιέργεια αναεροβίων με αερόβια μικρόβια</u>. 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.

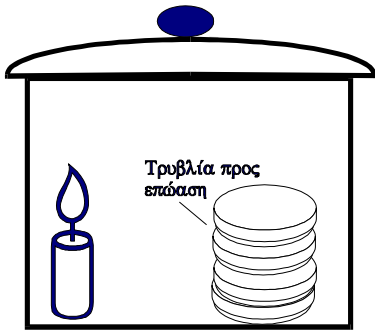
Εικόνα11. Καλλιέργεια παρουσία σιδήρου.

Άσκηση 20. Καλλιέργεια παρουσία CO_2

Βασικές γνώσεις

Οι τρόποι για την καλλιέργεια αυτή είναι:

- Σε φιάλη αναερόβιου καλλιέργειας: Με αεραντλία αφαιρείται ο αέρας και εισάγεται CO_2 από οβίδα.
- Σε ειδικό αεροστεγές δοχείο: Με την πραγματοποίηση χημικής αντιδράσεως (π.χ HCl και $CaCO_3$) παράγεται αρκετή ποσότητα CO_2, το οποίο ως πιο βαρύ από τον αέρα καταλαμβάνει τα κάτω στρώματα του δοχείου.
- Με εισαγωγή αερίου CO_2. Αυτή γίνεται με σύριγγα σε φιάλες αιμοκαλλιέργειας, χρησιμοποιώντας CO_2 από οβίδα ή συσκευή Kipp.
- Με κερί. Τοποθετείται αναμένο κερί σε δοχείο που έχουν τοποθετηθεί τα καλλιεργήματα και το κλείνουμε ερμητικά. Όταν σβήσει το κερί θα έχει παραχθεί αρκετό CO_2 για την επώαση (5-10%).



Εικόνα12. Καλλιέργεια παρουσία CO2. Μέθοδος με κερί.

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.

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:

ΦΥΣΙΚΕΣ
- Φυτικές
  - Αιματοξυλίνη
  - Αιματείνη
  - Βραζιλείνη
  - Ορσείνη
  - Κρόκος
- Ζωικές — Καρμίνιο

Οξινες
- Πικρικό οξύ
- Αουράνθια
- Πορτοκαλόχρουν G
- Εωσίνη

ΤΕΧΝΗΤΕΣ
- Βασικές
  - Ερυθροσίνη
  - Οξινη φουξίνη
  - Ιώδεις: ιώδες γεντιανής, κρυσταλλικό, του μεθυλίου κλπ.
  - Πράσινες: του μεθυλίου, Litgh (στίλβον) του μαλαχίτη κλπ.
  - 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.

Άσκηση 21. Παρασκευή και μονιμοποίηση επιχρίσματος

Βασικές γνώσεις

Όταν λέμε **παρασκευή επιχρίσματος**, εννοούμε την τοποθέτηση μιας ποσότητας από το προς μικροσκόπηση υλικό πάνω σε μια πολύ καλά καθαρισμένη αντικειμενοφόρο πλάκα. Ο τρόπος της τοποθέτησης του υλικού εξαρτάται από το υλικό, αλλά και από την τεχνική μικροσκόπησης που θα χρησιμοποιηθεί (νωπό ή ξηρό παρασκεύασμα).

Η ποσότητα και το πάχος της επίστρωσης δεν πρέπει να είναι μεγάλα, για να μπορούν κατά τη μικροσκόπηση να διακρίνονται ευκρινώς και μεμονωμένα τα κύτταρα (ερυθρά, λευκά κλπ), τα μικρόβια, άλλα στοιχεία του επιχρίσματος και χωρίς αλλοίωση της μορφολογίας τους.

Η στερέωση του υλικού πάνω στην πλάκα οφείλεται στην ύπαρξη λευκωματούχων κυρίως ουσιών στα υλικά όπου υπάρχουν (όπου δεν υπάρχουν βάζουμε γλυκερινούχο αλβουμίνη) που κατά τη ξήρανση σταθεροποιούνται στην πλάκα συγκρατώντας και τα άλλα υλικά (κύτταρα κ.α).

Μονιμοποίηση ονομάζεται η διαδικασία με την οποία τα διάφορα υλικά που θέλουμε να μικροσκοπήσουμε (κύτταρα, μικρόβια, οργανίδια, βιοχημικές ενώσεις κλπ), προφυλάσσονται από μεταθανάτιες αλλοιώσεις, ενώ τα διάφορα συστατικά παραμένουν αδιάλυτα κατά την τεχνική χρώσης.

