



Εμβόλιο - Μέθοδοι εμβολιασμού

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εμβόλιο: είναι μικρή ποσότητα κυττάρων, ή σπορίων ενός μικροοργανισμού, ή μικρή ποσότητα εναιωρήματος μίγματος μικροοργανισμών.

Εμβολιασμός: είναι η διαδικασία ασηπτικής μεταφοράς του εμβολίου σε καθαρό, αποστειρωμένο υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Ως εμβόλιο είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν κύτταρα υγρής καλλιέργειας ή κύτταρα καλλιέργειας μικροοργανισμού που αναπτύσσεται πάνω σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Το εμβόλιο είναι δυνατό να μεταφερθεί ως έχει, απ' ευθείας από την καλλιέργεια, ή είναι δυνατό να μεταφερθεί ως εναιώρημα κυττάρων ή σπορίων εντός διαλύματος Ringer. Το διάλυμα Ringer είναι διάλυμα αλάτων το οποίο βοηθά στη σωστή συντήρηση των κυττάρων για μικρό χρονικό διάστημα. Η σύσταση του διαλύματος Ringer φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Σύσταση διαλύματος Ringer

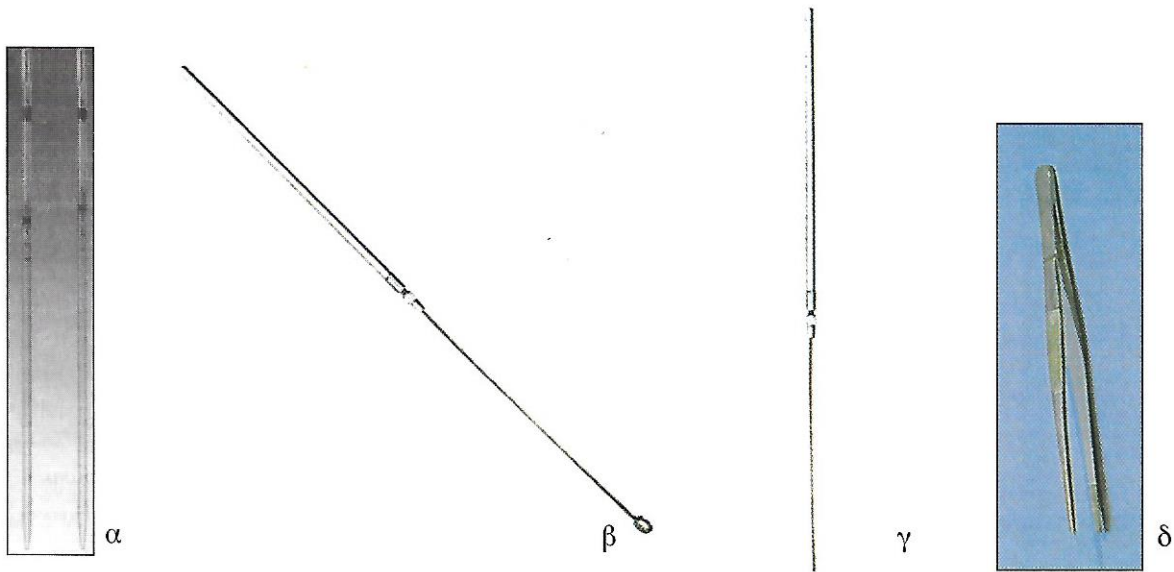
Άλας	Ποσότητα (g ^l)
NaCl	2,25
KCl	0,105
CaCl ₂	0,12
NaHCO ₃	0,05

Σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαίο να εκτιμηθεί το μέγεθος του εμβολίου (αριθμός κυττάρων ανά ml εναιωρήματος εμβολίου). Αυτό είναι εφικτό με την καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο φασματικό μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας βαθμολογημένη αντικειμενοφόρο πλάκα τύπου Neubauer.

Μέθοδοι εμβολιασμού

Χρήσιμα μικροβιολογικά εργαλεία για τη μεταφορά του εμβολίου είναι:

- α) Το **σιφόνιο**, όταν γίνεται μεταφορά εναιωρήματος κυττάρων ή σπορίων. Συνήθως χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό σπορίων των μυκήτων (Εικόνα 1α).
- β) Ο **κρίκος εμβολιασμού** για περίπτωση μεταφοράς από στερεή ή υγρή καλλιέργεια. Χρησιμοποιείται για όλες τις ομάδες μικροοργανισμών (Εικόνα 1β).
- γ) Η **ανατομική βελόνα** η οποία χρησιμοποιείται για τη μεταφορά στερεοποιημένης καλλιέργειας (Εικόνα 1γ).
- δ) Η **ανατομική λαβίδα** η οποία χρησιμοποιείται για τη μεταφορά στερεοποιημένης, συνήθως μυκηλιακής, καλλιέργειας (Εικόνα 1δ).



