



## Απομόνωση μικροοργανισμού σε καθαρή καλλιέργεια

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η οποιαδήποτε μικροβιολογική μελέτη ενός μικροοργανισμού (π.χ. σε μοριακό, γενετικό, φυσιολογικό επίπεδο) απαιτεί καλλιέργεια του μικροοργανισμού η οποία θα έχει προέλθει από μία αναπαραγωγική βιώσιμη μονάδα. Η καλλιέργεια σε αυτή την περίπτωση ονομάζεται **καθαρή**.

***Καθαρή καλλιέργεια:** μικροοργανισμού ονομάζεται εκείνη που έχει προκύψει από μία βιώσιμη αναπαραγωγική μονάδα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.*

Η απομόνωση ενός μικροοργανισμού σε καθαρή καλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί συνδυάζοντας διάφορες μικροβιακές μεθόδους όπως είναι οι παρακάτω:

- 1) Μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων
- 2) Επιλογή κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη ορισμένου/ων μόνο είδους/ών ή ομάδος/ων μικροβίων
- 3) Μέθοδοι εμβολιασμού:
  - α) Αραίωση του δείγματος με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο
  - β) Τοποθέτηση ηθιμομεμβράνης με μικροοργανισμούς πάνω στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα
  - γ) Διασπορά των μικροβιακών κυττάρων στην επιφάνεια στερεοποιημένου εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος
  - δ) Μέθοδος παραλλήλων γραμμών

Μετά την επιλεκτική εφαρμογή ορισμένων από τις ανωτέρω μεθόδους ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών σε διαφορετικές θερμοκρασίες, ώστε να απομονωθούν ψυχρόφιλοι, μεσόφιλοι και θερμοφιλοι μικροοργανισμοί.

Οι τεχνικές απομόνωσης χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό ανάλογα με το στόχο, και η μία μειώνει τα σφάλματα της άλλης. Κάθε μέθοδος παρουσιάζει πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα.

### Μειονεκτήματα της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων

- Είναι επίπονη και απαιτεί μεγάλο αριθμό γυαλικών (π.χ. σιφώνια, δοκιμαστικοί σωλήνες, τρυβλία κλπ).

- Οι πολλές αραιώσεις του δείγματος αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης από αερομεταφερόμενους μικροοργανισμούς παρά τις συνθήκες ασηψίας κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η απομόνωση καθαρών καλλιιεργειών. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως.
- Τα στατιστικά σφάλματα είναι μεγάλα και για αυτό απαιτούνται αρκετές (3-5) επαναλήψεις της πειραματικής διαδικασίας.

### Μειωνεκτήματα της μεθόδου εμβολιασμού (3α):

- Τα κύτταρα αερόβιων μικροοργανισμών που θα εγκλωβιστούν στο θρεπτικό υπόστρωμα ή θα βρεθούν στον πυθμένα του τρυβλίου κατά τη διάρκεια της στερεοποίησης του υποστρώματος, ίσως δεν αναπτυχθούν εξαιτίας ανοξικών συνθηκών. Αλλά και αν αναπτυχθούν αποικίες δε θα είναι εύκολος ο μακροσκοπικός διαχωρισμός τους.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στην άσκηση αυτή θα χρησιμοποιήσετε ως δείγμα 1g χόματος από το οποίο πρέπει να απομονώσετε 3 τουλάχιστον μικροοργανισμούς: ένα βακτήριο, μία ζύμη και ένα μύκητα.

Αντικείμενα	Θρεπτικά Υποστρώματα	Μέθοδοι Απομόνωσης
Κωνικές φιάλες (100 ml)	MacConkey Άγαρ (McA) (εκλεκτικό υπόστρωμα εντεροβακτηρίων).	Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.
Δοκιμαστικοί σωλήνες	Malt Extract Άγαρ (MEA) (εκλεκτικό υπόστρωμα ζυμών).	Χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων.
Σωλήνες τύπου universal	Czapek-Dox Άγαρ (CzA) (εκλεκτικό υπόστρωμα μυκήτων).	Εμβολιασμός τρυβλίου αραιώνοντας το εμβόλιο με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα.
Σιφόνια (1ml, 10 ml)		Εμβολιασμός τρυβλίου διασπείροντας το εμβόλιο με διανομέα πάνω στο στερεοποιημένο άγαρ.
Τρυβλία Petri		

## Διαδικασία Εκτέλεσης της Άσκησης

### I. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων (20 ml)

- α) MacConkey Άγαρ, όπως στην 1η άσκηση  
 β) Malt Extraçt Άγαρ, (περιέχει: Malt extract broth 20g και άγαρ 15g ανά λίτρο)  
 γ) Czapek-Dox Άγαρ (περιέχει: διάλυμα βασικών αλάτων 100 ml (Πίνακας 1), γλύκοζη 30 g, άγαρ 15 g ανά λίτρο).