Επίσης με τη χρήση των μονιμοποιητικών διαλυμάτων ή τεχνικών προστατεύονται τα κύτταρα από τη συρρίκνωση και την παραμόρφωση και βελτιώνεται η ικανότητα χρώσεώς τους.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος μονιμοποίησης είναι με πέρασμα πάνω από τη φλόγα αλλά χρησιμοποιούνται και πολλά χημικά μονιμοποιητικά όπως η φορμαλδεύδη (φορμόλη), αλκοόλη (μεθυλική, αιθυλική), το οξικό οξύ, το πικρικό οξύ, χλωριούχος υδράργυρος κλπ.

Απαιτούμενα υλικά

1. Ύποπτο υλικό (συνήθως κάποια αποικία από προηγούμενη καλλιέργεια)
2. Κρικοφόρος στειλεός
3. 2 αντικειμενοφόρες πλάκες (πολύ καθαρές)
4. Φυσιολογικός ορός (Φ.Ο)
5. 1 καλυπτρίδα
6. Λυχνία Bunsen

Πορεία

1. Βάζουμε από μια μικρή σταγόνα Φ.Ο στην κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.
2. Αποστειρώνουμε τον κρικοφόρο στειλεό και αφήνουμε λίγο να κρυώσει.
3. Παίρνουμε, με τον κρικοφόρο στειλεό, μια αποικία από το καλλιέργημα.
4. Αφήνουμε ένα μικρό μέρος της αποικίας στην μια αντικειμενοφόρο πλάκα και άλλο ένα στη δεύτερη αντικειμενοφόρο πλάκα (φτιάχνουμε δύο παρασκευάσματα, για την περίπτωση που το ένα καταστραφεί κατά τη χρώση)
5. Αποστειρώνουμε τον κρικοφόρο στειλεό.
6. Σκεπάζουμε τη σταγόνα της μιας πλάκας, προσεκτικά, με μια καλυπτρίδα (ΝΩΠΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑ).
7. Αφήνουμε να στεγνώσει στον αέρα η άλλη σταγόνα.
8. Μονιμοποιούμε τέλος το παρασκεύασμα μας περνώντας το 3-5 φορές πάνω από τη φλόγα Bunsen χωρίς να θερμανθεί πολύ (ΞΗΡΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑ).

Παρατηρήσεις

Στα ξηρά ή βαμμένα παρασκευάσματα υπάρχει διαφοροποίηση στην επίστρωση ανάλογα με το υλικό. Έτσι:

- το αίμα επιστρώνεται με τη βοήθεια καλυπτρίδας ή πλάκας.
- το μικροβιακό υλικό (αποικία μικροβίου) αραιώνεται σε σταγόνα Φ.Ο και αποξηραίνεται στον αέρα, όπως περιγράψαμε παραπάνω.
- όταν έχουμε πτύελα ή άλλο βλεννώδες υλικό, τοποθετούμε μικρή ποσότητα σε μια πλάκα και το καλύπτουμε με μια άλλη. Στη συνέχεια μετακινούμε τις πλάκες παλινδρομικά μέχρι να σπάσει η βλέννη και να γίνει η επίστρωση.
- τις ιστολογικές τομές τις αφήνουμε να επιπλέουν στην επιφάνεια χλιαρού νερού και κάτω από αυτές (μέσα στο νερό), βάζουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα (επαλειμμένη με γλυκερινούχο αλβουμίνη) έτσι ώστε σηκώνοντάς την η τομή να βρεθεί πάνω και κατά μήκος της πλάκας.
- κυτταρικά υλικά (στοματικό επιθήλιο) επιστρώνονται απ' ευθείας με το εργαλείο που ελήφθησαν.

Άσκηση 22. Χρώση κυανού του μεθυλενίου

Βασικές γνώσεις

Περιγράφεται παρακάτω η τεχνική χρώσης κυανού του μεθυλενίου κατά **Loeffler**. Είναι από τις συνηθέστερες χρώσεις στο Μικροβιολογικό εργαστήριο.

