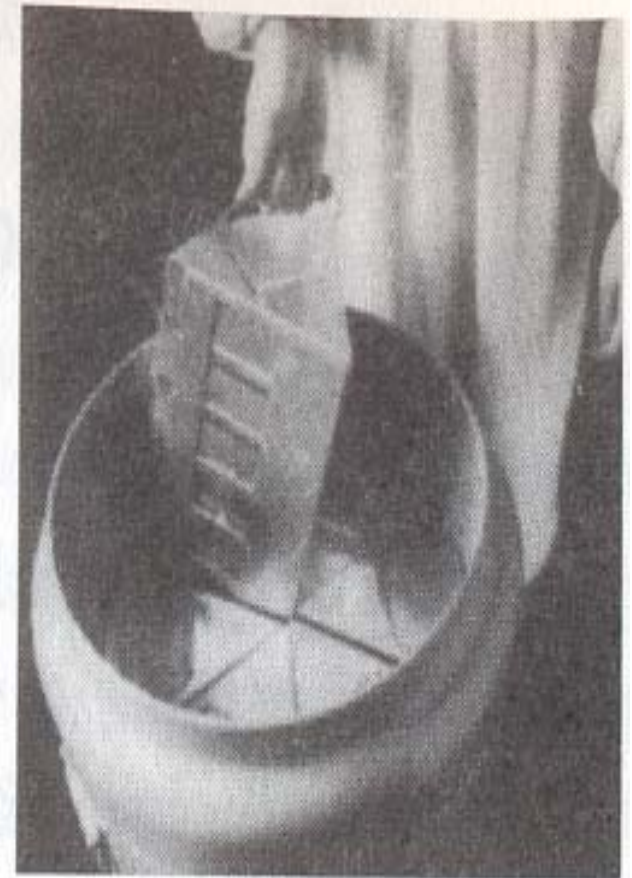
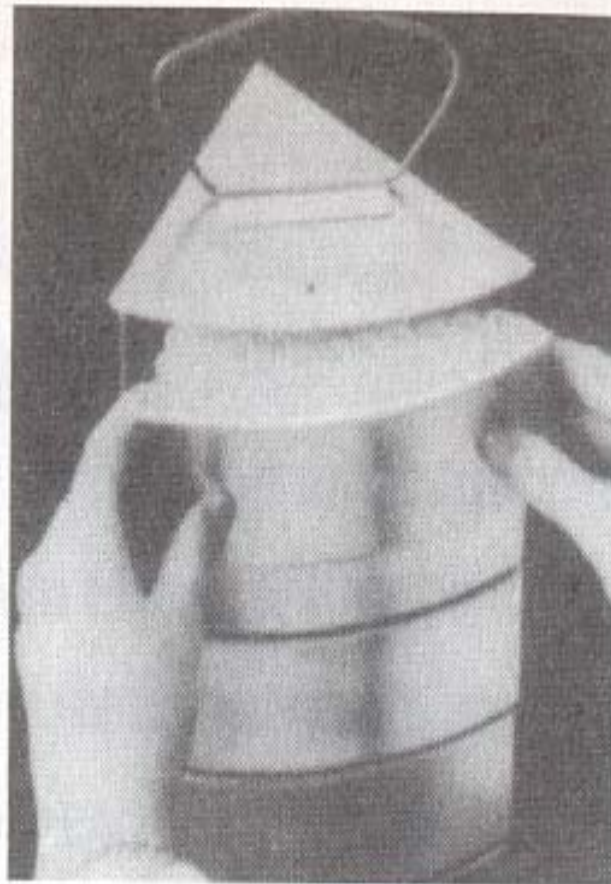


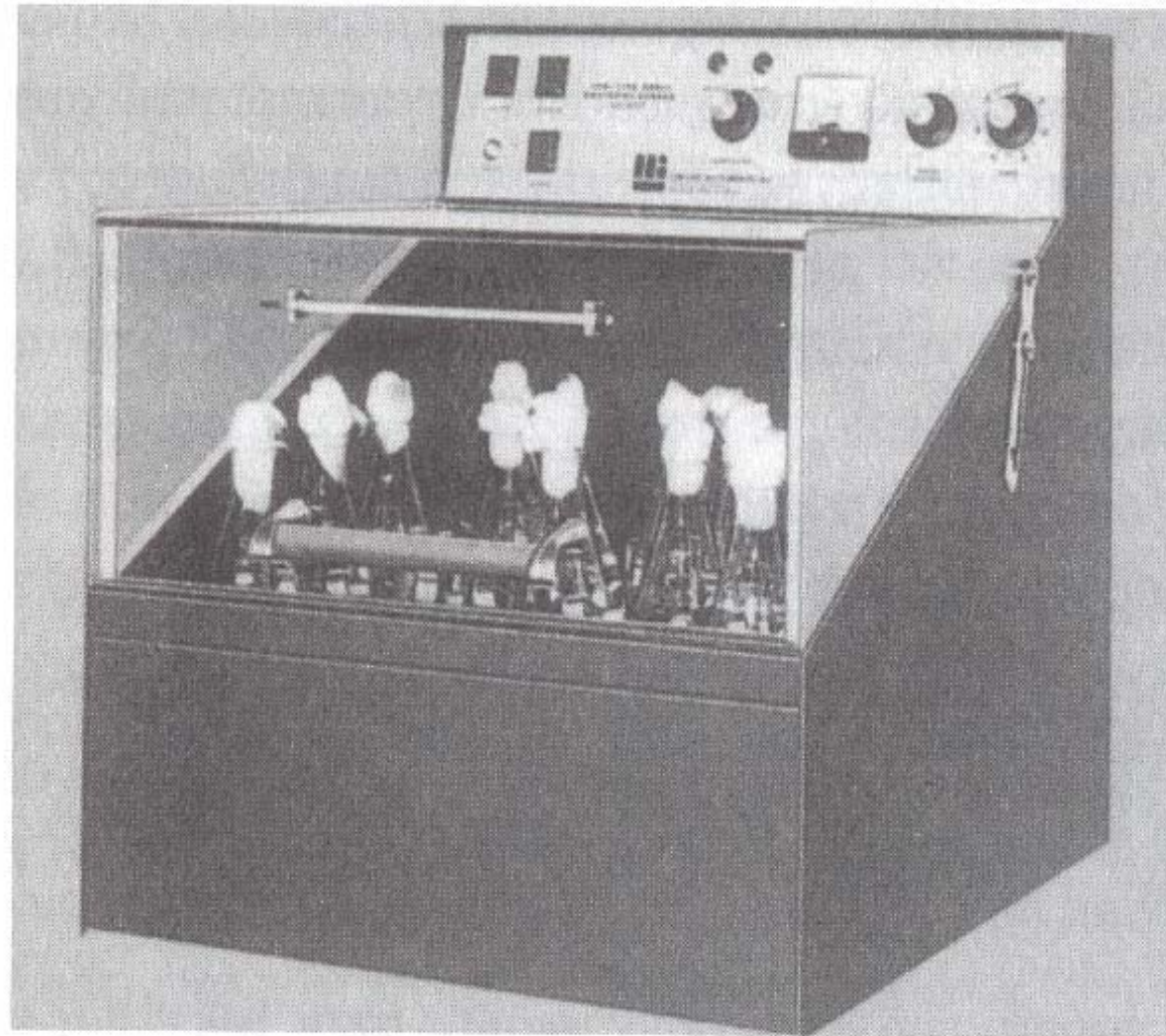
ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΜΕ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΕΠΙΠΕΔΟΥ 1,2,3
ή 4

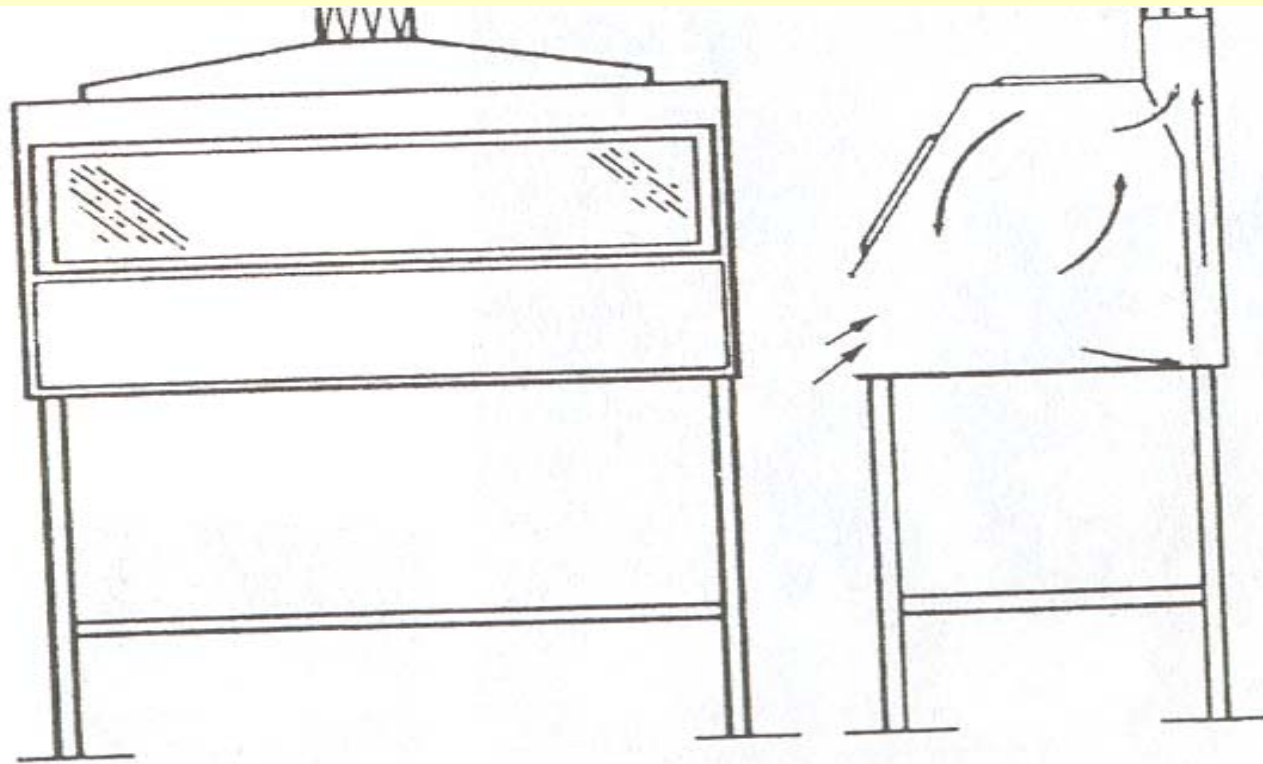
- ΧΩΡΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ
- ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ
 1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ
 2. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ,
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ, ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ, ΙΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
 3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
 4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
 5. ΕΞΑΣΦΑΛΙΣΗ ΑΣΗΠΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
 6. ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ



Σχήμα 1. Τράπεζα υγρού αζώτου.

