

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΙΕΣ
ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΥΠΟ ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ.**



BET K.Βαρέλη

- Η σταθερή παροχή βιολογικού υλικού είναι απαραίτητη παράμετρος «επιβίωσης» για την εργαστηριακή έρευνα.
- Η ανάγκη αυτή οδήγησε στις **καλλιέργειες κυττάρων** σε εργαστηριακές συνθήκες, ώστε να υπάρχει διαθέσιμη η πρώτη ύλη εν αφθονία.
- Ο όρος «καλλιέργεια» όταν χρησιμοποιείται για τους ευκαρυωτικούς ή τους προκαρυωτικούς οργανισμούς εμπεριέχει συνήθως την έννοια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.
- Συνεπώς, όταν μιλάμε για καλλιέργειες κυττάρων στο εργαστήριο εννοούμε την ανάπτυξη των κυττάρων ή των οργανισμών σε απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου που μας δίνουν την δυνατότητα για μια συνεχή παροχή βιολογικού υλικού για τις μελέτες μας.

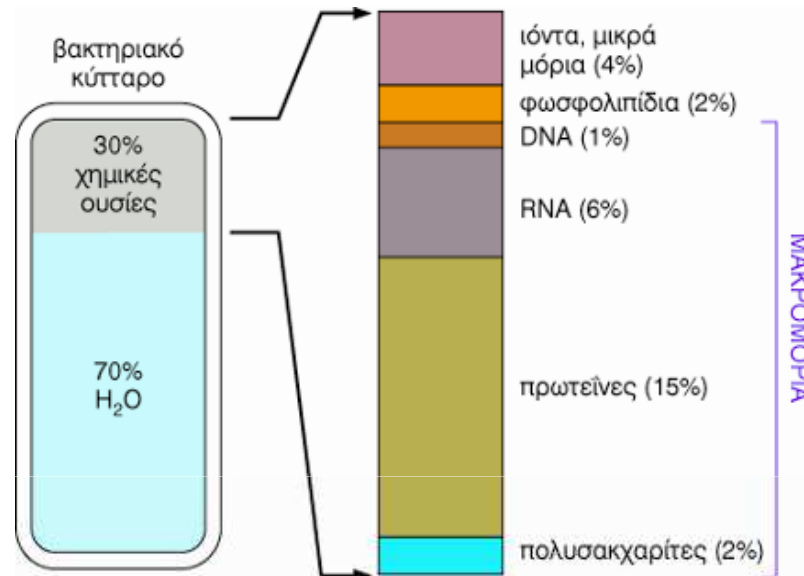
- Ο χειρισμός όλων των βιολογικών υλικών (προκαρυωτικά ή ευκαρυωτικά κύτταρα, αίμα, βιολογικά υγρά) συνήθως απαιτεί **ασηπτικές συνθήκες** εργασίας. Στόχος των ασηπτικών συνθηκών που εφαρμόζονται είναι η αποφυγή μολύνσεων, του προς μελέτη βιολογικού υλικού από εξωγενείς παράγοντες

- Για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων συνήθως απαιτούνται και εξειδικευμένοι χώροι εργασίας. Για παράδειγμα οι καλλιέργειες κυτταρικών σειρών που αποτελούν το κατεξοχήν κυτταρικό μοντέλο για μελέτες βιοχημικές, μοριακές, ανοσολογικές γίνονται σε εξειδικευμένους χώρους που ονομάζονται δωμάτια κυτταρικής καλλιέργειας. Οι χώροι αυτοί φέρουν κατάλληλο εξοπλισμό. Θάλαμο νηματικής ροής για την ελαχιστοποίηση των μολύνσεων, επωαστικούς κλιβάνους με σταθερή παροχή CO₂ για την ανάπτυξη των κυττάρων σε σταθερό pH κ.α.
- Αντίθετα οι καλλιέργειες βακτηρίων μπορούν να πραγματοποιηθούν υπό ασηπτικές συνθήκες, και σε περιβάλλον δωματίου.