Απαιτούμενα υλικά

1. Διάλυμα Α (κορεσμένο διάλυμα κυανού του μεθυλενίου)
   Κυανούν του μεθυλενίου (σκόνη).. 1,0 gr
   Αιθυλική αλκοόλη 95° ..... 100,0 ml
2. Διάλυμα Β (υδατικό διάλυμα καυστικού καλίου 1%)
   KOH ..... 1,0 gr
   DH_2O ..... έως 100 ml
3. Διάλυμα Loeffler προς χρήση
   Διάλυμα Α ..... 1,0 ml
   DH_2O ..... 99,0 ml
   Διάλυμα Β ..... 30 ml

Πορεία

1. Παρασκευή επιχρίσματος
2. Ξήρανση επιχρίσματος
3. Μονιμοποίηση στη φλόγα (3-5 φορές)
4. Χρώση με διάλυμα Loeffler για 3 λεπτά
5. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
6. Στέγνωμα (στον αέρα)
7. Μικροσκόπηση

Αποτέλεσμα

Είναι από τις πιο απλές χρώσεις και χρωματίζει όλα τα μικρόβια και τα τυχόν υπάρχοντα κύτταρα εντός 3 λεπτών. Κίνδυνος υπέρχρωσης δεν υπάρχει.

Άσκηση 23. Χρώση GRAM (τροποποιημένη κατά Hucker)

Βασικές γνώσεις

Η χρώση GRAM είναι από τις σπουδαιότερες χρώσεις που γίνονται στο Μικροβιολογικό εργαστήριο καθώς βάσει αυτής διαχωρίζονται τα μικρόβια σε GRAM θετικά (+) και GRAM αρνητικά (-).

Απαιτούμενα υλικά

1. (Crystal violet - κρυσταλλικό ιώδες)
   I. Crystal violet ..... 2.0 gr
      Αιθυλική αλκοόλη (απόλυτος) 20,0 ml
      DH_2O ..... 180,0 ml
   II. Ammonium oxalate
      Ammonium oxalate ..... 0,8 gr
      DH_2O ..... 80,0 ml
   Ανάμιξη των I και II και διήθηση μετά 24 ώρες.
2. Lugol (για GRAM)
   Ιώδιο κρυσταλλικό ..... 1,0 gr
   Ιωδιούχο κάλιο ..... 2,0 gr
   DH_2O έως ..... 100,0 ml
3. Safranin (ή φουξίνη)
   Σαφρανίνη .....0,25 gr
   Αιθυλική αλκοόλη...10,0 ml
   DH_2O ..... 90,0 ml

Διήθηση μετά 24 ώρες.

4. Ακετόνη (ή αιθυλική αλκοόλη 95°)

Πορεία

1. Καθήλωση επιχρίσματος με θερμότητα (3-5 φορές)
2. Χρώση με Crystal violet για 30" (sec) έως 1' (min)
3. Απόρριψη χρωστικής - ξέπλυμα με νερό
4. Κάλυψη με Lugol για 30" (sec) και απόρριψη
5. Ξέπλυμα με νερό
6. Αποχρωματισμός για 5" (sec) με απαλή κίνηση με ακετόνη (ή αιθυλική αλκοόλη 95°).
7. Ξέπλυμα με νερό αμέσως
8. Χρώση με σαφρανίνη (ή φουξίνη) για 20-30" (sec)
9. Ξέπλυμα με νερό
10. Στέγνωμα - μικροσκόπηση

Αποτέλεσμα

GRAM(+) οργανισμοί μπλέ-μαύροι

GRAM(-) οργανισμοί κόκκινοι

GRAM(+)		GRAM(-)		
Cocci	Bacilli	Cocci	Bacilli	Coccobacilli
Staphylococcus *Streptococcus*	*Bacillus* *Clostiridium* *Corynobacterium* *Mycobacterium* *Listeria*	*Neisseria*	*Escherichia* *Klebsiela* *Salmonella* *Proteus* *Pseudomonas*	*Brucella* *Haemophilus*

Άσκηση 24. Χρώση ZIEHL-NEELSEN

Βασικές γνώσεις

Με τη χρώση Ziehl-Nielsen βάφονται τα οξεάντοχα μικρόβια...

Απαιτούμενα υλικά

1. Φαινικούχος φουξίνη
   Βασική φουξίνη ..... 1,0 gr
   Απόλυτη αιθυλική αλκοόλη ..... 10,0 ml
   Φαινικό οξύ (Phenol - υγροποιημένο) C_6H_5OH 5,0 ml
   DH_2O ..... 85,0 ml

ΠΡΟΣΟΧΗ ! Το φαινικό οξύ είναι εξαιρετικά εύφλεκτο.