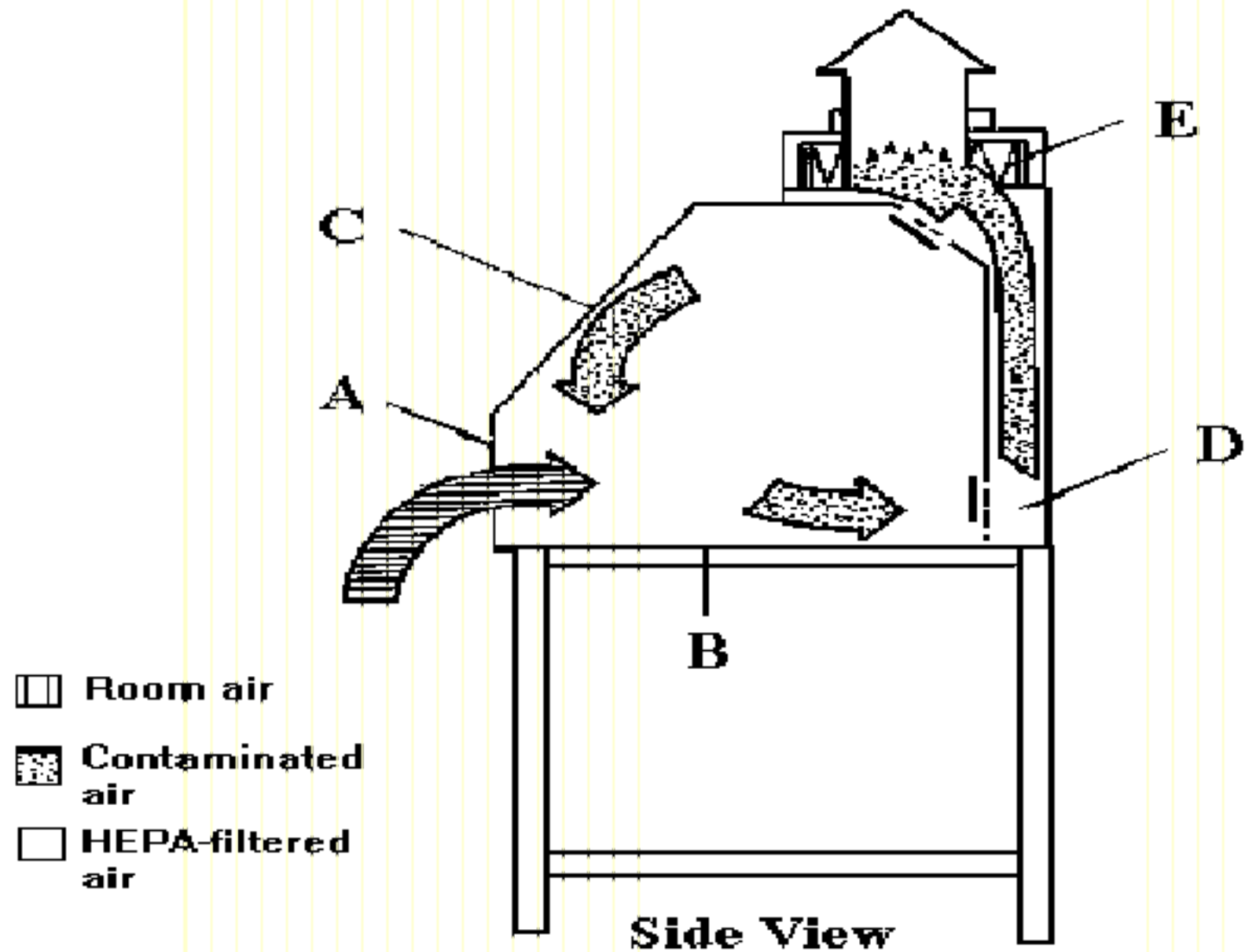


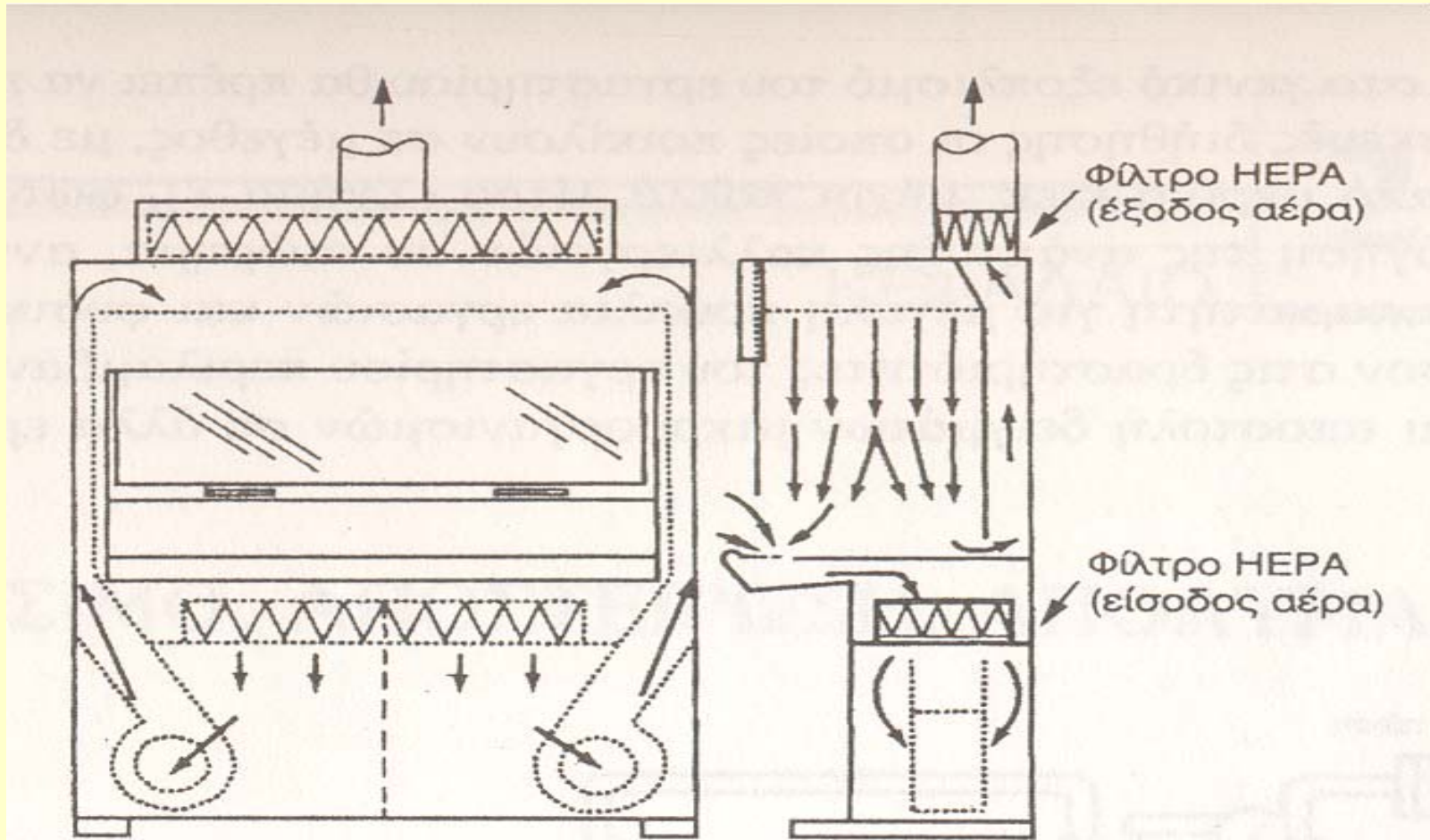
Σχήμα 2. Ανακινούμενος επωαστήρας στον οποίο προσαρμόζονται υποδοχείς για φιάλες καλλιεργειών διαφόρων μεγεθών.



Σχήμα 5. Απαγωγός στρωματικής ροής αέρα τύπου I.

Figure 1. Class I Biological Safety Cabinet.





Σχήμα 6. Απαγωγός στρωματικής ροής αέρα τύπου II.

Figure 2a. Class II, Type A Biological Safety Cabinet.

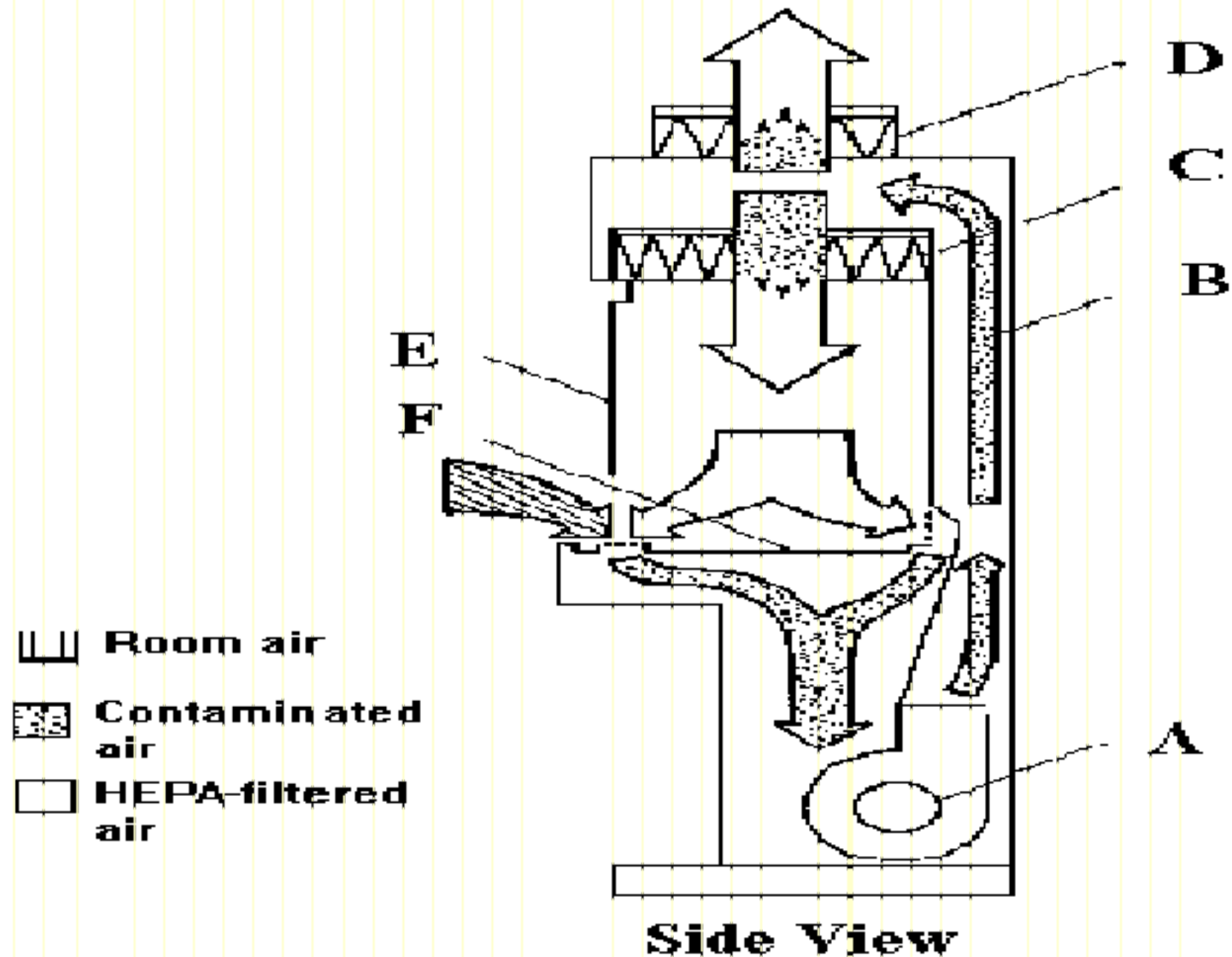


Figure 2b. Class II. Type B1 Biological Safety Cabinet

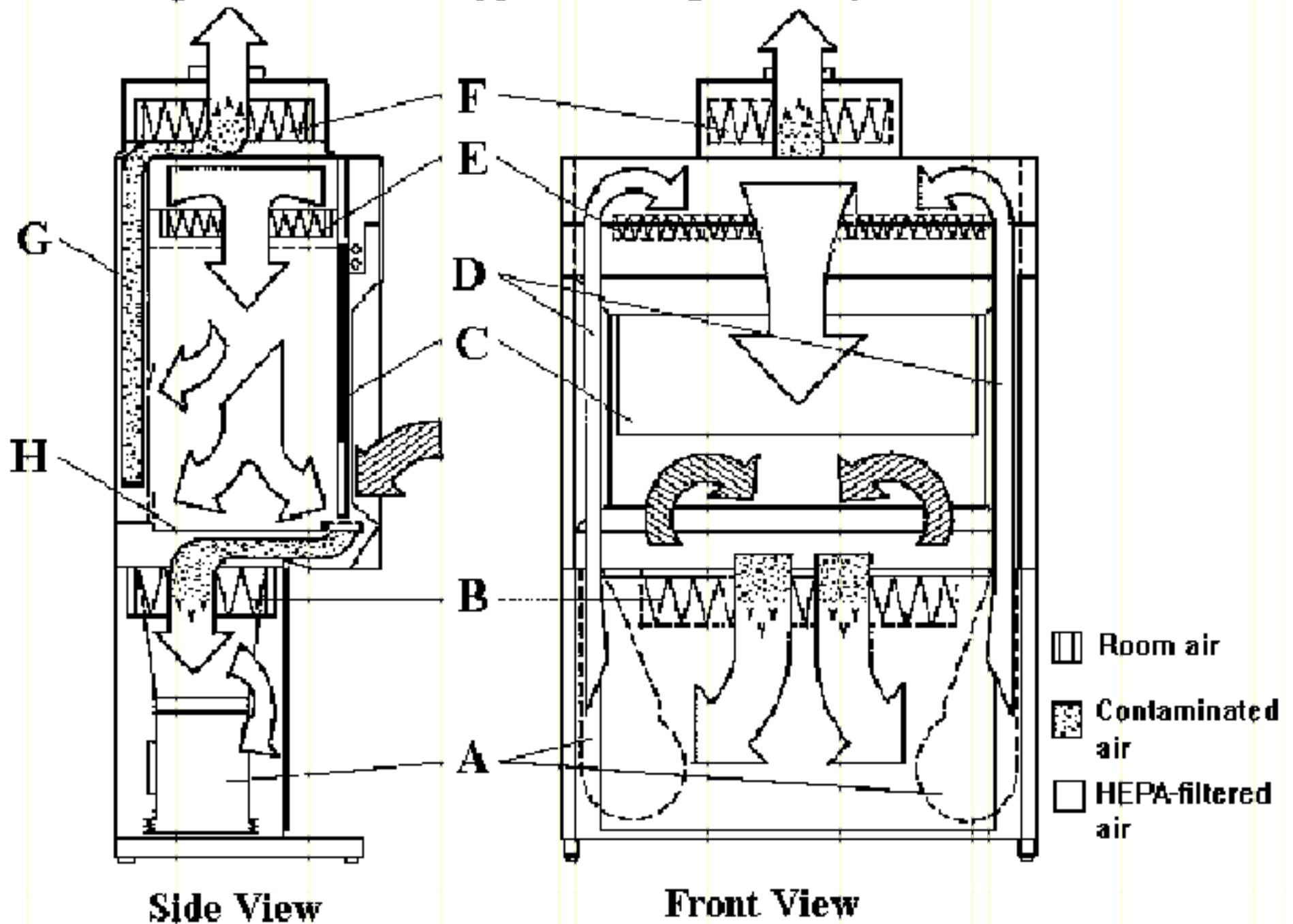


Figure 2c. Class II, Type B2 Biological Safety Cabinet.