Εικόνα 1. Μικροβιολογικά εργαλεία εμβολιασμού. (α) Σιφόνιο, (β) κρίκος εμβολιασμού, (γ) ανατομική βελόνα, (δ) ανατομική λαβίδα

1. Μέθοδος παράλληλων γραμμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (streaking).

Η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη στα μικροβιολογικά εργαστήρια γιατί είναι αποτελεσματική. Χρησιμοποιείται για την απομόνωση αερόβιων μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια και οι ζύμες, όχι όμως για νηματοειδείς μικροοργανισμούς όπως οι μύκητες. Ως εργαλείο εμβολιασμού σ' αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ο κρίκος.

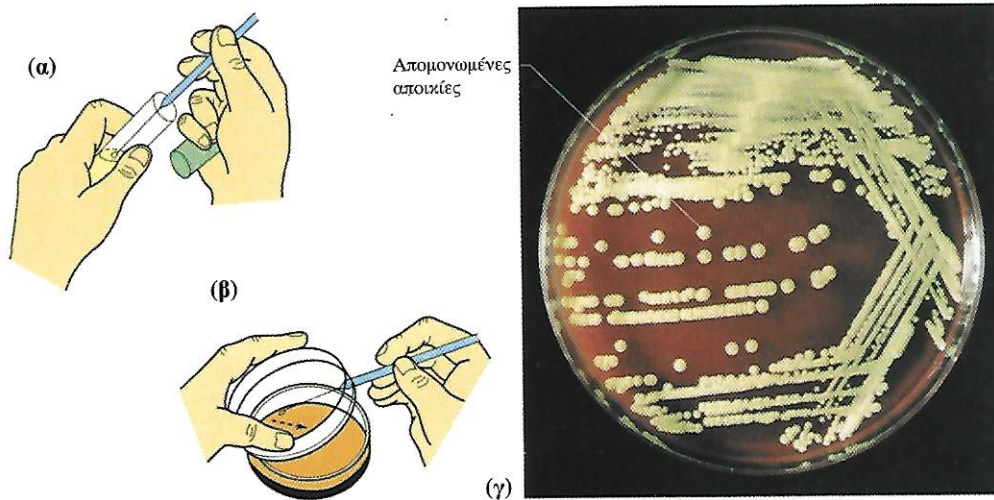
Υπάρχουν διάφοροι τρόποι χρήσης του κρίκου εμβολιασμού για τη δημιουργία των παράλληλων γραμμών πάνω σε στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα οριζόντιας ή κεκλιμένης επιφάνειας ενός τρυβλίου ή δοκιμαστικού σωλήνα αντίστοιχα (Εικόνα 2). Η διαδικασία περιλαμβάνει την καταγραφή ελικοειδών γραμμών πάνω στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος προς διάφορες κατευθύνσεις. Η διαδικασία γίνεται προσεκτικά ώστε να μη χαραχθεί η στερεά επιφάνεια του υποστρώματος.

Στην Εικόνα 3 απεικονίζεται η διαδικασία για οριζόντια επιφάνεια (α) και για κεκλιμένη επιφάνεια (β). Συγκεκριμένα:

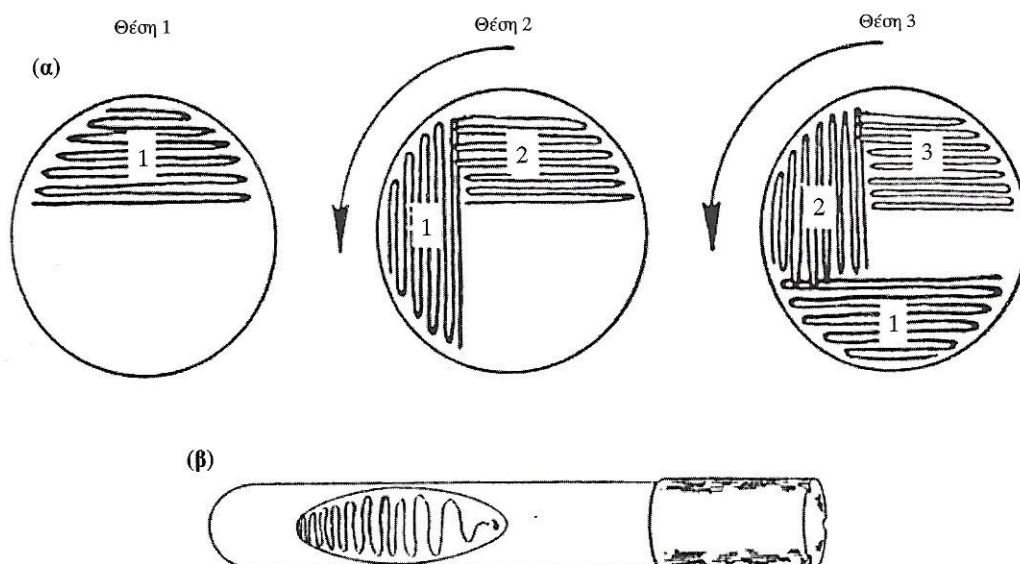
- Εμβολιάζεται η επιφάνεια του υποστρώματος κατά το πρώτο τεταρτημόριό της (θέση 1) δημιουργώντας παράλληλες γραμμές.

- Περιστρέφεται το τρυβλίο κατά 90° .
- Μετά την πυράκτωση του κρίκου και αφού ψυχθεί στην άκρη του υποστρώματος έρχεται σε επαφή με το άκρο (τέλος) της ελικοειδούς γραμμής του πρώτου τεταρτημορίου (θέση 2). Στη συνέχεια δημιουργούνται παράλληλες γραμμές, όπως προηγουμένως.
- Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για να εμβολιασθεί το τρίτο τεταρτημόριο (θέση 3).

Με τη διαδικασία αυτή το εμβόλιο αραιώνεται προοδευτικά και τελικά απομονωμένα κύτταρα αποθέτονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Κάθε κύτταρο δημιουργεί μία αποικία.



Εικόνα 2. Εμβολιασμός στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών. Εμβολιασμός (α) σε κεκλιμένη επιφάνεια και (β) σε τρυβλίο Petri. (γ) Απομονωμένες αποικίες σε τρυβλίο Petri.



Εικόνα 3. Εμβολιασμός στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών. (α) Διάφορες θέσεις του τρυβλίου κατά τον εμβολιασμό. (β) Εμβολιασμός σε κεκλιμένη επιφάνεια δοκιμαστικού σωλήνα με την ίδια μέθοδο.

II. Μέθοδος διασποράς των μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri.

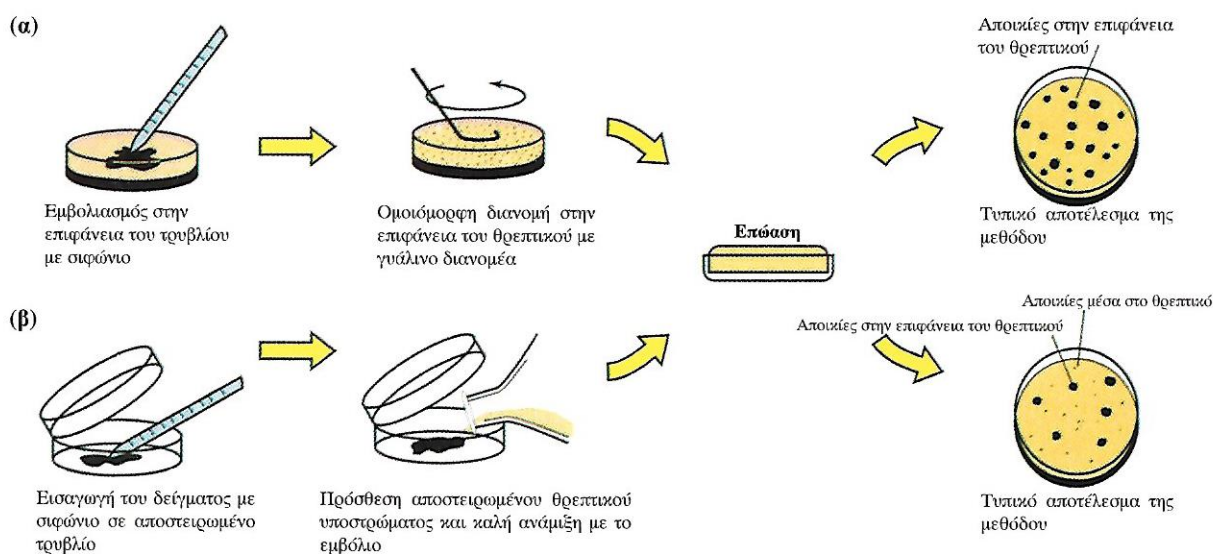
Πάνω σε στερεοποιημένο θρεπτικό άγαρ γίνεται εναπόθεση κάποιας μικρής ποσότητας εναιωρήματος μικροοργανισμών. Με τη χρήση διανομέα το εμβόλιο διασπείρεται πάνω στο θρεπτικό άγαρ όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4α.