Πρώτα ρίχνουμε το φαινικό οξύ (που έχει υγροποιηθεί δια θερμάνσεως σε υδατόλουτρο) στο DH_2O, αναταράσσομε ισχυρά και το αφήνουμε να διαυγασθεί. Στη συνέχεια ρίχνουμε τη φουξίνη η οποία έχει παρασκευαστεί από πριν και ανακατεύουμε καλά. Πριν τη χρήση πρέπει να διηθηθεί.

2. Κυανούν του μεθυλενίου (οξυνισμένο)
   Κυανούν του μεθυλενίου ..... 0,25 gr
   Οξικό οξύ (παγόμορφο) ..... 1,0 ml
   DH_2O ..... 100,0 ml
3. Οξυνισμένη αλκοόλη
   Πυκνό HCl (εμπορίου)..... 7,0 ml
   Αιθυλική αλκοόλη 95° ..... 100,0 ml

Πορεία

1. Χρώση με φαινικούχο φουξίνη υπό θέρμανση μέχρι να βγουν ατμοί και όχι συνέχεια, για 10' (min) περίπου.
2. Αφήνουμε λίγο να παγώσει.
3. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
4. Διαφοροποίηση με οξυνισμένη αλκοόλη (υποκειμενικά)
5. Χρώση με κυανούν του μεθυλενίου για 10' (min)
6. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
7. Στέγνωμα - μικροσκόπηση

Αποτέλεσμα

Οξεάντοχα βακτηρίδια.....κόκκινα
Υπόστρωμα.....ωχρό μπλε

Άσκηση 25. Χρώση ALBERT (τροποποιηθείσα κατά Laybourn)

Βασικές γνώσεις

Χρησιμοποιείται για τη χρώση των κορυνοβακτηρίων

Απαιτούμενα υλικά

1. Χρωστική Α.
   Κυανούν της τολουιδίνης..... 0,15 gr
   Πράσινο του μαλαχίτη ..... 0,20 gr
   Παγόμορφο οξικό οξύ..... 1,0 ml
   Αιθυλική αλκοόλη 95° ..... 2,0 ml
   DH_2O ..... 100,0 ml

Οι χρωστικές ουσίες διαλύονται στο οινόπνευμα και έπειτα προστίθεται το νερό και το οξύ. Αφήνουμε το διάλυμα για 24 ώρες και κατόπιν διηθούμε.

2. Υδατικό διάλυμα ιωδίου (Lugol)
   Ιώδιο .....2,0 gr
   Ιωδιούχο κάλιο .....3,0 gr
   DH_2O.....300,0 ml
   Πορεία
1. Προστίθεται η χρωστική Α για 1-3΄(λεπτά)
2. Ξεπλένουμε με νερό.
3. Απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με διηθητικό χαρτί.
4. Προστίθεται το Lugol για 1-3'
5. Ξεπλένουμε με νερό και ξηραίνουμε
   Αποτέλεσμα
   Με τη μέθοδο αυτή έχουμε καλή αντίθεση χρωμάτων. Τα κοκκία χρωματίζονται κυανόμαυρα, το πρωτόπλασμα πράσινο και οι άλλοι μικροοργανισμοί ελαφρά πράσινοι.

Άσκηση 26. Χρώση FONTANA

Βασικές γνώσεις
Χρησιμοποιείται για τη χρώση των σπειροχαιτών.
Απαιτούμενα υλικά
1. Μονιμοποιητικό διάλυμα
   Οξικό οξύ (Glacial) .....1,0 ml
   Φορμόλη .....2,0 ml
   DH_2O.....100,0 ml
2. Πρόστυμα
   Φαινόλη C_6H_5OH.....1,0 ml
   Ταννίνη .....5,0 gr
   DH_2O.....100,0 ml
3. Διάλυμα εναμμώνιου νιτρικού αργύρου
   Α. Διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,25%
   Β. Διάλυμα αμμωνίας 10,0%

Σε ποσότητα από το διάλυμα Α προστίθεται διάλυμα Β οπότε σχηματίζεται ίζημα. Η προσθήκη του Β εξακολουθεί μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Στη συνέχεια προστίθεται πάλι το Α σε σταγόνες, μέχρις ότου εμφανιστεί πάλι ένα ελαφρό θόλωμα μη αναδιαλυόμενο.
Πορεία
1. Μονιμοποίηση για 3" (sec) επί 3 φορές.
2. Ξέπλυμα με απόλυτη αλκοόλη την οποία αφήνουμε για 3' να επιδράσει.
3. Απόρριψη της περίσσειας και αυτό που μένει το Καίμε μέχρι να ξηρανθεί το παρασκεύασμα
4. Βάζουμε το πρόστυμα και το θερμαίνουμε μέχρι να βγουν ατμοί επί 30"
5. Ξέπλυμα με DH_2O και στέγνωμα (στον αέρα)
6. Προσθήκη διαλύματος εναμμώνιου νιτρικού αργύρου θερμαίνοντας μέχρι να βγουν ατμοί επί 30", οπότε το παρασκεύασμα γίνεται καστανόχρωμο.