Η άσκηση αυτή είναι προπαρασκευαστική για τις επόμενες ασκήσεις. Θα σας καταστήσει ικανούς σε χειρισμούς που σχετίζονται με την καλλιέργεια οποιουδήποτε προκαρυωτικού οργανισμού.

Σκοπός της άσκησης είναι να μάθετε να εργάζεστε υπό ασηπτικές συνθήκες προκειμένου:

- α. να παρασκευάσετε θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη προκαρυωτικών κυττάρων.
- β. να αναπτύξετε καλλιέργειες προκαρυωτικών κυττάρων.
- γ. να κάνετε έλεγχο της μικροβιακής χλωρίδας των χεριών σας



Ένα βακτηριακό κύτταρο αποτελείται από H₂O (70%) και από χημικές ουσίες(30%). Τέσσερα στοιχεία ο άνθρακας το υδρογόνο το οξυγόνο και το άζωτο αντιπροσωπεύουν το 96,5% της κυτταρικής μάζας και αποτελούν τους δομικούς λίθους για τη δημιουργία των μακρομορίων, στη συγκρότηση των οποίων συνεισφέρουν επίσης ο φώσφορος και το θείο.

Θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια βακτηρίων

α) Συνθετικά ή καθορισμένα θρεπτικά υλικά

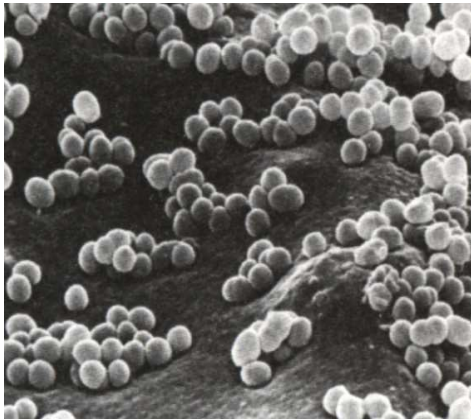
Μερικοί μικροοργανισμοί, ειδικά οι **φωτολιθοτροφικοί αυτότροφοι**, όπως τα **Κυανοβακτήρια**, μπορούν να αναπτυχθούν σε σχετικά απλά ως προς τη σύνθεση θρεπτικά υλικά. Τα υλικά αυτά πρέπει να περιέχουν CO₂ ως πηγή άνθρακα (συχνά με τη μορφή ανθρακικού νατρίου), νιτρικά άλατα ή αμμωνία, θειικά, φωσφορικά άλατα και διάφορα μεταλλικά ιόντα. Τέτοια θρεπτικά υλικά στα οποία όλα τα συστατικά είναι γνωστά, ονομάζονται καθορισμένα ή συνθετικά θρεπτικά υλικά.

β) **Σύνθετα θρεπτικά υλικά**

- Θρεπτικά υλικά τα οποία περιέχουν συστατικά άγνωστης χημικής σύνθεσης καλούνται **σύνθετα θρεπτικά υλικά**. Τέτοια θρεπτικά υλικά είναι πολύ χρήσιμα, καθώς είναι συνήθως τόσο πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, ώστε ικανοποιούν τις απαιτήσεις ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Επιπλέον ένα τέτοιο θρεπτικό υλικό είναι απαραίτητο στις περιπτώσεις όπου οι θρεπτικές απαιτήσεις ενός προς καλλιέργεια μικροοργανισμού είναι άγνωστες και ως εκ τούτου ένα καθορισμένο θρεπτικό υλικό δεν μπορεί να παρασκευασθεί.
- Τα θρεπτικά υλικά αυτού του τύπου περιέχουν άγνωστα ως προς την ακριβή τους σύνθεση συστατικά όπως οι **πεπτόνες**, το **εκχύλισμα κρέατος**, ή το **εκχύλισμα ζύμης**. Οι **πεπτόνες** είναι υδρολύματα πρωτεϊνών τα οποία προκύπτουν μετά από μερική πρωτεόλυση κρέατος, καζείνης, σόγιας, ζελατίνης και άλλων πρωτεϊνικών πηγών. Το **εκχύλισμα κρέατος** περιέχει αμινοξέα, πεπτίδια, οργανικά οξέα, βιταμίνες και μεταλλικά ιόντα. Το **εκχύλισμα ζύμης** περιέχει βιταμίνες και επίσης ενώσεις αζώτου και άνθρακα. Το θρεπτικό υλικό που θα χρησιμοποιήσουμε στο σημερινό εργαστήριο είναι ένα σύνθετο θρεπτικό υλικό το **L.B broth** (Luria, Bertrani broth).