III. Μέθοδος αραιώσης του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο Petri.

Αυτή η διαδικασία απαιτεί τηγμένο θρεπτικό άγαρ θερμοκρασίας περίπου 43 °C και είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους:

α) Ανάμιξη εναιωρήματος εμβολίου και θρεπτικού άγαρ εντός κωνικής φιάλης, ακολουθεί ανακίνηση και μεταφορά του μίγματος εντός του τρυβλίου.

β) Η απαιτούμενη ποσότητα του εναιωρήματος του μικροοργανισμού μεταφέρεται εντός άδειου αποστειρωμένου τρυβλίου. Στη συνέχεια ποσότητα 10 ml τηγμένου θρεπτικού άγαρ τοποθετείται εντός του ίδιου τρυβλίου και ακολουθεί ανακίνηση (προς όλες τις κατευθύνσεις: δεξιόστροφα, αριστερόστροφα, κάθετα και οριζόντια) για την καλύτερη ανάμιξη των μικροοργανισμών με το υπόστρωμα (Εικόνα 4β).



Εικόνα 4. Διανομή εμβολίου κάποιου μικροοργανισμού. (α) Μέθοδος διασποράς των μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri και (β) μέθοδος αραιώσης του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο Petri.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντικείμενα	Θρεπτικά Υποστρώματα (κατηγορία)	Μικροοργανισμοί
Δοκιμαστικός σωλήνας	MacConkey Άγαρ (McA)	Διαγνωστικό θρεπτικό υπόστρωμα για την <i>Escherichia coli</i>
Σιφόνιο (1ml)	MacConkey Broth (McB)	Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για εντεροβακτήρια.
Διανομέας	Czapek-Dox Άγαρ (CzA)	Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα μυκήτων.
Ανατομική βελόνα	Malt Extract Άγαρ (MEA)	Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα ζυμών.
Κρίκος εμβολιασμού	Θρεπτικός ζωμός	Γενικού σκοπού βακτηριακό θρεπτικό υπόστρωμα.
Τρυβλία Petri	Nutrient Agar (NA)	

Διαδικασία Εκτέλεσης της Άσκησης

1. Εμβολιασμός

Οι εμβολιασμοί των βακτηρίων και των μυκήτων θα γίνουν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Εμβόλιο	Μεταφορά Εμβολίου	Δοχείο Καλλιέργειας με Θρεπτικό Υπόστρωμα
1. <i>Aspergillus nidulans</i> στέλεχος AZAC από στερεή καλλιέργεια (κίτρινα σπόρια)	Με βελόνα ανατομίας και εναπόθεση του εμβολίου πάνω στο νέο υπόστρωμα.	1 τρυβλίο που περιέχει CzA
2. Εναιώρημα σπορίων <i>Aspergillus nidulans</i> , στέλεχος TMP (πράσινα σπόρια)	Με σιφόνιο (1 ml) και εναπόθεση μίας σταγόνας εμβολίου σε τρία διαφορετικά σημεία πάνω στο νέο υπόστρωμα. Προσοχή! οι σταγόνες πρέπει να είναι πολύ μικρές.	1 τρυβλίο που περιέχει CzA
3. Εναιώρημα κυττάρων <i>Streptomyces griseus</i> *	Με σιφόνιο (1ml) εναπόθεση 0,2 ml εμβολίου και διασπορά του εμβολίου με χρήση διανομέα.	1 τρυβλίο που περιέχει NA
4. Εναιώρημα κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	Εμβολιασμός με σιφόνιο (1ml), 0,5 ml εμβολίου.	1 δοκιμαστικός σωλήνας με υγρό θρεπτικό McB
5. Εναιώρημα μίγματος μικροοργανισμών	Εμβολιασμός με σιφόνιο (1ml), 0,2 ml εμβολίου εντός άδειου τρυβλίου και προσθήκη περίπου 15 ml τηγμένου θρεπτικού υποστρώματος.	1 τρυβλίο και 15 ml τηγμένου NA