**Πίνακας 1:** Αναλυτικά τα συστατικά του διαλύματος των βασικών αλάτων

Άλας	Συγκέντρωση (g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
KCl	5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,10
ZnSO <sub>4</sub>	0,10
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,05

### II. Αποστείρωση

Τα θρεπτικά υποστρώματα τοποθετούνται σε 3 κωνικές φιάλες οι οποίες καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και αποστειρώνονται. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται τα καπάκια και αποστειρώνονται.

### III. Διαδοχικές αραιώσεις

Σε 7 αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται ασηπτικά 9 ml από το ήδη αποστειρωμένο διάλυμα Ringer. Σε αποστειρωμένο σωλήνα universal ο οποίος περιέχει 1g μη αποστειρωμένου χόματος προστίθενται 10 ml διαλύματος Ringer και ακολουθεί **ισχυρή** ανάδευση. Αναμένεται η καθίζηση των σωματιδίων του χόματος για 10-15 λεπτά της ώρας και στην συνέχεια 1ml εναιωρήματος δείγματος (αποφεύγεται η λήψη σωματιδίων χόματος) μεταφέρεται στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα (A) (αραίωση 10<sup>-1</sup>). Ύστερα από ισχυρή ανάδευση, 1ml εναιωρήματος από το σωλήνα (A) προστίθεται στον σωλήνα B (αραίωση 10<sup>-2</sup>) και κατά τον ίδιο τρόπο από το (B) στο σωλήνα (Γ) (αραίωση 10<sup>-3</sup>) κ.ο.κ. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως την αραιώση 10<sup>-7</sup> (Εικόνα 1).

Επιτυχής αραιώση θεωρείται εκείνη από την οποία προκύπτει καλλιέργεια 30-300 αποικιών βακτηρίων-ζυμών/τρυβλίο και 3-6 νηματοειδών μικροοργανισμών.

### IV. Εμβολιασμός σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα με τη μέθοδο της αραιώσης του δείγματος

Λαμβάνετε 1ml από την αραιώση 10<sup>-5</sup> και το μεταφέρετε σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο. Στη συνέχεια προσθέστε 20 ml McA (43 °C) στο τρυβλίο. Αμέσως ανακινήστε το τρυβλίο κυκλικά δεξιόστροφα, αριστερόστροφα, κάθετα και οριζόντια. Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία με θρεπτικό υπόστρωμα MEA και CzA.

Με την ανακίνηση των τρυβλίων επιδιώκεται ο πλήρης διαχωρισμός των μικροβιακών κυττάρων μεταξύ τους και η ανάπτυξη αποικιών από κάθε βιώσιμη αναπαραγωγική μονάδα, επιτυγχάνοντας έτσι την απομόνωση μικροβιακών στελεχών.

### V. Εμβολιασμός σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα με τη μέθοδο της διασποράς του εμβολίου πάνω στο στερεοποιημένο άγαρ

Από την αραιώση  $10^{-7}$  λαμβάνετε 1 ml και το διανέμετε πάνω στο στερεοποιημένο McA του τρυβλίου. Το ίδιο επαναλαμβάνετε για το τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό MEA και θρεπτικό CzA.

Τα τρυβλία επωάζονται σε επωαστικό κλίβανο των 30 °C.

### Καταγραφή Αποτελεσμάτων

Κατά τη διάρκεια των ημερών μετά το τρίωρο της άσκησής σας θα πρέπει:

- Τα τρυβλία που περιέχουν McA και MEA να αποσυρθούν από τον κλίβανο επώασης μετά από 24 και 36-48 ώρες αντίστοιχα. Μετά από επώαση 3-4 ημερών να αποσυρθούν τα τρυβλία που περιέχουν CzA ως θρεπτικό υπόστρωμα.