Θρεπτικά υλικά υγρής και στερεής φάσης.

- Τα θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται με την διάλυση των κατάλληλων θρεπτικών συστατικών σε νερό.
- Αυτά τα θρεπτικά υλικά ονομάζονται **υγρής φάσης** και είναι απαραίτητα για την καλλιέργεια μικροοργανισμών όταν π.χ. σκοπός είναι η παραγωγή μεγάλης ποσότητας βιομάζας.
- Σε άλλες εφαρμογές, όπως για παράδειγμα στην καταμέτρηση αριθμού βακτηριακών κυττάρων ενός άγνωστου δείγματος, χρησιμοποιούνται θρεπτικά υλικά **στερεής φάσης**. Ένα υλικό στερεής φάσης προκύπτει όταν στο υγρό θρεπτικό υλικό προσθέσουμε την κατάλληλη ποσότητα **άγαρ**.



Φωτογραφία από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που δείχνει βακτήρια (*Micrococcus*) που αναπτύσσονται σε άγαρ.

- **Το άγαρ** είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης (αποτελείται κυρίως από D - γαλακτόζη, 3,6 – ανυδρο- L-γαλακτόζη και D – γλυκουρονικό οξύ). Η φυσική πηγή από την οποία εξάγεται το άγαρ είναι τα ερυθροφύκη.
- Η ικανότητά του να δρά ως στερεοποιητικός παράγοντας οφείλεται στην ιδιότητά του να τήκεται σε θερμοκρασία βρασμού του νερού και να στερεοποιείται όταν η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τους 40 – 42 °C.
- Από τη στιγμή που θα στερεοποιηθεί δεν ξανατήκεται εκτός εάν η θερμοκρασία υπερβεί τους 80 – 90 °C.
- Το άγαρ είναι επίσης ένας καλός στερεοποιητικός παράγοντας και για έναν άλλο λόγο: οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να το αποικοδομήσουν.



Θρεπτικό υλικό LB για ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων

Υγρής φάσης

1% τρυπτόνη

0,5% εκχύλισμα ζύμης

1% NaCl

Στερεής φάσης

1% τρυπτόνη

0,5% εκχύλισμα ζύμης

1% NaCl

1,5% αγαρ

Αποστείρωση θρεπτικών υλικών



Εργαστηριακό πρωτόκολλο

- **Ασηπτικές μέθοδοι εργασίας**
- Τα κύτταρα που θα αναπτύξετε σε όλες τις ασκήσεις είναι μη μολυσματικά και μη τοξικά. Παρόλα αυτά, δεδομένου ότι πρόκειται για βιολογικό υλικό, πρέπει να τα χρησιμοποιείτε με προσοχή. Επειδή μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού στο περιβάλλον, θα πρέπει σε κάθε πειραματική διαδικασία να λαμβάνονται μέτρα ώστε να αποκλείεται η επιμόλυνση του πειράματός σας με μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό:
 - i) ο χώρος εργασίας πρέπει να είναι σχολαστικά καθαρός,
 - ii) τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται να είναι αποστειρωμένα και
 - iii) όλοι οι χειρισμοί να είναι προσεκτικοί ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επιμόλυνση.

Γενικές οδηγίες.