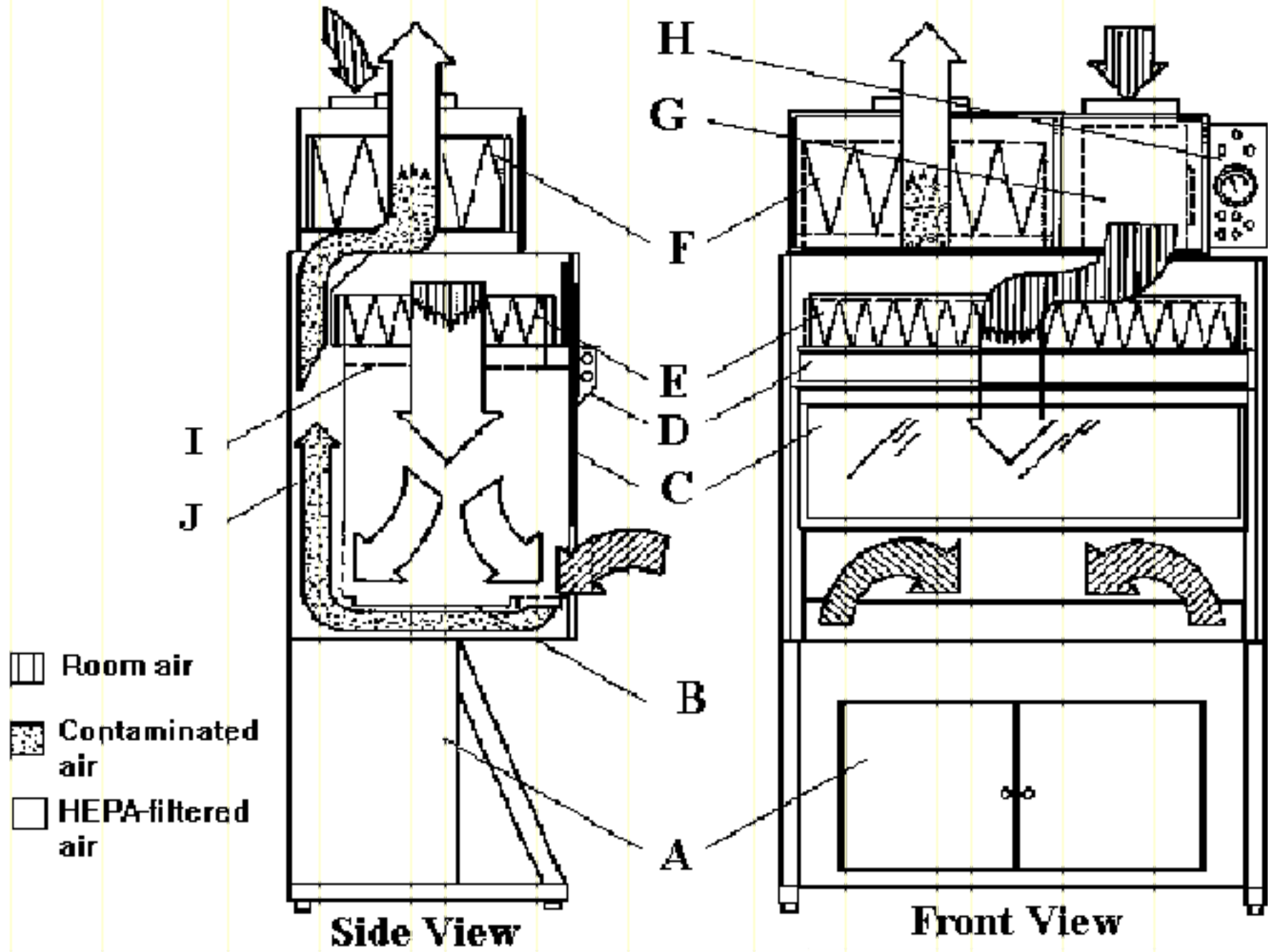
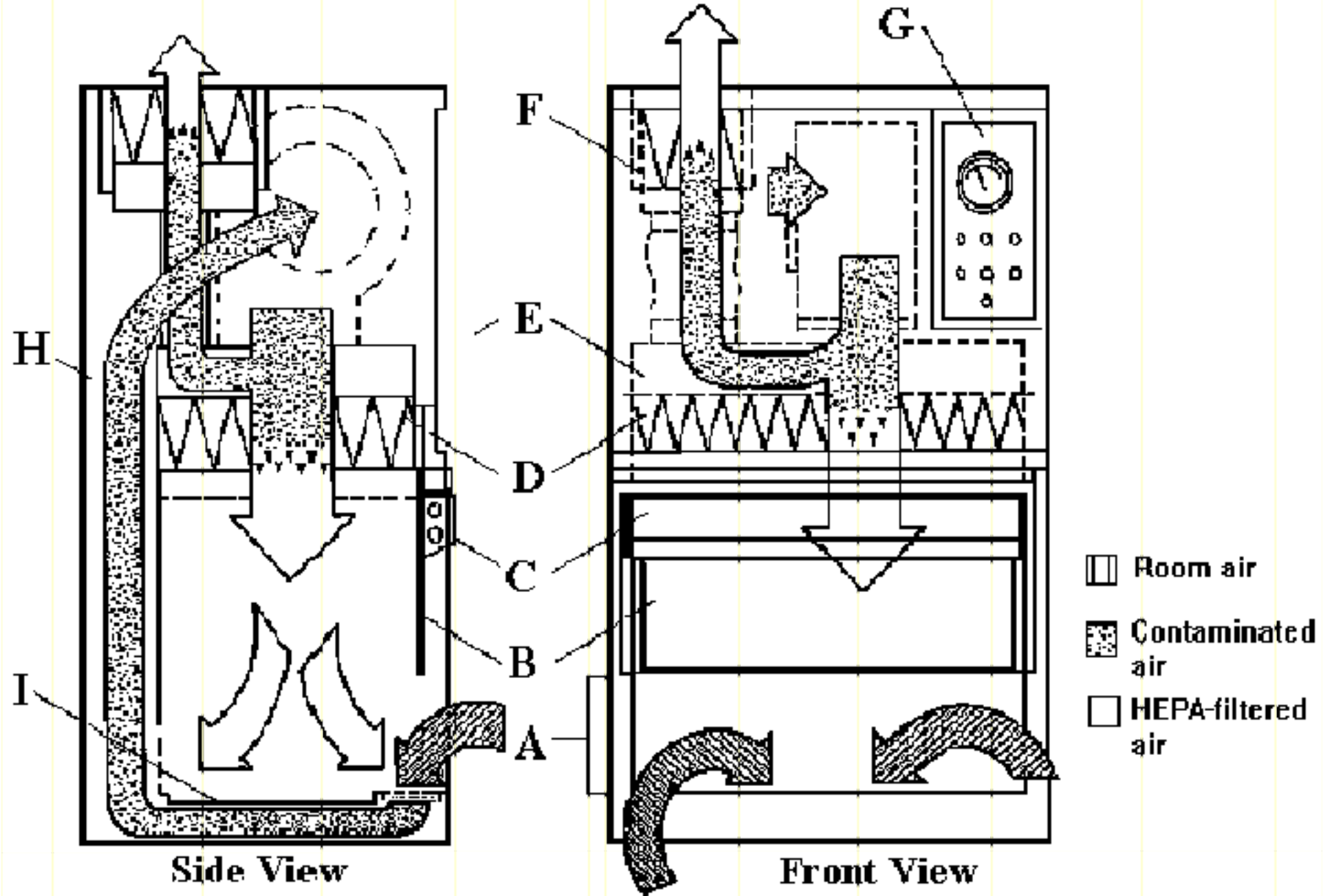
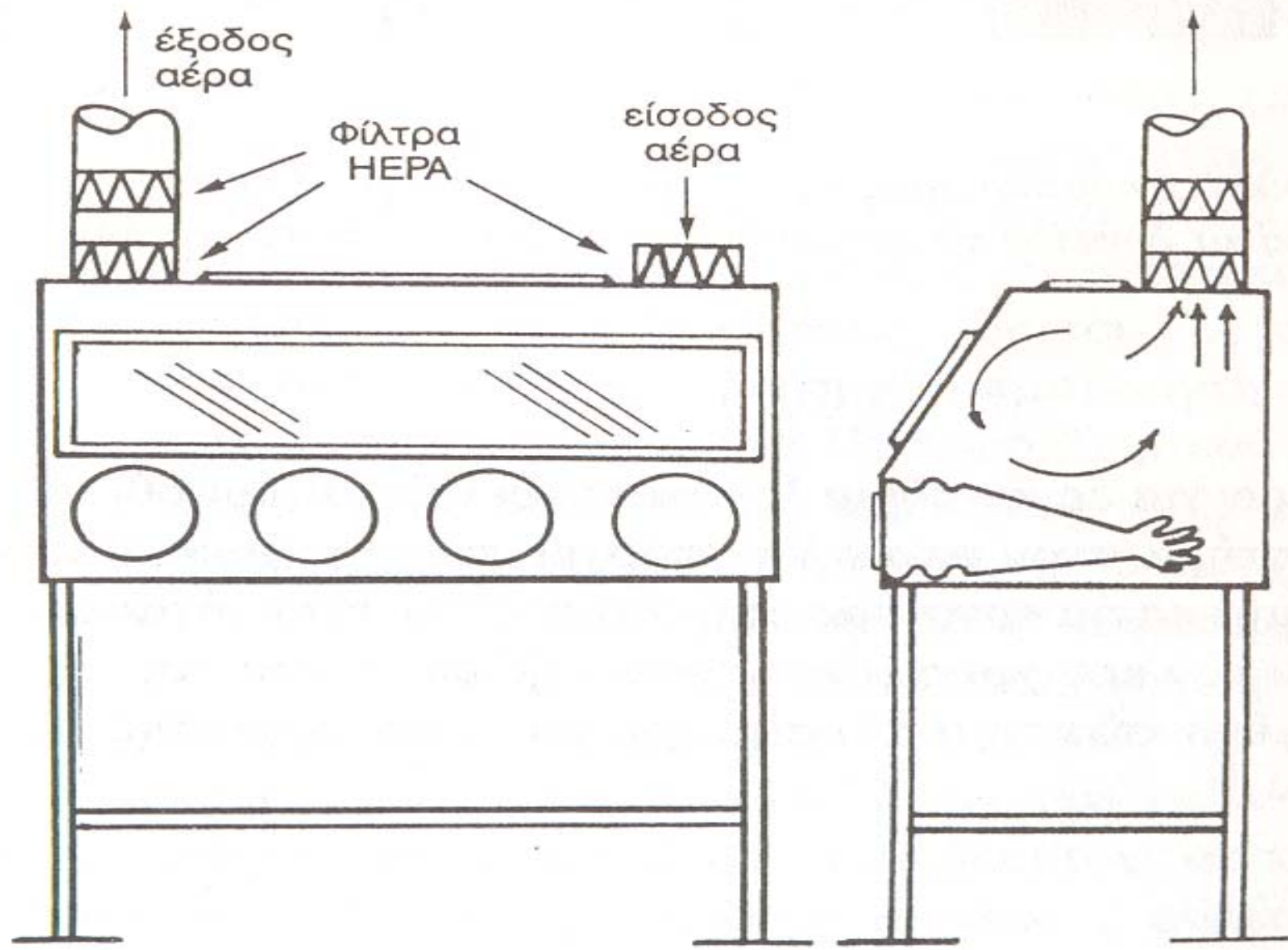


Figure 2d. Table-top model of a Class II, Type B3 Biological Safety Cabinet.