7. Ξέπλυμα καλό με DH_2O, στέγνωμα και έγκλειση με βάλσαμο του Καναδά, διότι το κεδρέλαιο προκαλεί αλλοιώσεις του χρώματος.

Αποτέλεσμα

Σπειροχαίτες .....καστανόμαυρες

Υπόστρωμα ……...καστανοκίτρινο

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ

Γενικά

Με τον όρο ιστολογική τεχνική, εννοούμε το σύνολο των διαδικασιών με τις οποίες ιστολογικό υλικό γίνεται κατάλληλο προς μικροσκοπική μελέτη της υφής του, είτε πρόκειται περί φυσιολογικής είτε πρόκειται περί κάποιας παθολογικής κατάστασης.

Στάδια

Περιλαμβάνει τις εξής διαδικασίες:

1. **Παρασκευή**: Είναι το πρώτο-πρώτο στάδιο της ιστολογικής τεχνικής που περιλαμβάνει την απομόνωση του προς μελέτη οργάνου και την απογύμνωσή του από κάθε τι περιττό, ώστε να μπορέσουμε να το ελέγξουμε εξωτερικά (μακροσκοπικά) και εσωτερικά (μικροσκοπικά), χωρίς να αλλοιώσουμε τις σχέσεις των διαφόρων μερών του.
2. **Μονιμοποίηση**: Η αφαίρεση ενός ιστοτεμαχίου από κάποιο ζωντανό οργανισμό, συνοδεύεται από ορισμένες αλλαγές στα κύτταρά του. Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αιτία τα μικρόβια που πολλαπλασιάζονται αλλά και την αυτόλυση. Οι μεταβολές αυτές αναφέρονται ως "μεταθανάτιες αλλοιώσεις".

Για τη μικροσκοπική μελέτη της υφής του ιστοτεμαχίου πρέπει αφ' ενός να αποφευχθούν οι μεταθανάτιες αλλοιώσεις και αφ' ετέρου τα διάφορα συστατικά του κυττάρου να παραμείνουν αδιάλυτα κατά την επεξεργασία και να προστατευθούν από τη συρρίκνωση. Πρέπει επίσης να βελτιωθεί η ικανότητα χρώσεως αυτών προς βελτίωση της ορατότητας τους. Η επεξεργασία με την οποία επιτυγχάνονται όλα αυτά λέγεται **μονιμοποίηση** και τα χρησιμοποιούμενα υγρά, **μονιμοποιητικά διαλύματα**.

3. **Έκπλυση**: Μετά τη μονιμοποίηση και πριν γίνει τίποτα άλλο στο ιστοτεμάχιο, γίνεται κατά κανόνα πλύσιμο αυτού με τρεχούμενο νερό για να απομακρυνθεί η περίσσεια του μονιμοποιητικού υλικού. Εάν η μονιμοποίηση έγινε με αλκοόλη, δε χρειάζεται το στάδιο αυτό. Μετά από αυτό οι ιστοί πρέπει να διατηρούνται σε αλκοόλη 70° για να αποφευχθεί η κακή επίδραση από τη μακροχρόνια χρήση του μονιμοποιητικού, όπως η υπερβολική σκλήρυνση του ιστοτεμαχίου, η δημιουργία ιζημάτων και η μείωση της χρωστικότητας των ιστών.
4. **Αφυδάτωση**: Οι ιστοί είναι μαλακοί και περιέχουν νερό το οποίο πρέπει να αφαιρεθεί και τη θέση του να καταλάβει άλλο υλικό (παραφίνη, νιτροκελλουλόζη κλπ), που θα παρέχει τον κατάλληλο βαθμό σκληρότητας για τον τεμαχισμό.

Η αφυδάτωση γίνεται με ανιούσα σειρά αλκοολών 30°, 50°, 70°, 80°, 95° και 100°. Ο χρόνος κάθε αλλαγής διαρκεί από 30 λεπτά μέχρι 3 ώρες ανάλογα.