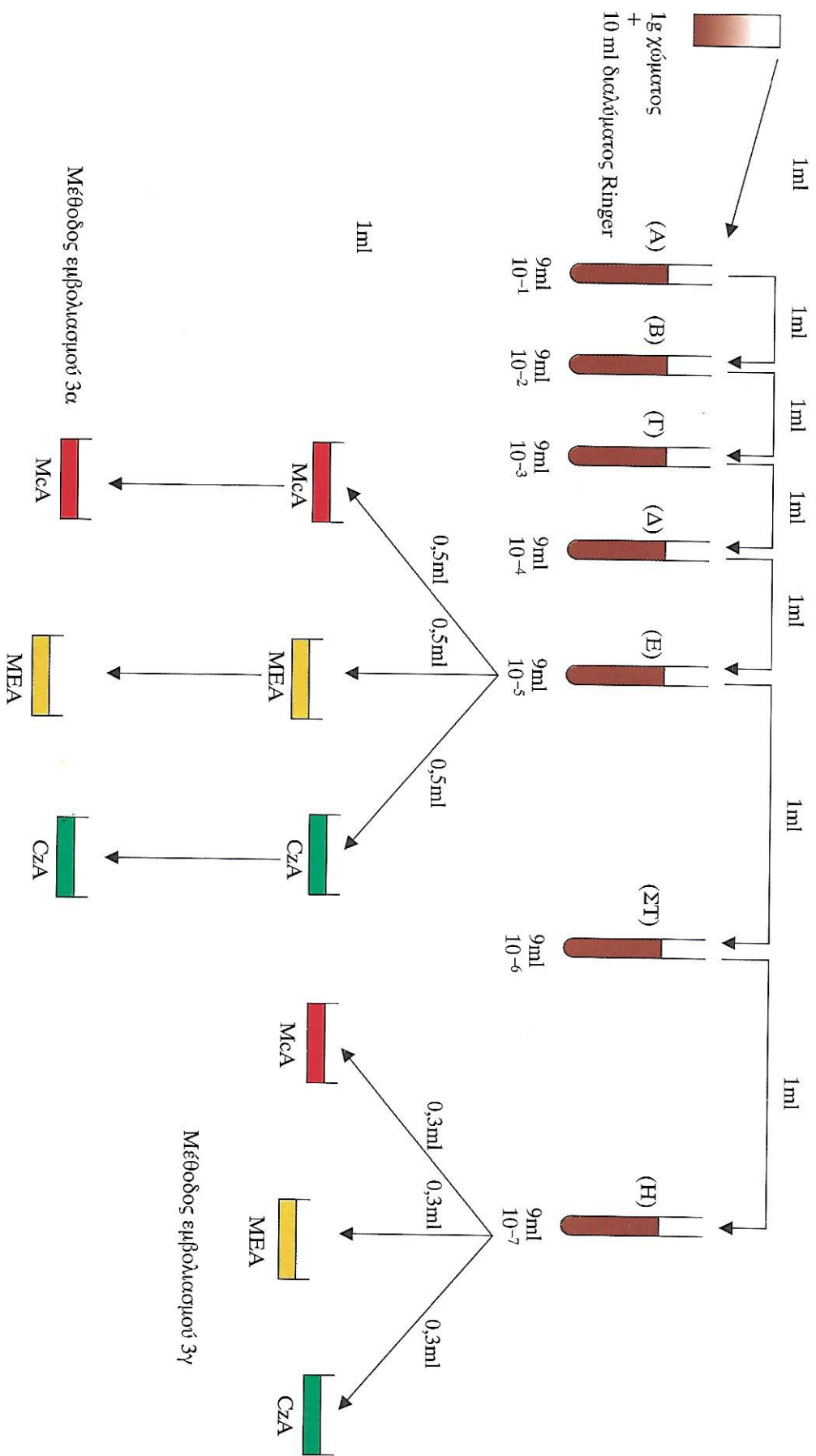
Στην επόμενη άσκηση θα γίνει παρατήρηση των αποτελεσμάτων ως εξής:

- Μακροσκοπική παρατήρηση (σε περιπτώσεις που απαιτείται χρησιμοποιείται η φωτεινή οθόνη του καταμετρητή αποικιών και το στερεοσκόπιο) για το διαχωρισμό των αποικιών. Μακροσκοπικά όμοιες αποικίες (ίδιο στέλεχος) δε θα πρέπει να διαφέρουν στο χρώμα, στο μέγεθος, στην υφή, στο σχήμα της περιφέρειας, στην οσμή κλπ.

Ακολουθεί επιλογή αποικιών με τη βοήθεια του επιβλέποντα και με τη χρήση του μικροσκοπίου (για την επιλογή βακτηρίου ή ζύμης) και εφαρμόζοντας τη μέθοδο των παραλλήλων γραμμών γίνεται εμβολιασμός νέων τρυβλίων που περιέχουν τα αντίστοιχα υποστρώματα. Οι μύκητες θα μεταφερθούν όπως περιγράφεται στη 2<sup>η</sup> άσκηση. Τις απόλυτα καθαρές καλλιέργειες διατηρήστε τις σε ψυγείο 4 °C για συστηματικό προσδιορισμό ο οποίος θα πραγματοποιηθεί σε επόμενη άσκηση.

Απομόνωση (Μικροβιακό στέλεχος)	Περιγραφή Μακροσκοπικών Χαρακτήρων
1	
2	
3	
4	
5	

Απομόνωση (Μικροβιακό στέλεχος)	Περιγραφή Μικροσκοπικών Χαρακτήρων
1	
2	
3	
4	
5	



Εικόνα 1. Απομόνωση μικροοργανισμών από εναιώρημα χυμάτος