Σχήμα 7. Απαγωγός στρωματικής ροής αέρα τύπου III.

Figure 3. Class III Biological Safety Cabinet

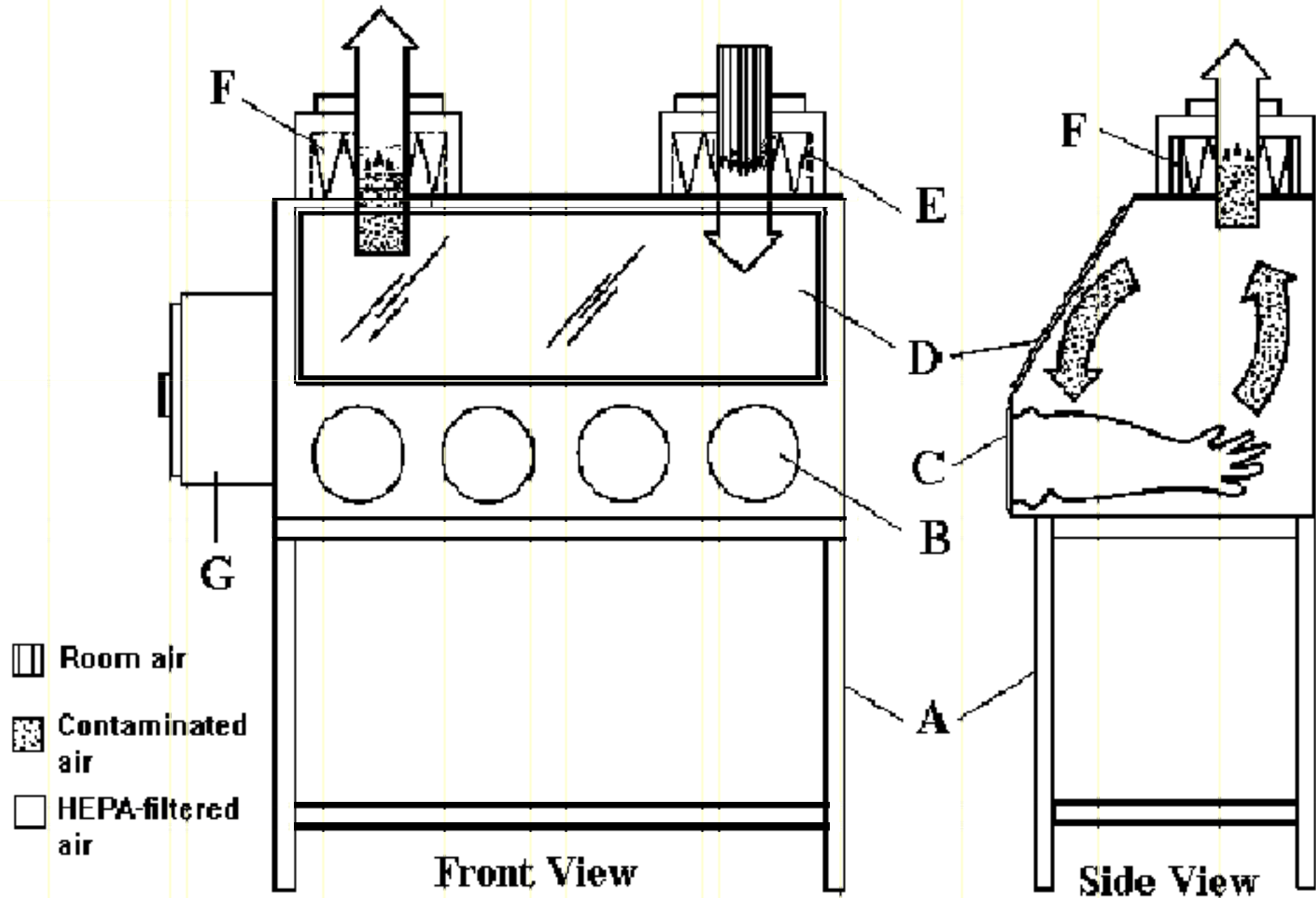
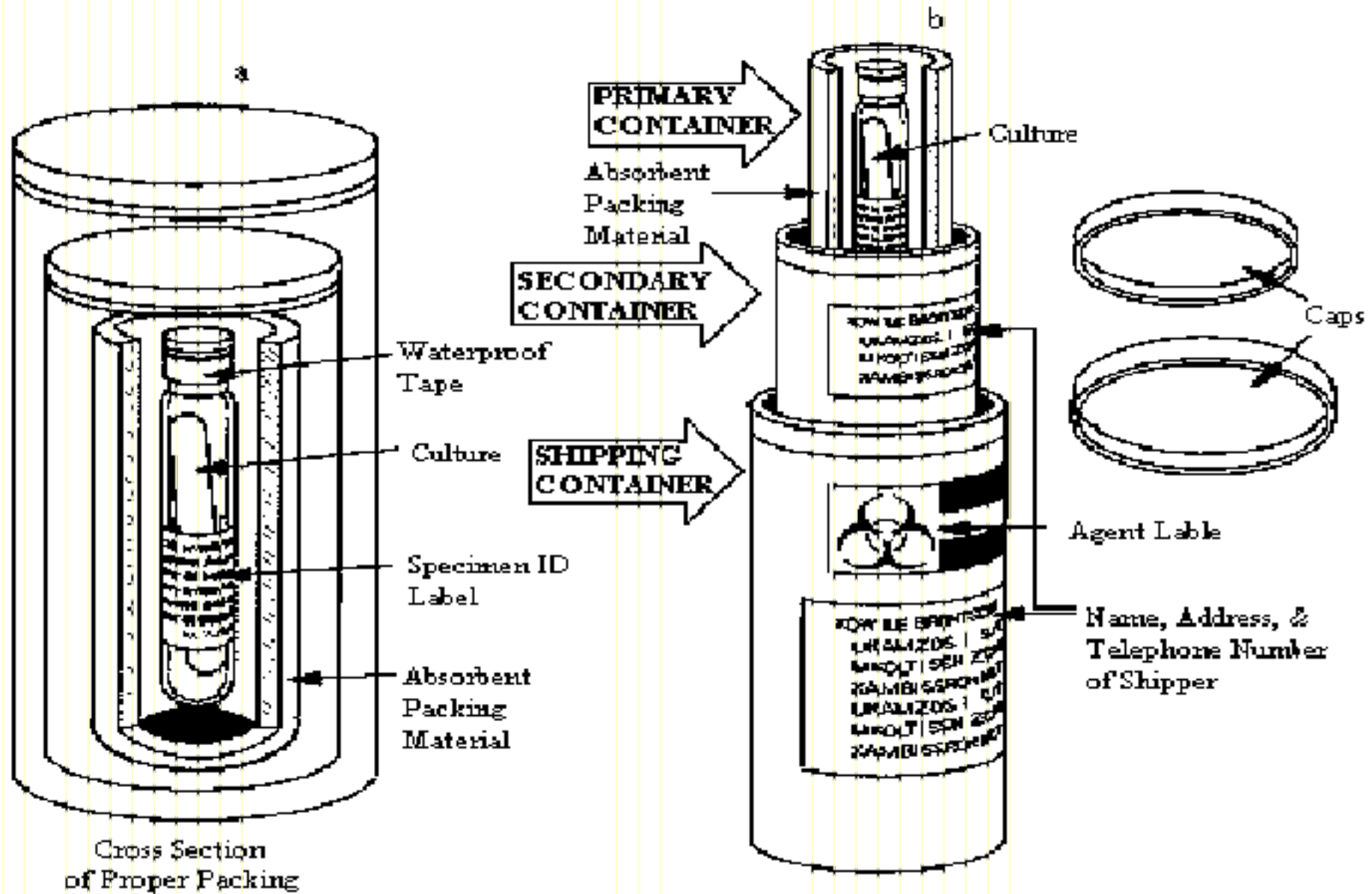


Figure 4. Packing and Labeling of Etiologic Agents



- ΘΕΜΑΤΑ ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
 - ΟΜΑΔΕΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
 - ΟΜΑΔΑ 1: ΑΚΙΝΔΥΝΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ
 - ΟΜΑΔΑ 2: ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΙ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΥΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
 - ΟΜΑΔΑ 3: ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΙ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΥΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ
 - ΟΜΑΔΑ 4: ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ. ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΛΗΨΗ ή ΘΕΡΑΠΕΙΑ

- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΜΕ ΑΣΦΑΛΕΙΑ
ΕΠΙΠΕΔΟΥ 1
- ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΜΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ
ΟΜΑΔΑΣ 1
- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΜΕ ΑΣΦΑΛΕΙΑ
ΕΠΙΠΕΔΟΥ 2
- ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΜΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ
ΟΜΑΔΑΣ 2 (*όλα τα σκουπίδια γίνονται ασφαλή πριν
την απόρριψή τους*)
- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΜΕ ΑΣΦΑΛΕΙΑ
ΕΠΙΠΕΔΟΥ 3
- ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΜΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ
ΟΜΑΔΑΣ 3

- ΣΥΝΕΧΗΣ ΡΟΗ ΑΕΡΑ ΠΡΟΣ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΑΕΡΑ ΜΕΣΩ ΦΙΛΤΡΩΝ (HEPA)
- ΟΛΕΣ ΟΙ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΣΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΣΤΙΕΣ ΤΥΠΟΥ II
- Η ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΟΥ ΑΕΡΑ ΓΙΝΕΤΑΙ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 2 ΕΝ ΣΕΙΡΑ ΦΙΛΤΡΑ HEPA
- ΌΛΑ ΤΑ ΑΧΡΗΣΤΑ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΝΟΝΤΑΙ

- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΜΕ ΑΣΦΑΛΕΙΑ

ΕΠΙΠΕΔΟΥ 4

- ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ 4

- ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΔΥΝΑΤΗ Η ΓΕΝΙΚΗ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ
- Η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΟΝΑΔΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΕΝΑ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟ ΜΕΡΟΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ. Η ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΙΝΕΤΑΙ ΜΟΝΟ ΜΕΣΩ ΚΛΕΙΣΤΟΥ ΘΑΛΑΜΟΥ ΟΠΟΥ ΓΙΝΕΤΑΙ Η ΑΛΛΑΓΗ ΡΟΥΧΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΥΠΑΡΧΕΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΝΤΟΥΖ.
- ΠΡΟΣΘΕΤΟΣ ΠΡΟΘΑΛΑΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΣΥΣΚΕΥΩΝ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΔΕΝ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΘΟΥΝ ΣΤΟ ΑΥΤΟΚΑΥΣΤΟ.
- ΟΙ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΙΝΑΙ ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ ΔΥΟ ΚΑΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΟΡΑΤΟΙ ΑΠΕΞΩ.
- ΑΛΛΑΓΗ ΡΟΥΧΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΞΟΔΟ ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ. Ο ΡΟΥΧΙΣΜΟΣ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΝΕΤΑΙ ΚΑΙ ΟΙ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΙ ΚΑΝΟΥΝ ΝΤΟΥΖ
- ΟΙ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΜΑΣΚΕΣ ΕΙΝΑΙ ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΕΣ

- ΟΛΕΣ ΟΙ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΜΕ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΣΤΙΕΣ ΤΥΠΟΥ Π.ΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΓΑΝΤΙΑ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΑ ΣΤΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΤΗΣ ΕΣΤΙΑΣ.
- ΌΛΑ ΤΑ ΥΛΙΚΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΑΣΦΑΛΗ ΠΡΙΝ ΜΕΤΑΦΕΡΘΟΥΝ ΕΞΩ ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΒΑΘΜΟΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ	
Actinobacillus actinoides	2	
Bacillus anthracis	3, 4	
Bartonella bacilliformis	2	
Brucella	3	
Clostridium botulinum	3	
Clostridium tetani	2	
Coxiella burnetti	3	
Escherichia coli	2	
Mycobacterium tuberculosis	3	
Rickettsia rickettsii	3	
Salmonella typhi	3	
Staphylococcus aureus	2	
Streptococcus	2	
Vibrio cholerae	2	
Aspergillus fumigatus	2	
Histoplasma	3	
Microsporium	2	
Echinococcus	3	
Entamoeba histolytica	2	
Leishmania	3	