5. **Διαφανοποίηση**: Με την επεξεργασία αυτή επιδιώκεται η απομάκρυνση της αλκοόλης και η αντικατάστασή της από υγρό το οποίο αναμιγνύεται με την παραφίνη έτσι ώστε στο επόμενο στάδιο να αντικατασταθεί και αυτό από την παραφίνη. Τέτοια υλικά είναι το χλωροφόρμιο, το βενζόλιο, η τολουόλη και η ξυλόλη. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 20-30 λεπτά.
6. **Εμπότιση** με παραφίνη: Στο στάδιο αυτό αντικαθιστάμε βαθμιαία το διαφανοποιητικό υλικό από την παραφίνη.

Σε κλίβανο 58°C φέρονται τα ιστοτεμάχια σε μίγμα 1 μέρους παραφίνης και 3 μερών ξυλόλης, κατόπιν σε ίσα μέρη παραφίνης και ξυλόλης και ακολούθως σε 3 μέρη παραφίνης και 1 μέρος ξυλόλης. Τέλος φέρεται σε καθαρή παραφίνη. Η διαδικασία διαρκεί 3-6 ώρες περίπου.

7. **Έγκλειση** σε παραφίνη: Είναι η διαδικασία εκείνη κατά την οποία το εμποτισμένο ιστοτεμάχιο φέρεται μέσα στο σε υγρή κατάσταση μέσο εγκλείσεως (π.χ παραφίνη), το οποίο πήζει (σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή με ξηρό CO_2), μέσα σε κατάλληλα καλούπια και περικλείει έτσι σε συμπαγές σώμα (block) το ιστοτεμάχιο.

8. **Μικροτόμηση**: Με αυτή επιδιώκεται η λήψη πολύ λεπτών, διαφανών στο μικροσκόπιο, τομών (πάχους 6 μ συνήθως), οι οποίες μας επιτρέπουν τη μελέτη των διαφόρων ιστολογικών στοιχείων του παρασκευάσματος.

9. **Χρώση**: Η χρώση των διαφόρων ιστολογικών στοιχείων οφείλεται στην προσρόφηση της χρωστικής ή στη διαλυτότητα αυτής σε μια συγκεκριμένη ουσία (λιποδιαλυτές χρωστικές - χρώση λίπους), ή τέλος να πρόκειται περί χημικού φαινομένου όπως έχουμε αναφέρει.

Διαφοροποίηση καλείται η απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής η οποία έχει συνδεθεί ασθενώς με ορισμένα στοιχεία των παρασκευασμάτων.

10. **Επικάλυψη** με βάλσαμο του Καναδά και καλυπτρίδα. ☞ Προσοχή στις φυσαλίδες.

11. **Μικροσκόπηση**.

Άσκηση 27. Χρώση VAN GIESON

Βασικές γνώσεις

Πολλές τεχνικές είναι κατάλληλες για τη διαφορική επίδειξη των συνδετικών ιστών, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων περιλαμβάνεται στην κατηγορία των "τριχρωμικών χρώσεων".

Ο όρος "τριχρωμικές χρώσεις" περιλαμβάνει ένα αριθμό τεχνικών για την εκλεκτική επίδειξη μυών, ινών κολλαγόνου, ινώδους και ερυθροκυττάρων.

Σαν συμπέρασμα, τρεις χρώσεις χρησιμοποιούνται, εκ των οποίων η μία ίσως είναι χρώση πυρήνα.

Μια από τις παλαιότερες τεχνικές με σταθερή χρώση είναι η μέθοδος Van Gieson.

Απαιτούμενα υλικά

1. Το ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης είναι ικανοποιητικό για τη χρώση.
2. Τομές παραφίνης.
3. **Χρωστική Van Gieson**

   Κεκορεσμένο υδατικό δ. πικρικού οξέος 50 ml
   υδατικό διάλυμα όξινου φουξίνης.... 9,0 ml
   DH_2O..... 50 ml

Πορεία

1. Αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών.
2. Χρώση του πυρήνα δια της σειράς Celestin blue haenalum (ή σιδηρούχου αιματοξυλίνης)
3. Ξέπλυμα με νερό βρύσης.
4. Διαφοροποίηση σε οξυνισμένη αλκοόλη
5. Πλύσιμο καλό σε νερό βρύσης
6. Χρώση με τη χρωστική Van Giesonγια 3 λεπτά. ⏲
7. Ταχεία αφυδάτωση με ανιούσα σειρά αλκοολών
8. Καθαρίζουμε με ξυλόλη και επιθέτουμε βάλσαμο του Καναδά.