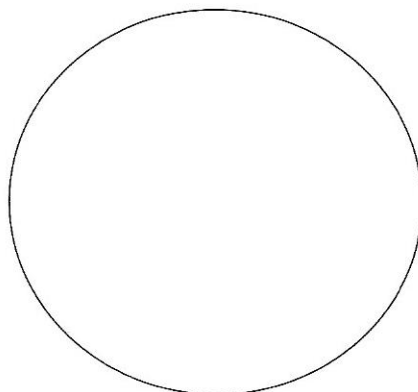
Εμβόλιο	Μεταφορά Εμβολίου	Δοχείο Καλλιέργειας με Θρεπτικό Υπόστρωμα
6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> από στερεά καλλιέργεια	Με κρίκο εμβολιασμού εφαρμόζοντας τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών (Εικ. 3α)	1 τρυβλίο που περιέχει ΜΕΑ
7. <i>Escherichia coli</i> από στερεά καλλιέργεια	Με κρίκο εμβολιασμού εφαρμόζοντας τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών (Εικ. 3α)	1 τρυβλίο που περιέχει ΜcΑ
8. <i>Pseudomonas sp.</i> από στερεά καλλιέργεια	Με κρίκο εμβολιασμού (Εικ. 3β)	1 δοκιμαστικός σωλήνας με θρεπτικό ΜcΑ υπό κλίση

* Η μέθοδος δεν ενδείκνυται στις περιπτώσεις εκείνες όπου στόχος του πειράματος είναι η απομόνωση νηματοειδών μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια.

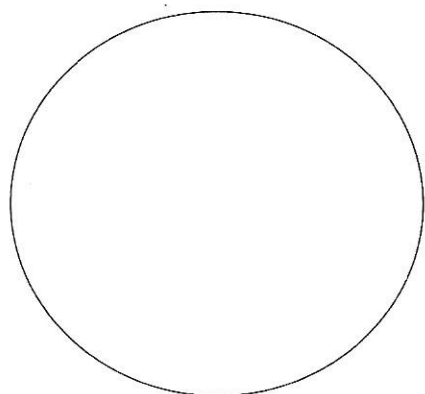
Μικροσκοπική παρατήρηση

II. Μικροσκοπική Παρατήρηση

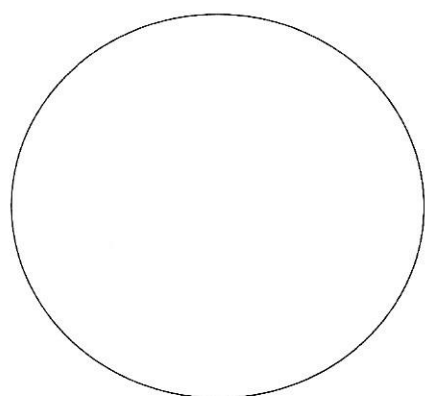
- Παρασκευάστε νωπά παρασκευάσματα: 1) νηματοειδούς μύκητα *Aspergillus nidulans*, 2) ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και 3) βακτηρίου *Escherichia coli*.
- Μικροσκοπική παρατήρηση σε φωτονικό μικροσκόπιο.
- Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας και κυρίως τις διαφορές μεγέθους και σχήματος μεταξύ των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων.



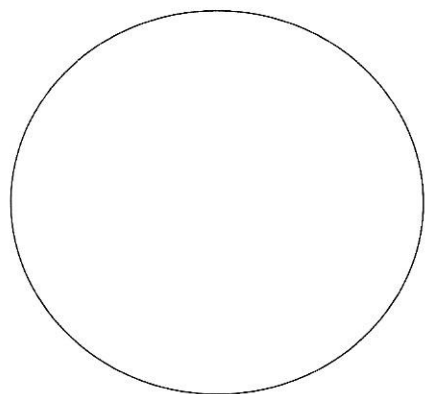
Aspergillus nidulans



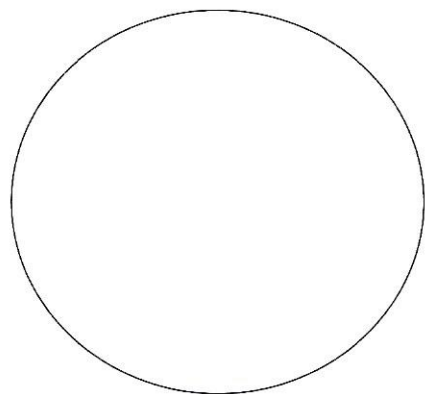
Saccharomyces cerevisiae



Escherichia coli



Streptomyces griceus



Pseudomonas sp.