<p style="text-align: center;">ARENAVIRIDAE Junin, Lassa , Machupo</p>	<p style="text-align: center;">4</p>	
<p style="text-align: center;">FILOVIRIDAE Ebola, Marburg</p>	<p style="text-align: center;">4</p>	
<p style="text-align: center;">HERPESVIRIDAE Herpes saimirii HSV-1,HSV-2, VZV, CMV,EBV</p>	<p style="text-align: center;">4 2,3</p>	
<p style="text-align: center;">PICORNAVIRIDAE Polioviruses</p>	<p style="text-align: center;">2,3,4</p>	
<p style="text-align: center;">RETROVIRIDAE HIV-1&2 , HTLV-1&2</p>	<p style="text-align: center;">3,4</p>	
<p style="text-align: center;">RHABDOVIRIDAE</p>	<p style="text-align: center;">3</p>	

- ΠΛΥΣΙΜΟ, ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ,
ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ
- ΠΛΥΣΙΜΟ ΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΩΝ
- ΤΑ ΚΑΙΝΟΥΡΓΙΑ ΓΥΑΛΙΝΑ ΣΚΕΥΗ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΒΥΘΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΑΡΚΕΤΕΣ ΩΡΕΣ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ 1% ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΝΑ ΞΕΠΛΕΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΦΘΟΝΟ ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΝΕΡΟ ΚΑΙ ΕΝ ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΝΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΝΟΝΤΑΙ

- ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ-ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ

- ΜΕ ΘΕΡΜΑΝΣΗ

- ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΑΕΡΙΑ

- ΔΙΗΘΗΣΗ

- ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ

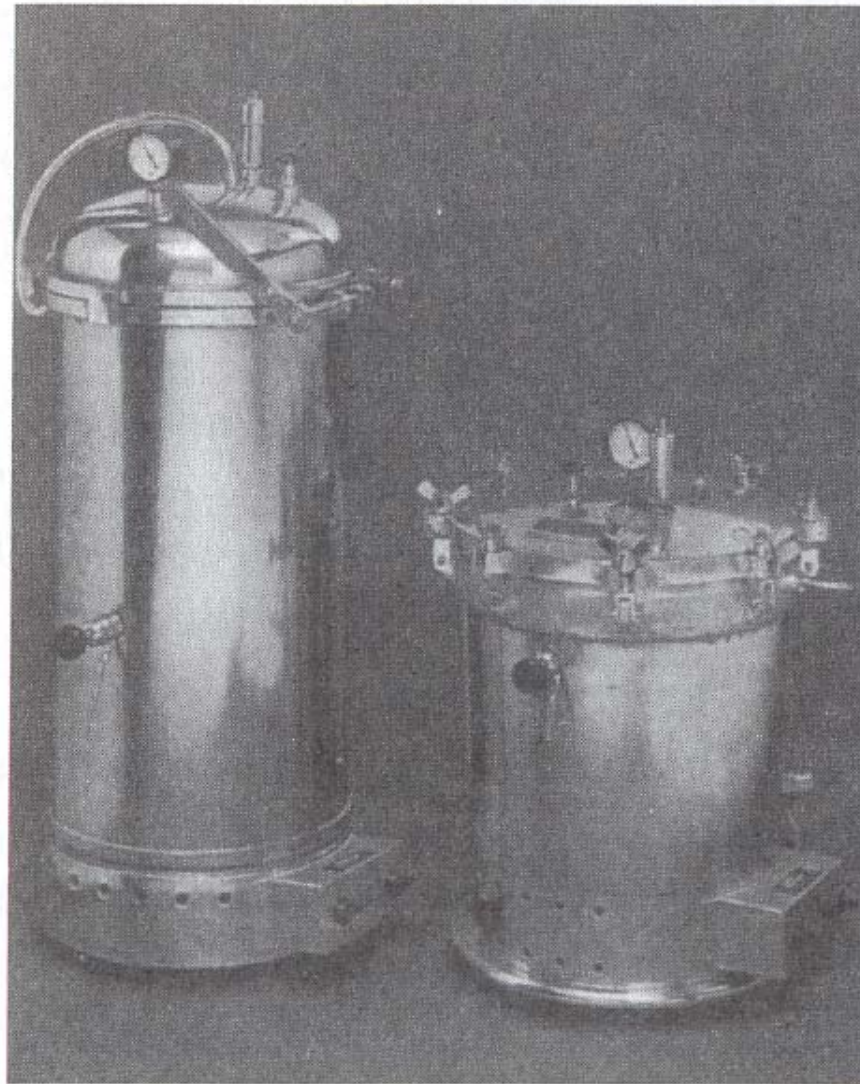
- ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΕΣ

- ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ
- ΞΗΡΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ (ΠΥΡΑΚΤΩΣΗ)

140 0C ΓΙΑ 3 ΩΡΕΣ –170 0 C ΓΙΑ 1 ΩΡΑ

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ
ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ ΤΩΝ
ΥΔΡΑΤΜΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ ΠΟΥ ΑΝΤΕΧΟΥΝ ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

- **ΥΓΡΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ**
- ΔΕΝ ΠΡΟΥΠΟΘΕΤΕΙ ΥΨΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ- ΔΕΝ ΕΦΑΡΜΟΖΕΤΑΙ ΣΕ ΑΔΙΑΒΡΟΧΑ ΥΛΙΚΑ
- ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ (ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΥΓΡΩΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΤΩ ΤΩΝ 100 °C. Η ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΣΤΟΥΣ 65-70 °C ΟΔΗΓΕΙ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΜΕΣΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.
- ΑΥΤΟΚΑΥΣΤΟ (ΟΣΟ ΠΙΟ ΜΕΓΑΛΗ Η ΠΙΕΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΑΤΜΩΝ ΣΤΟ ΑΥΤΟΚΑΥΣΤΟ ΤΟΣΟ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΚΑΙ Η ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΟΥΣ. ΣΕ ΌΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΔΥΝΑΤΗ Η ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΕΡΑ ΤΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΤΟΥΣ ΜΕ ΥΔΡΑΤΜΟΥΣ



Σχήμα 9. Απλά αυτόκαυστα για την εξυπηρέτηση μικρών μικροβιολογικών εργαστηρίων.



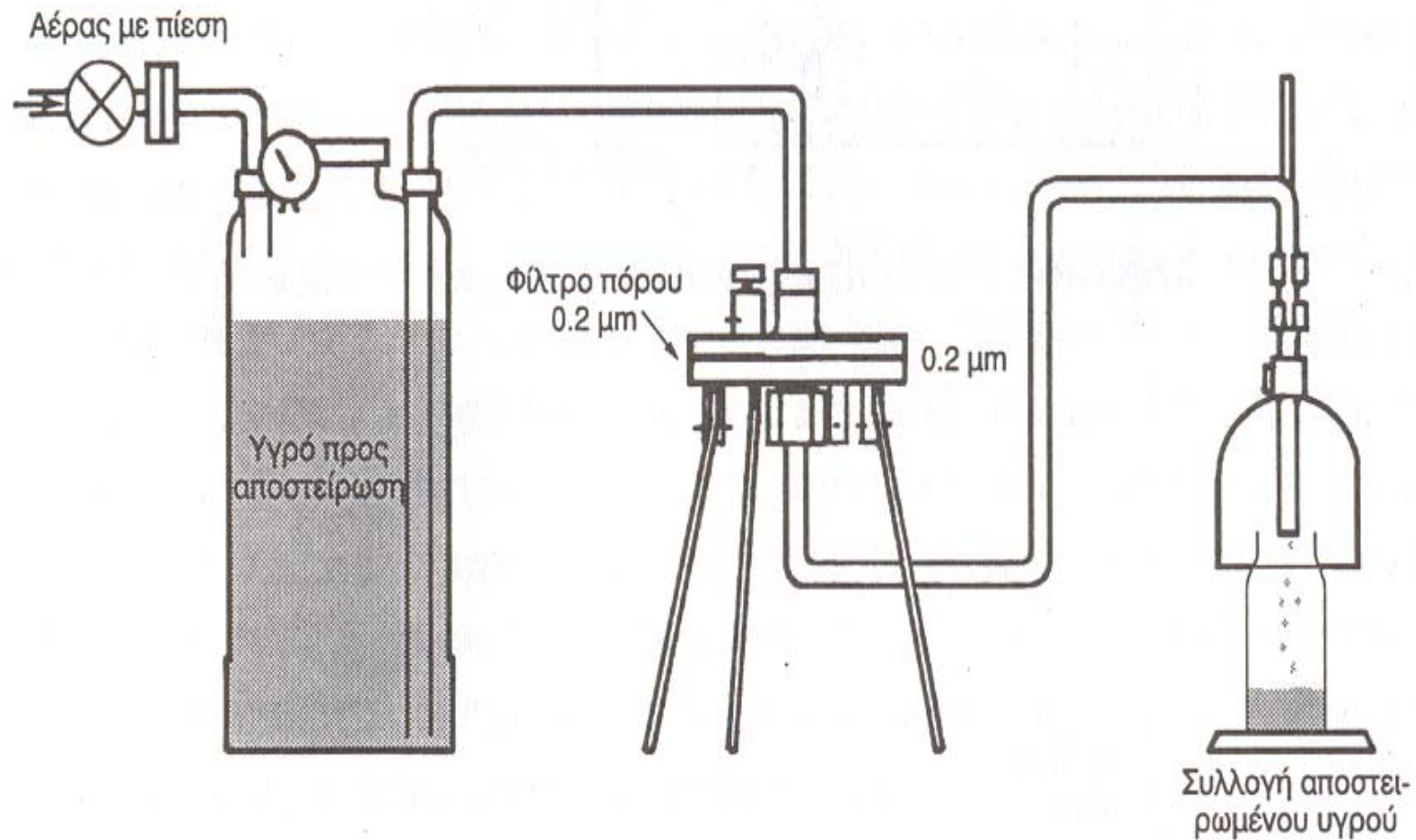
Πίνακας 1. Συνθήκες αποστείρωσης με υγρή θέρμανση

Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)	Πίεση	
		(lb/inch ²)	(atm)
15	121	15	1,1
10	126	20	1,5
3	134	30	2,2

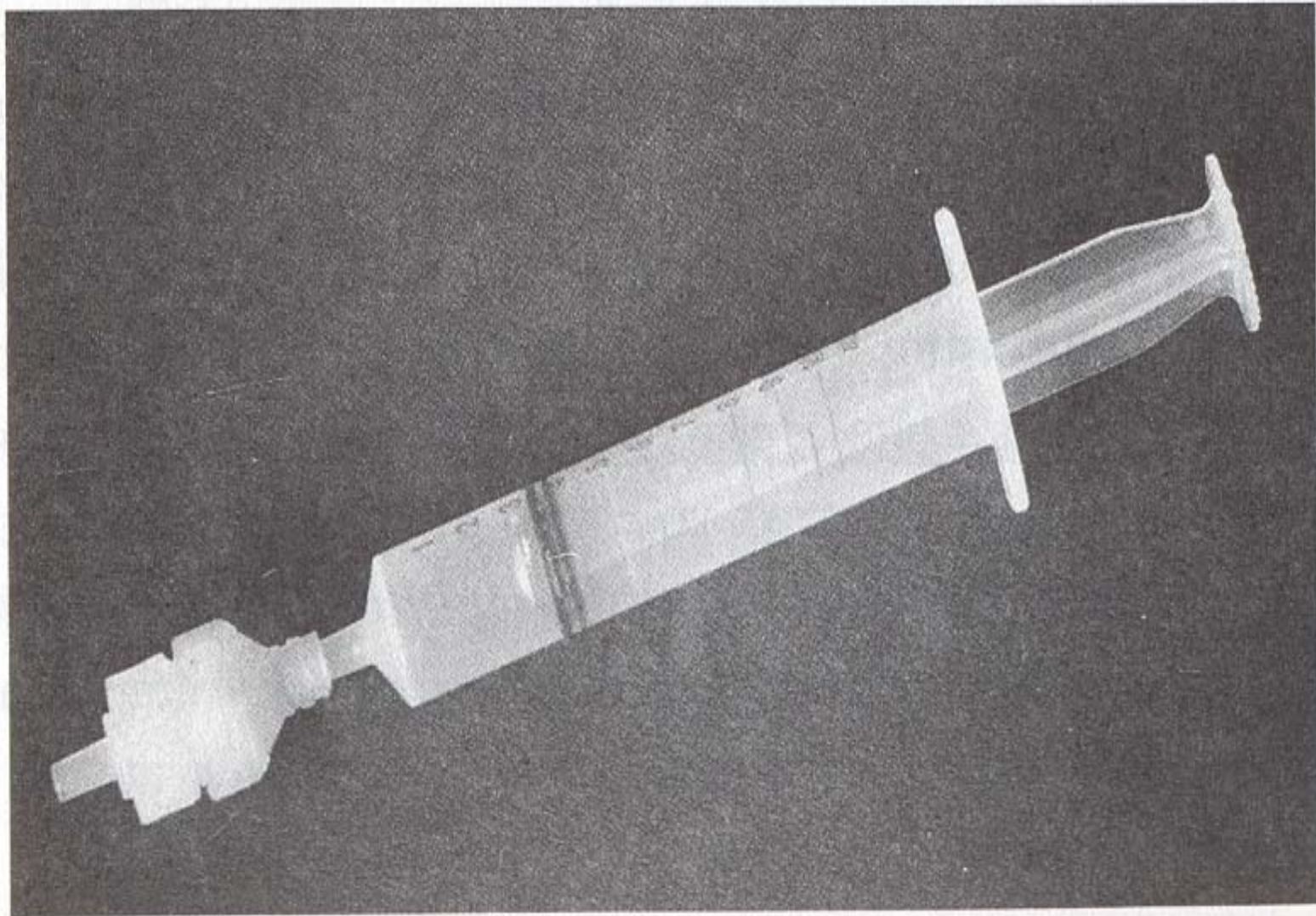
Πίνακας 2. Διάρκεια αποστείρωσης στους 121°C