Αποτέλεσμα

Πυρήνες..... καφέ / μαύρο

Κολλαγόνο .....κόκκινο
Ελαστικές ίνες.....κίτρινο
Δικτυωτές ίνες.....κίτρινο
Αλλοι ιστοί.....κίτρινο

Άσκηση 28. Χρώση ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ

Βασικές γνώσεις

Η χρώση Παπανικολάου είναι από τις καλύτερες κυτταρολογικές χρώσεις

Απαιτούμενα υλικά

1. **Αιματοξυλίνη Harris**. Προετοιμάζεται όπως πρέπει εκτός του ότι παραλείπεται το οξικό οξύ.
2. **OG 6 (ORANGE 6)**
   ORANGE 6 έτοιμο (Stock) διάλυμα
   (0,5% σε 95° αλκοόλη) ..... 100 ml
   Φωσφοτουγκιστικό οξύ ..... 0,015 gr
3. **EA 50 (EOSIN AZURE 50)**
   Light green S.F (0,1% σε 95° αιθ.αλκοόλη) 45 ml
   Bismark brown (0,5% σε 95° αιθ.αλκοόλη) 10 ml
   Eosin azure (0,5% σε 95° αιθ.αλκοόλη) 45 ml
   Φωσφοτουγκιστικό οξύ ..... 0,2 gr
   Ανθρακικό λίθιο
   (κεκορεσμένο υδατικό διάλυμα).... 1 σταγ.

Πορεία

1. Ξέπλυμα σε 95° αλκοόλη.
2. Ξέπλυμα σε 70° αλκοόλη.
3. Ξέπλυμα σε DH_2O.
4. Χρώση στην Harris αιματοξυλίνη για 5-30" (sec).
5. Ξέπλυμα με DH_2O.
6. Ξέπλυμα σε 95° αλκοόλη.
7. Κατεργασία με 0,1% αμμωνία σε 95° αλκοόλη για 1' (min)
8. Ξέπλυμα σε 95° αλκοόλη.
9. Χρώση σε OG 6 για 90" (sec).
10. Ξέπλυμα σε 95° αλκοόλη 2 φορές.
11. Χρώση σε EA 50 για 90" (sec).
12. Ξέπλυμα σε 95° αλκοόλη 2 φορές.
13. Ξέπλυμα σε απόλυτη αλκοόλη 2 φορές.
14. Ξέπλυμα σε ξυλόλη 2 φορές.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η χρώση αιματοξυλίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε παλινδρομικά ή προοδευτικά. Το τελευταίο είναι προτιμότερο με έλεγχο υπό μικροσκοπική εκτίμηση αφού 2 ή 3 καλάθια έχουν χρωστεί.

15. Επιθέτουμε βάλσαμο του Καναδά και καλυπτρίδα.

Αποτέλεσμα

Πυρήνας..... μπλε
Επιφανειακού κυττάρου κυτταρόπλασμα….ροζ

Ενδιαμέσου και παραβασικού
κυττάρου κυτταρόπλασμα.... μπλε/πράσινο

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑΤΩΝ

Αναγνώριση μορφολογίας

Οι μεταβολές που προκαλούνται στα θρεπτικά υλικά κατά την ανάπτυξη σ' αυτά των μικροβίων, μπορούν να χρησιμεύσουν ως μέσα διαχωρισμού και μερικές φορές αναγνώρισης των μικροβίων.

Εντός υγρών θρεπτικών υλικών: Η ανάπτυξη μικροβίων σε υγρά θρεπτικά υλικά μπορεί να παρουσιάσει τις εξής αλλοιώσεις στο υλικό: Θόλωση σε όλη ή σε μέρος της μάζας του, με ή χωρίς ίζημα, κροκκίδωση έντονη ή όχι, αιωρούμενη ή καθιζάνουσα. Επίσης μπορεί να σχηματισθούν νημάτια ή υμένιο λεπτό ή παχύ και ρυτιδώδες. Τέλος κάθε αλλαγή στην όψη και τη χροιά του υλικού μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Επί στερεών υλικών: Η ανάπτυξη μικροοργανισμών στην επιφάνεια στερεών θρεπτικών υλικών γίνεται με τη μορφή των αποικιών. Η μορφή των αποικιών μπορεί να μεταβληθεί από την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Όταν όμως διατηρηθούν σταθεροί οι όροι της καλλιέργειας, η μορφή των αποικιών παραμένει σταθερή και η ίδια για κάθε είδος μικροβίου. Η μορφή των αποικιών αφορά στο σχήμα, το μέγεθος, το ύψος, την όψη της επιφάνειας, τα άκρα, το χρώμα, τη διαφάνεια, τη σύσταση.