Για να επιτευχθούν τα παραπάνω εφαρμόστε τα παρακάτω μέτρα:

- **1.** Φοράτε πάντα την εργαστηριακή σας μπλούζα.
- **2.** Πριν από την έναρξη κάθε άσκησης και κατά την διάρκειά της θα πρέπει να ξέρετε ακριβώς τι θα κάνετε. Αν έχετε αμφιβολίες απευθυνθείτε στο προσωπικό του Εργαστηρίου.
- **3.** Καθαρίστε στην αρχή και στο τέλος της άσκησης τον πάγκο σας με απολυμαντικό (αιθανόλη). Απομακρύνετε μετά την χρήση την αιθανόλη από τον πάγκο σας.
- **4.** Μην αφήνετε στον πάγκο σας αντικείμενα που έχουν έρθει σε επαφή με τα μικρόβια. Πετάξτε τα σε ειδικά δοχεία.
- **5.** Χρησιμοποιήστε την φλόγα για αποστείρωση αντικειμένων με ιδιαίτερη προσοχή σύμφωνα με τις οδηγίες του προσωπικού.
- **6.** Όταν παρατηρείτε αποικίες μικροοργανισμών σε τρυβλία με άγαρ μη τις πλησιάζετε πολύ κοντά στο πρόσωπό σας.
- **7.** Αποφύγετε οποιαδήποτε κίνηση που φέρνει σε επαφή τα χέρια με το στόμα (φαγητό, κάπνισμα) τα μάτια και γενικά το πρόσωπό σας.
- **8.** Πλύνετε τα χέρια σας μετά το τέλος της άσκησης.
- **9.** Οτιδήποτε συμβεί να το αναφέρετε στους υπεύθυνους των ασκήσεων.

A. Παρασκευή θρεπτικών υλικών και στερεής φάσης για την ανάπτυξη προκαρυωτικών κυττάρων

Παρασκευή τρυβλίων για την ανάπτυξη προκαρυωτικών κυττάρων (στερεή καλλιέργεια)

- Το θρεπτικό υλικό (LB/άγαρ) που θα χρησιμοποιήσετε έχει ήδη παρασκευαστεί και αποστειρωθεί. Διατηρείται σε υγρή μορφή στους 55 °C.
- Για να φτιάξετε τα τρυβλία σας υπό ασηπτικές συνθήκες ακολουθήστε προσεκτικά τα παρακάτω βήματα:
 1. Ανακινήστε προσεκτικά την φιάλη A για την ομογενοποίηση του περιεχομένου.
 2. Αφαιρέστε το πώμα της φιάλης
 3. Περάστε προσεκτικά και στιγμιαία το στόμιο της φιάλης πάνω από την φλόγα της λυχνίας.
 4. Εκχύστε προσεκτικά από την φιάλη στο τρυβλίο έναν όγκο υγρού (10-20ml).
 5. Περάστε προσεκτικά το στόμιο της φιάλης πάνω από την φλόγα της λυχνίας.
 6. Επαναλάβετε την διαδικασία μέχρι να πληρώσετε όλα τα τρυβλία σας.
 7. Αφήστε τα τρυβλία στον πάγκο **μέχρι να στερεοποιηθούν.**
 8. Αναστρέψτε τα

- **B. Ανάπτυξη προκαρυωτικών κυττάρων από φυσικές πηγές (δάκτυλα χεριών)**
 - ή πόσο καθαρά είναι τα χέρια μας.

1. Πάρτε ένα τρυβλίο και σημειώστε μια γραμμή στη μέση χωρίζοντας το σε δύο μέρη.
2. Ακουμπήστε τις άκρες των δακτύλων σας απαλά στην μισή επιφάνειά του .
3. Πλύνετε τα χέρια σας με σαπούνι.
4. Επαναλάβετε στην άλλη μισή επιφάνεια του τρυβλίου.
5. Επωάστε τα τρυβλία ανεστραμμένα στους 37 °C για όλη την νύχτα (τουλάχιστον 12 ώρες).