Όγκος υγρού (ml)	Χρόνοι αποστείρωσης (min)	
	Κωνική φιάλη	Συνήθης φιάλη
10	15	20
100	20	25
500	25	30
1000	30	40

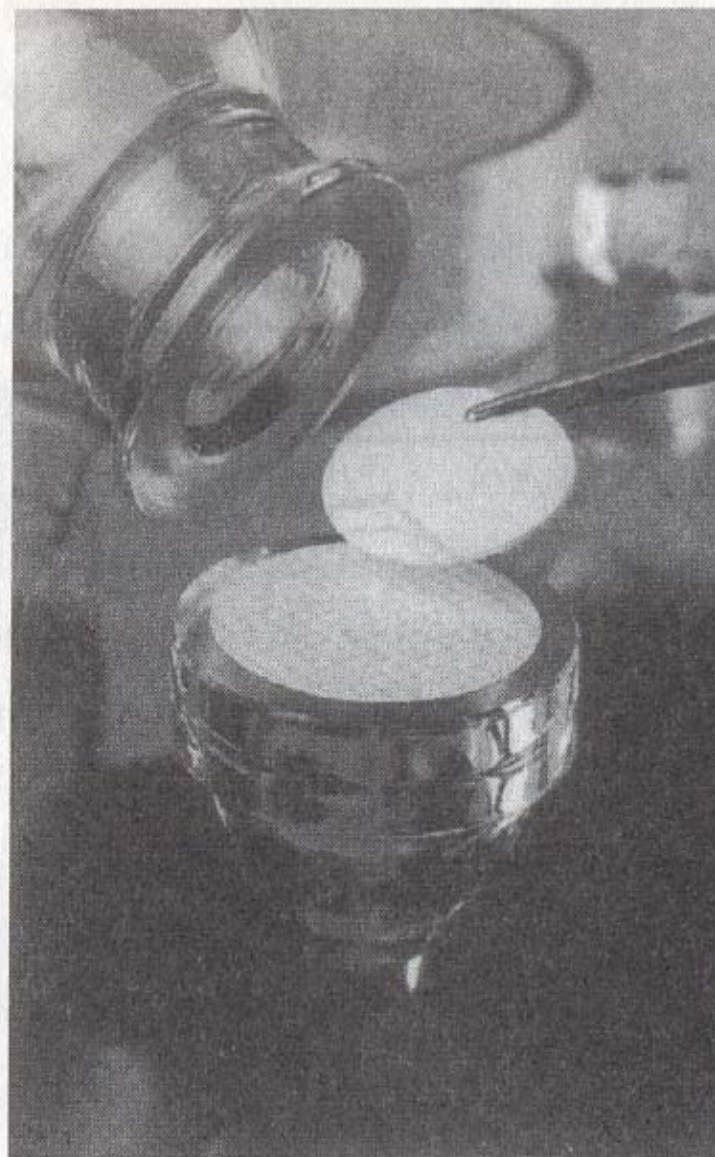
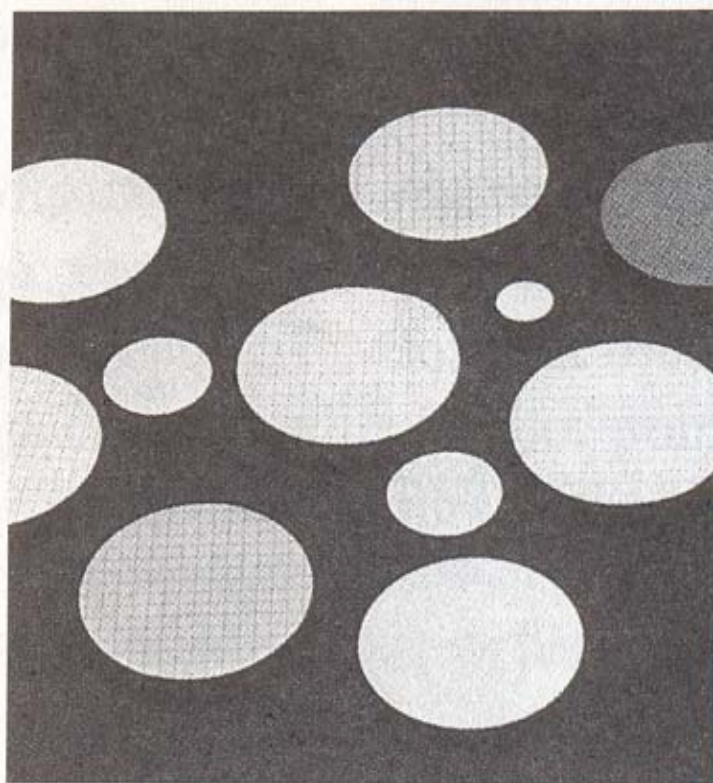
- ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΑΕΡΙΑ
- ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗ –ΥΔΡΑΤΜΟΙ (ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ . ΤΟΞΙΚΗ ΜΕ ΑΝΩΤΕΡΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 2 PPM).
- ΤΟ ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΕΙΝΑΙ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΤΟΞΙΚΟ.ΦΟΝΕΥΕΙ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ.
- ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΔΙΗΘΗΣΗ
- ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ , ΠΟΛΥΕΣΤΕΡΕΣ Η ΑΛΛΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ. ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΦΙΛΤΡΑ ΜΕ ΠΟΡΟΥΣ $0,22\mu\text{m}$ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΩΝ ΙΩΝ ΚΑΙ ΦΙΛΤΡΑ $0,45\mu\text{m}$ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.



Σχήμα 8. Συσκευή αποστείρωσης υγρών μεγάλου όγκου. Για την εξασφάλιση καλής αποστείρωσης είναι δυνατόν να συνδεθούν σε σειρά δυο συσκευές διήθησης (τρίποδα).



Σχήμα 10. Η απλούστερη των συσκευών διήθησης.



Σχήμα 11. Ηθμοί αποστείρωσης και προσαρμογή τους σε κατάλληλη συσκευή.

- ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΑΕΡΑ
- ΦΙΛΤΡΑ HEPA (High Efficiency Particle Arresters).ΟΛΕΣ ΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΣΤΙΕΣ ΕΙΝΑΙ ΕΦΟΔΙΑΣΜΕΝΕΣ ΜΕ ΦΙΛΤΡΑ HEPA ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ ΜΕ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΡΓΑΖΕΤΑΙ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.
- ΤΑ ΦΙΛΤΡΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥΣ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΙΓΟΝΤΑΙ ΩΣΤΕ ΝΑ ΔΙΑΣΦΑΛΙΖΕΤΑΙ Η ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.

- ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΕΣ

- ΙΟΝΙΖΟΥΣΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ γ ΑΠΟ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΟ Co . ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΑΣΦΑΛΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ ΚΥΡΙΩΣ ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ.

- ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΣΕ ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ 250-260 nm ΕΙΝΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΚΑΙ ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΒΑΘΜΟ ΣΠΟΡΙΟΚΤΟΝΟΣ .ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΜΙΚΡΗ ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΟΤΗΤΑ. ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΣΤΙΕΣ Η ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΤΟΥΣ ΧΩΡΟΥ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ (ΑΙΘΑΝΟΛΗ).

- **ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ**

- **ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΟ: ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ.**
- **ΑΝΤΙΣΗΠΤΙΚΟ/ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ : ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ Η ΤΡΟΦΙΜΑ.**

- **ΦΑΙΝΟΛΕΣ**

- **ΣΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΚΥΜΑΙΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ 1-2% ΟΙ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥΣ ΕΊΝΑΙ ΜΕΤΟΥΣΙΩΤΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ. ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΟ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΟΛΑ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ,ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΑ ΚΑΤΑ Gram.**
- **ΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΑ ΣΠΟΡΙΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

- ΑΛΚΥΛΙΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

- ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕΣΑ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΜΕ ΜΟΡΙΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΤΙΚΑΘΙΣΤΟΥΝ ΟΡΙΣΜΕΝΕΣ ΝΟΥΚΛΕΟΦΙΛΕΣ ΟΜΑΔΕΣ (Π.Χ. ΑΜΙΝΟ Η ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΕΣ).ΤΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΟΡΙΑ ΕΙΝΑΙ ΑΡΚΕΤΑ ΑΣΤΑΘΗ ΚΑΙ ΓΙ' ΑΥΤΟ ΕΧΟΥΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.
- ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗ –ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ
- ΓΛΟΥΤΑΡΑΛΔΕΥΔΗ: ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΣΚΕΥΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΑΛΛΑΓΗ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ , ΙΟΥΣ ΚΑΙ ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΒΑΘΜΟ ΑΠΟ ΣΠΟΡΙΑ.

- ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΑ

- ΤΑ ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΜΙΑ ΜΑΚΡΑ ΑΛΥΣΙΔΑ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΑ (ΤΟ ΛΙΠΟΔΙΑΛΥΤΟ ΜΕΡΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ) ΚΑΙ ΦΟΡΤΙΣΜΕΝΑ ΙΟΝΤΑ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥΣ..Ο ΧΩΡΟΣ ΜΕΤΑΞΥ

ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ (ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΛΙΠΟΕΙΔΗ) ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΜΕΣΟΥ ΠΡΟΣΕΛΚΥΕΙ ΤΑ ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ,ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ΜΕ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ.

• ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΧΩΡΩΝ

- ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΣΤΙΑΣ ΜΕ ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗ (20% ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗΣ). Η ΕΣΤΙΑ ΑΦΗΝΕΤΑΙ ΚΛΕΙΣΤΗ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΤΜΟΥΣ ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗΣ ΟΛΟΚΛΗΡΗ ΤΗΝ ΝΥΧΤΑ.
- ΤΗΝ ΕΠΟΜΕΝΗ ΗΜΕΡΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙΤΑΙ Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΞΑΕΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΣΤΙΑΣ ΓΙΑ ΝΑ ΕΚΔΙΩΧΘΟΥΝ ΟΙ ΑΤΜΟΙ ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗΣ ΔΙΑ ΜΕΣΟΥ ΤΩΝ ΦΙΛΤΡΩΝ ΗΕΡΑ.

- ΑΛΚΟΟΛΕΣ

- ΥΔΑΤΙΝΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (70%) ΑΙΘΥΛΙΚΗΣ Η ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΘΕΩΡΟΥΝΤΑΙ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ, ΜΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΑ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΑ ΣΠΟΡΙΑ.

- ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

- ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ, ΙΩΔΙΟ, ΧΛΩΡΙΟ (ΑΕΡΙΟ Η ΥΠΟΧΛΩΡΙΩΔΕΣ). ΟΙ ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΥΤΕΣ ΕΙΝΑΙ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ, ΥΦΑΣΜΑΤΩΝ Κ.Λ.Π.
- ΤΟ ΥΠΟΧΛΩΡΙΩΔΕΣ ΟΞΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΕΥΡΥΤΑΤΑ ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΤΑ ΣΠΟΡΙΑ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ.

Έλεγχος της Μικροβιακής Αύξησης

Ο περιορισμός της μικροβιακής αύξησης είναι δυνατόν να γίνει με **αναστολή** ή με **πλήρη καταστροφή του οργανισμού**.