Εντός των στερεών θρεπτικών υλικών: Οι αποικίες εντός των στερεών θρεπτικών υλικών είναι μεμονωμένες (σπάνια προκαλείται ομοιογενής θολερότητα), έχουν συνήθως σχήμα φακοειδές, αναπτύσσονται προς την επιφάνεια ή τον πυθμένα, ανάλογα με τις ανάγκες του μικροβίου για οξυγόνο. Μικρόβια που παράγουν αέριο προκαλούν ρήξη του θρεπτικού υλικού. Οι αποικίες που αναπτύσσονται μέσα στο στερεό θρεπτικό υλικό μπορεί να προκαλέσουν και άλλες μεταβολές όπως αιμόλυση, ρευστοποίηση, αλλαγή χρώματος κλπ.

Διατήρηση καλλιεργημάτων

Τα μικροβιακά καλλιεργήματα διατηρούνται συνήθως σε ψυγείο θερμοκρασίας 5-7°C και ανακαλλιεργούνται ανά διαστήματα σε υλικά συντηρήσεως όπως Dorset κ.α. Για διατήρηση επί μακρότερο χρονικό διάστημα χρησιμοποιούνται καταψύκτες (-70°C περίπου) ή γίνεται αποξήρανση σε κενό και με παράλληλη ψύξη (λυοφιλοποίηση). Στην κατάσταση αυτή τα μικρόβια διατηρούνται επί μακρόν ακόμα και τα πιο απαιτητικά όπως είναι οι αιμόφιλοι και οι παθογόνες ναϊσσέριες. Η αποξήρανση σε κενό και με ψύξη χρησιμοποιείται και για τη διατήρηση των διαφόρων συγκολλητινών και διαγνωστικών ορών.

Διατήρηση παρασκευασμάτων

Παρασκευάσματα χρωματισμένα: Καθαρίζουμε την πλάκα με ξυλόλη (αν έχει χρησιμοποιηθεί κεδρέλαιο), ή με αιθυλική αλκοόλη (ή αιθέρα), αν έχει γίνει χρήση συνθετικού ελαίου μικροσκοπίου. Αποφεύγεται η χρήση ξυλόλης στα ιστολογικά και κυτταρολογικά παρασκευάσματα γιατί διαλύει το βάλσαμο του Καναδά. Αφήνουμε το παρασκεύασμα να ξεραθεί. Με ειδικό υαλογράφο (με διαμάντι), χαράζουμε στο πλακάκι τα στοιχεία του παρασκευάσματος και το τοποθετούμε σε ξύλινη ή μεταλλική ειδική κασετίνα για αντικειμενοφόρες πλάκες, προς φύλαξη.

Παρασκευάσματα μη χρωματισμένα: Εδώ διακρίνουμε 2 περιπτώσεις, να έχουμε αχρωμάτιστα ξηρά παρασκευάσματα που πρόκειται να χρωματιστούν αργότερα οπότε πρέπει να διατηρηθούν σε κουτί σε ξηρό μέρος, ή αχρωμάτιστα νωπά που πρόκειται να μικροσκοπηθούν σε λίγο, οπότε πρέπει να διατηρούνται σε υγρό περιβάλλον (π.χ τρυβλίο με υγρό διηθητικό χαρτί στον πυθμένα).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Εμμανουηλίδου - Αρσένη, Α., (1967). Μικροβιολογία Κλινική και Εργαστηριακή. Αθήνα: Μακρής, Ι., Α.Ε.
- Εμμανουηλίδου - Αρσένη, Α., Καλλιέργειες Μικροβίων στη Διαγνωστική των Λοιμώξεων. Αθήνα: Λεοντιάδης.
- Καλκάνη – Μπουσιάκου, Ε., (1996). Γενική Μικροβιολογία. Αθήνα: «ΕΛΛΗΝ»
- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E., (1985). Ιατρική Μικροβιολογία. Αθήνα: Παρισιάνος
- Bancroft, J., Stevens, A., (1977). Theory and Practice of Histological Techniques. London: Churchill Livingstone

ΤΕΛΟΣ