- **Αποτελέσματα**
- **Ανάπτυξη κυττάρων**
- Μετά από την επώαση των τρυβλίων , αυτά παραδίδονται στους φοιτητές ή μεταφέρονται από το προσωπικό του εργαστηρίου στο ψυγείο ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξη των βακτηρίων δεδομένου ότι αυτά θα πρέπει να συντηρηθούν για μία εβδομάδα έως ότου να πάρετε τα αποτελέσματά σας.
- Παραλαμβάνετε τα τρυβλία σας και παρατηρείτε τι εμφανίζεται σε αυτά χωρίς να τα ανοίγετε.
- Καταγράφετε τα αποτελέσματά σας για κάθε τρυβλίο.

Τρυβλίο

Δάκτυλα χεριών

Πλυμένα δάκτυλα χεριών

Δάκτυλα χεριών παρουσία αντιβιοτικού

Αριθμός αποικιών

Εφαρμογές των καλλιιεργειών στερεής φάσης

- Κάθε ζωντανό βακτηριακό κύτταρο που υπάρχει στο δείγμα που ελέγχουμε θα δώσει όταν αναπτυχθεί σε στερεό υπόστρωμα, δηλ. σε τριβλίο, σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης, μια **αποικία** η οποία θα είναι ορατή δια γυμνού οφθαλμού.
- Κάθε αποικία προέρχεται από τον πολλαπλασιασμό ενός και μόνο αρχικού κυττάρου.

Τρυβλίο με αποικίες



Τι σχέση έχουν οι αποικίες των βακτηρίων με τις αποικίες του *Volvox* που παρατηρήσατε στην πρώτη Εργαστηριακή άσκηση

- Συνεπώς ο αριθμός των αποικιών θα αντιστοιχεί στον αριθμό των ζωντανών βακτηρίων που υπήρχαν στο δείγμα που εξετάζουμε .
- Η ίδια συλλογιστική και τεχνική χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μέτρηση αριθμού βακτηρίων σε δείγματα τροφίμων, νερών εδάφους και γενικά σε όλες τις περιπτώσεις που απαιτείται έλεγχος μικροβιακής χλωρίδας..
- Ο ακριβής αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν σε οποιοδήποτε άγνωστο δείγμα, μπορεί να υπολογισθεί με βάση την ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε για τη σπορά και την ή τις ενδεχόμενες αραιώσεις (συνήθως όταν μετράμε υγρά). Οι αραιώσεις είναι απαραίτητες ώστε να μπορεί ο αριθμός των αποικιών να είναι προσιτός σε αρίθμηση τουλάχιστον σε ένα τρυβλίο. Η μέθοδος αυτή είναι απλή και εξαιρετικά ακριβής

Απομόνωση καθαρών καλλιιεργειών

- Στο φυσικό περιβάλλον, το κάθε βακτηριακό είδος συνυπάρχει και πολλαπλασιάζεται ταυτόχρονα με πολλά άλλα βακτηριακά είδη. Αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τη Μικροβιολογία γιατί ένα συγκεκριμένο είδος δεν μπορεί να μελετηθεί ικανοποιητικά όταν συμμετέχει σε έναν μικτό πληθυσμό. Για το λόγο αυτό απαιτείται μια καθαρή καλλιέργεια. Όταν λέμε **καθαρή καλλιέργεια** εννοούμε μια καλλιέργεια η οποία προήλθε από ένα και μόνο κύτταρο. Μόνο με τέτοιες καλλιέργειες μπορούμε να προχωρήσουμε στη μελέτη και το χαρακτηρισμό ενός συγκεκριμένου είδους.
- Το πόσο σημαντικές είναι οι καθαρές καλλιέργειες φαίνεται από το γεγονός ότι μετά την ανάπτυξή τους από τον Γερμανό Βακτηριολόγο Robert Koch (1882), χρειάστηκαν μόνο 20 χρόνια για να απομονωθούν τα πιο σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα βακτήρια.