Η δεύτερη διαδικασία είναι γνωστή ως **αποστείρωση**. Παράγοντες που νεκρώνουν ή καταστρέφουν τα βακτήρια λέγονται **βακτηριοκτόνα**.

Όταν προσπαθούμε να αναστείλουμε τη γρήγορη αύξηση των βακτηρίων χρησιμοποιούμε τους παράγοντες που λέγονται **βακτηριοστατικά**. Ο έλεγχος της μικροβιακής αύξησης είναι δυνατόν να γίνει με φυσικές και χημικές μεθόδους.

Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνεται η θερμότητα, οι χαμηλές θερμοκρασίες, ξήρανση, οσμωτική πίεση, διήθηση και ακτινοβολία. Οι χημικοί παράγοντες περιλαμβάνουν διαφορετικές ομάδες ενώσεων οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να καταστρέψουν τους μικροοργανισμούς ή να μειώσουν την αύξησή τους.

Η δράση των διαφόρων φυσικοχημικών

αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αύξησης των μικροοργανισμών εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

α) Το είδος των μικροοργανισμών

β) Η φυσική κατάσταση των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα ένα ενδοσπόριο είναι ανθεκτικότερο από ένα άλλο κύτταρο το οποίο βρίσκεται στο στάδιο της εκβλάστησης.

γ) Το περιεχόμενο οργανικό υλικό του περιβάλλοντος. Η ύπαρξη οργανικού υλικού στο περιβάλλον αύξησης των μικροοργανισμών είναι ένας παράγοντας που προστατεύει τους μικροοργανισμούς από τις χημικές αντιμικροβιακές ουσίες. Εδώ ανήκουν τα βακτήρια των τροφίμων. Στην κρέμα γάλακτος τα βακτήρια προστατεύονται από τις πρωτεΐνες και τα λίπη και έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν καλύτερα από εκείνα τα βακτήρια που παρασιτούν στο αποβουτυ-

ρωμένο γάλα.

δ) Το pH. Το pH είναι ένας άλλος παράγοντας ο οποίος παίζει ρόλο στον έλεγχο της μικροβιακής αύξησης. Τα βακτήρια που βρίσκονται σε όξινες συνθήκες είναι περισσότερο ευαίσθητα στη θερμότητα από εκείνα που βρίσκονται σε ουδέτερο pH, κατά συνέπεια οι αντισηπτικές χημικές ουσίες ενεργούν καλύτερα σε όξινο pH.

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικές μεθόδους Θερμότητα

Τα όρια της θερμοκρασίας στα οποία μπορούν να επιβιώσουν οι μικροοργανισμοί έχουν μεγάλη διακύμανση. Αυτές οι διαφορές μπορούν να εκφρασθούν με την έννοια του **θερμικού σημείου θανάτου**.

Θερμικό σημείο θανάτου (Thermal Death Point-TDP) είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία όλοι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι βρίσκονται σε ένα υδατικό εναιώρημα θανατώνονται εντός **10 λεπτών**.

Ένας άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στην αποστείρωση είναι ο χρόνος.

Εκφράζεται ως **θερμικός χρόνος θανάτου** (Thermal Death Time-TDT) και είναι ο **ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για να θανατωθούν όλα τα βακτήρια μιας υγρής καλλιέργειας δεδομένης θερμοκρασίας.**

Η **δεκαδική μείωση του χρόνου** (Decimal Reduction Time- DRT ή τιμή D) είναι μια τρίτη παράμετρος η οποία σχετίζεται με το βαθμό ανθεκτικότητας των βακτηρίων στη θερμότητα και **είναι ο χρόνος σε λεπτά κατά τον οποίο νεκρώνεται το 90% των βακτηρίων σε μια δεδομένη θερμοκρασία.**

Για την επιτυχή αποστείρωση πρέπει πάντα να προσδιορίζεται σωστά ο χρόνος και η θερμοκρασία όπως επίσης και η φύση της θερμότητας (υγρή ή ξηρή).

I. Υγρή Θερμότητα

Ένα είδος αποστείρωσης με υγρή θερμότητα είναι το βράσιμο

(100° C), το οποίο νεκρώνει τις βλαστικές μορφές των παθογόνων βακτηρίων, πολλούς ιούς, μύκητες και τα σπόριά τους μέσα σε χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Τα ενδοσπόρια όμως δεν καταστρέφονται τόσο γρήγορα. Μια αποδοτική αποστείρωση με υγρή θερμότητα απαιτεί θερμοκρασίες πάνω από εκείνη των 100° C.

Αυτές οι υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνονται συνηθέστερα με τη χρήση ατμού κάτω από πίεση μέσα στο αυτόκαυστο. Η χρήση του αυτόκαυστου αποτελεί την ασφαλέστερη μέθοδο αποστείρωσης εκτός και αν το υλικό που πρόκειται να αποστειρωθεί μπορεί να υποστεί βλάβη λόγω θερμότητας ή υγρασίας.

Η συνήθης διαδικασία είναι η θέρμανση σε ατμό υπό πίεση 1,1 -1,2 atm ώστε η θερμοκρασία να φτάσει τους 121° C. Η αποστείρωση με αυτόκαυστο είναι περισσότερο αποδοτική όταν οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε άμεση επαφή με τον ατμό, ή περιέχονται σε μικρού όγκου υδατικό διάλυμα.

Ο ατμός σε μια πίεση περίπου 1,5 atm (121°C) θα νεκρώσει όλους τους μικροοργανισμούς σε περίπου 15 λεπτά. Το αυτόκαυστο χρησιμοποιείται για την αποστείρωση θρεπτικών υλικών, ρούχων, διαλύματα, σύριγγες, και πλήθος άλλων υλικών που αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις.

II. Παστερίωση

Στην κλασσική παστερίωση η κατεργασία του γάλακτος ήταν έκθεσή του **στους 63°C για τριάντα λεπτά**. Σήμερα χρησιμοποιείται υψηλότερη θερμοκρασία, τουλάχιστον **72°C, αλλά μόνο για 15 δευτερόλεπτα**. Αυτή η κατεργασία είναι γνωστή σαν **παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας σε σύντομο χρόνο** (High Temperature Short Time Pasteurization- HTSTP) και εφαρμόζεται καθώς το γάλα διέρχεται μέσα από ένα εναλλάκτη υψηλής θερμότητας. Η παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας σύντομου χρόνου μειώνει τον ολικό βακτηριακό πληθυσμό ώστε το γάλα να διατηρείται σε θερμοκρασία ψυγείου.

Το γάλα μετά την παστερίωση του, μπορεί να αποστειρωθεί με διαδικασία **υπερβολικά υψηλής θερμοκρασίας** (Ultra High temperature Treatment- UHTT) ούτως ώστε να μη χρειάζεται συντήρησή του στο ψυγείο. **Το γάλα διέρχεται από ένα θάλαμο ατμού υψηλής θερμοκρασίας (140°C) για 1 έως 3 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ψύχεται υπό κενό.**

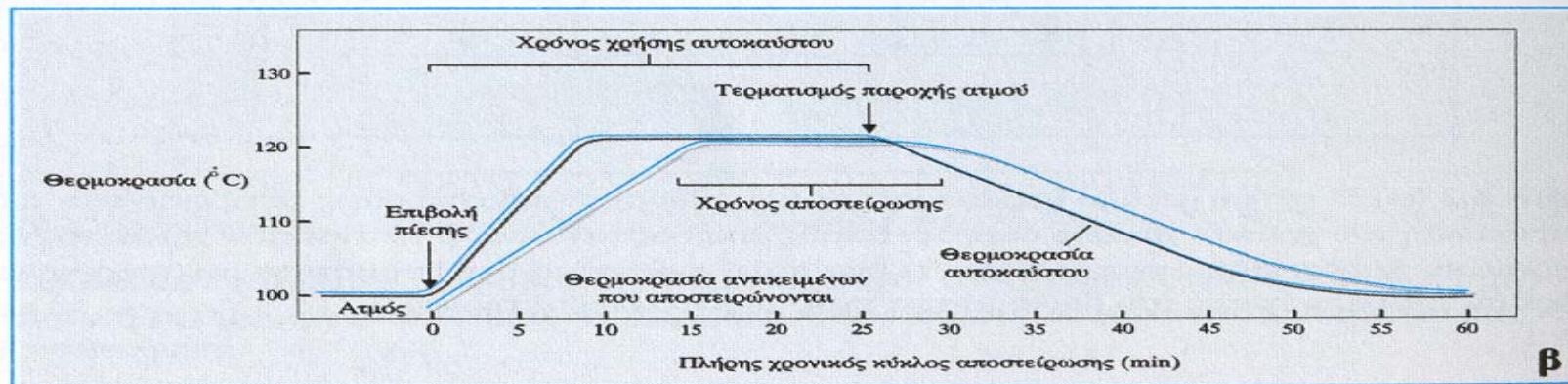
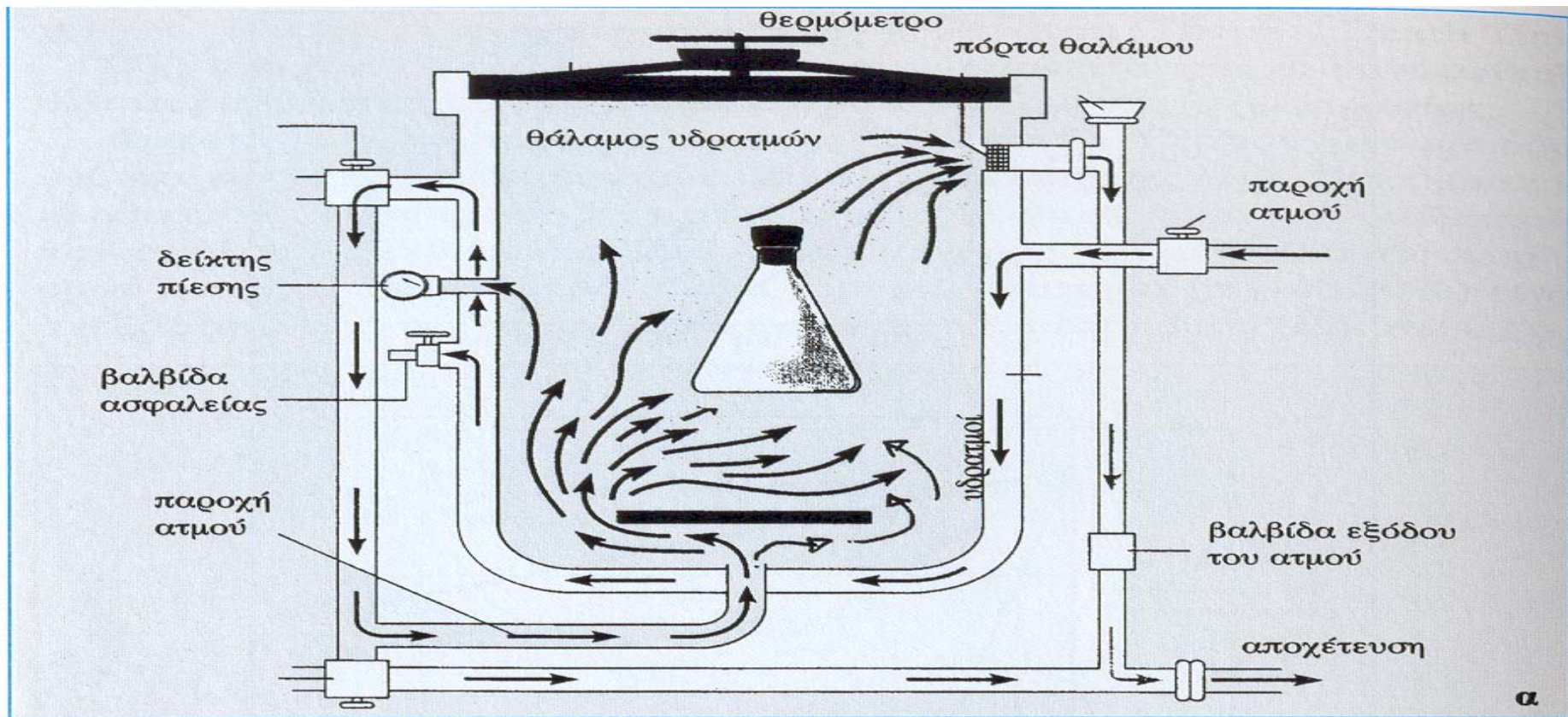
III. Αποστείρωση ξηρής θερμότητας

Η πλέον απλή μέθοδος ξηρής θερμότητας είναι η φλόγα του λύχνου Bunsen. Μια άλλη μέθοδος αποστείρωσης με ξηρή θερμότητα είναι η αποστείρωση με θερμό αέρα. Τα αντικείμενα τοποθετούνται σε ένα κλίβανο 170°C για δύο περίπου ώρες. Κατά την αποστείρωση με ξηρή θερμότητα απαιτούνται υψηλότερες θερμοκρασίες και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με την αποστείρωση η οποία πραγματοποιείται με υγρή θερμότητα

Διήθηση

Η διήθηση είναι η διαδικασία διέλευσης υγρού ή αερίου δείγματος ή υλικού μέσω ηθμού, ο οποίος έχει πόρους τόσο μικρούς ώστε να μην επιτρέπεται η διέλευση των μικροοργανισμών μέσω αυτού. Η μέθοδος της διήθησης χρησιμοποιείται κυρίως για υλικά τα οποία είναι ευαίσθητα στη θερμότητα. Οι ηθμομεμβράνες αποτελούνται από υλικά όπως είναι οι κυτταρικοί εστέρες και πλαστικά πολυμερή. Για τα βακτήρια συνήθως χρησιμοποιούνται μεγέθη από 0,22 μέχρι 0,45 μm .

Ο αέρας είναι δυνατόν να αποστειρωθεί με τη μέθοδο της διήθησης. Ο θάλαμος νηματικής ροής ο οποίος αποτελείται από ειδικούς ηθμούς υψηλής απόδοσης (συγκράτηση του 99.97% των σωματιδίων διαμέτρου 0,3 μm) είναι πολύ σημαντικό όργανο για κάθε μικροβιολογικό εργαστήριο.



Εικόνα 6.3. Χρήση του αυτόκαυστου για αποστείρωση. (α) Η ροή του ατμού μέσα στο αυτόκαυστο. (β) Ένας τυπικός κύκλος αποστείρωσης με αυτόκαυστο. Στο διάγραμμα φαίνεται η αποστείρωση ενός πολύ ογκώδους αντικειμένου. Η θερμοκρασία του αντικειμένου αυξάνεται πιο αργά σε σχέση με τη θερμοκρασία του αυτόκαυστου.

Ψύξη

Η επίδραση της χαμηλής θερμότητας στους μικροοργανισμούς εξαρτάται από το είδος και την ένταση της εφαρμογής π.χ. σε θερμοκρασίες ψυγείου $0-7^{\circ}\text{C}$ η μεταβολική δραστηριότητα των περισσότερων μικροοργανισμών μειώνεται. Άρα η ψύξη αυτή έχει βακτηριοστατική επίδραση. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται σ' αυτές τις θερμοκρασίες.

Αφύδάτωση

Κατά την αφυδάτωση οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αυξηθούν ή να αναπτυχθούν αλλά παραμένουν βιώσιμοι για χρόνια και όταν το νερό γίνει διαθέσιμο ανακτούν την αύξηση και την διαίρεσή τους. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται στο εργαστήριο μέσω της λυοφιλίωσης.

Οι πλέον ανθεκτικοί στην αφυδάτωση μικροβιακοί παράγοντες είναι τα ενδοσπόρια των βακτηρίων.

Οσμωτική πίεση

Η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων άλατος ή σακχάρων στη διατήρηση των τροφίμων (παστά, κρέατα, ξηροί καρποί, σιρόπια κ.α.) βασίζεται στο φαινόμενο της οσμωτικής πίεσης. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων δημιουργούν υπερτονικά περιβάλλοντα τα οποία οδηγούν στην απομάκρυνση του νερού από το κύτταρο και επομένως οδηγούν στην αφυδάτωση. Καθώς το νερό εγκαταλείπει το μικροβιακό κύτταρο η πλασματική μεμβράνη συρρικνώνεται, απομακρύνεται από το κυτταρικό τοίχωμα (άρα συμβαίνει το φαινόμενο της πλασμόλυσης) και το κύτταρο σταματά την αύξησή του, αλλά ο θάνατος δεν είναι άμεσος.

Ακτινοβολία

Η ακτινοβολία επιδρά στο DNA του οποίου προκαλεί ρήξη του δακτυλίου ή αποφοσφορυλίωση. Η ακτινοβολία επίσης αδρανοποιεί ή καταστρέφει ορισμένα ενζυμικά συστήματα του μικροβιακού κυττάρου. **Η δράση της εξαρτάται από το μήκος κύματος, την ένταση και τη διάρκεια.**

Διακρίνονται δύο τύποι ακτινοβολίας οι οποίοι έχουν την ικανότητα να νεκρώνουν τους μικροοργανισμούς, είναι δηλαδή ακτινοβολίες αποστείρωσης: η **ιονίζουσα** και η **μη-ιονίζουσα**.

Ιονίζουσες ακτινοβολίες: Οι ακτίνες γ παράγονται από ραδιενεργό κοβάλτιο και οι ακτίνες ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από επιταχυντές ηλεκτρονίων.

Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί εκτενώς

την ακτινοβολία για την συντήρηση των τροφίμων. Επίσης η ακτινοβολία ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας χρησιμοποιείται από τις φαρμακοβιομηχανίες.

Μη-ιονίζουσα ακτινοβολία: η υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Το υπεριώδες φως καταστρέφει το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σ' αυτό δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ γειτονικών μορίων θυμίνης στις αλυσίδες του DNA. Τα διμερή της θυμίνης παρεμποδίζουν το σωστό διπλασιασμό του DNA κατά την διάρκεια αναπαραγωγής του κυττάρου. Το δραστικότερο μήκος κύματος που προκαλεί τη νέκρωση των μικροοργανισμών είναι **τα 260 nm διότι απορροφάται από το DNA**. Το υπεριώδες φως χρησιμοποιείται για την αποστείρωση πόσιμου νερού . Οι μικροοργανισμοί που καλύπτονται από στερεά υλικά, χαρτί, γυαλί, υφάσματα δεν επηρεάζονται από την ακτινοβολία. Πρέπει να σημειωθεί ότι το υπεριώδες φως δημιουργεί προβλήματα στα μάτια, καίει το δέρμα και δημιουρ-

γεί καρκίνο του δέρματος.

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με χημικές μεθόδους

Αρχές που διέπουν μια αποτελεσματική απολύμανση

Είδη απολυμαντικών

I. Φαινολικές ενώσεις

Η φαινόλη έχει μικρή αντιμικροβιακή δράση στις χαμηλές συγκεντρώσεις που πρέπει να χρησιμοποιείται, ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 1% η δράση της είναι περισσότερο αποτελεσματική. Ως αντισηπτικά χρησιμοποιούνται επίσης παράγωγα της φαινόλης τα οποία καλούνται **φαινολικές ενώσεις**, περιέχουν ένα μόριο φαινόλης και έχουν υποστεί χημική μετατροπή, για να μειωθεί η ερεθιστική δράση τους ή για να αυξηθεί η αντιμικροβιακή τους ιδιότητα, σε συνδυασμό με ένα σαπούνι ή ένα άλλο απορρυπαντικό. Οι φαινολικές ενώσεις συνήθως προκαλούν τραύματα στις κυτοπλασματικές

μεμβράνες, αδρανοποιούν ένζυμα ή κροκιδώνουν τις πρωτεΐνες. Ένα από τα πλεονεκτήματά τους είναι ότι είναι δραστικές παρουσία οργανικών ουσιών. Είναι σταθερές ουσίες για μακρά χρονικά διαστήματα.

Η λιζόλη είναι φτιαγμένη από διάλυμα σαπουνιού και φαινολικών ενώσεων (o-phenyl-phenol, o-benzyl-p-chlorophenol, xylenols) και χρησιμοποιείται για την απολύμανση δαπέδων, τοίχων, εργαστηριακών πάγκων, κ.λ.π.

Μια ευρέως διαδεδομένη φαινολική ένωση είναι το **εξαχλωροφαίνιο**. Σαν βακτηριοστατικός παράγοντας δρα κυρίως εναντίον των θετικών κατά Gram σταφυλοκόκκων και στρεπτοκόκκων τα οποία δημιουργούν επιδερμικές μολύνσεις.

II. Αλογόνα

Τα αλογόνα στοιχεία, κυρίως **ιώδιο** και **χλώριο** και λιγότερο το **βρώμιο** είναι δραστικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες (I_2 ή Cl_2 σε διάλυμα) σαν συστατικά ανόργανων ή οργανικών ενώσεων.

Το **Ιώδιο** (I_2) είναι ένα από τα παλαιότερα και δραστικότερα αντισηπτικά. Δρα εναντίον όλων των ειδών των βακτηρίων, πολλών ενδοσπορίων, μυκήτων και αρκετών ιών. Ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται στη σύνδεση του αμινοξέος τυροσίνη με αποτέλεσμα την αναστολή της μικροβιακής πρωτεϊνικής λειτουργίας.

Το ιώδιο οξειδώνει επίσης τις θειώδεις ομάδες πολλών αμινοξέων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της πρωτεϊνικής δομής.

Το **χλώριο** (Cl_2) είτε ως αέριο είτε σε συνδυασμό με άλλα χημικά είναι ένα άλλο ευρέως χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό.

Η δράση του οφείλεται στο υποχλωρικό οξύ ($HOCl$) το οποίο σχηματίζεται όταν το χλώριο προστεθεί στο νερό. Επιποδίζει τη λει-

τουργία των περισσοτέρων ενζυμικών συστημάτων. Το πλεονέκτημα του είναι ότι διαχέεται με την ίδια ευκολία που διαχέεται το νερό διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος.

Υγρή μορφή συμπυκνωμένου αερίου χλωρίου χρησιμοποιείται ευρέως για την απολύμανση του πόσιμου νερού, νερού πισίνας και των αποχετεύσεων. Υπάρχουν επίσης και άλλες μορφές χλωρίου οι οποίες χρησιμοποιούνται ως απολυμαντικά π.χ. **το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) το οποίο χρησιμοποιείται στον οικιακό εξοπλισμό.**

III. Αλκοόλες

Οι αλκοόλες νεκρώνουν αποτελεσματικά τα βακτήρια και τους μύκητες, αλλά όχι τα ενδοσπόρια των βακτηρίων . Ο μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται η καταστροφή των μικροοργανισμών είναι συνήθως η αποδιάταξη των πρωτεϊνών, αλλά η αλκοόλη καταστρέφει και τις μεμβράνες διαλύοντας πολλά λίπη συμπεριλαμβανομένων και εκείνων στον μανδύα των ιών.

Το πλεονέκτημα των αλκοολών είναι ότι αφού δράσουν εξατμίζονται γρήγορα χωρίς να αφήνουν υπολείμματα. Από τις αλκοόλες, δύο χρησιμοποιούνται συχνότερα, η αιθανόλη και η ισοπροπανόλη. Άριστη συγκέντρωση αιθανόλης είναι εκείνη του 70% αλλά και συγκεντρώσεις από 60 έως και 95% δείχνουν ότι προκαλούν σύντομο θάνατο των μικροοργανισμών.

IV. Βαρέα μέταλλα

Ο άργυρος, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός θεωρούνται αντισηπτικά. Αυτή η ευδιάκριτη ζώνη που δημιουργείται γύρω από το νόμισμα οφείλεται στη δράση του μετάλλου. Συνήθως το βαρύ μέταλλο συνδυαζόμενο με τις –SH ομάδες αποδιατάσσει τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Ο άργυρος χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό σε υδατικό διάλυμα



Εικόνα 6.7 Ολιγοδυναμική ενεργότητα βαρέων μετάλλων. Καθαρές ζώνες όπου παρατηρείται αναστολή της βακτηριακής αύξησης εμφανίζονται γύρω από τα νομίσματα των 100 και 20 δραχμών.

1% νιτρικού αργύρου. Ο χαλκός χρησιμοποιείται ως θειϊκός χαλκός για τα πράσινα φύκη τα οποία αναπτύσσονται σε ανοικτές δεξαμενές, πισίνες ή δεξαμενές ιχθυοκαλλιεργειών. Ο χλωριούχος ψευδάργυρος είναι η κοινή μορφή για πλύσεις της στοματικής κοιλότητας.

V. Απορρυπαντικά

Όταν μια μη πολική ένωση, όπως για παράδειγμα τα λίπη, προστίθεται σ' ένα υδατικό διάλυμα ενός απορρυπαντικού, οι υδρόφοβες ομάδες του απορρυπαντικού προσδένονται στην ένωση ενώ οι υδρόφιλες ομάδες δημιουργούν μία επιφάνεια η οποία μπορεί να ενωθεί με το νερό. Ένα παράδειγμα απορρυπαντικού είναι τα **σαπούνια**. Αυτά είναι υδατοδιαλυτά άλατα νατρίου ή φωσφόρου μεγάλης αλυσίδας λιπαρών οξέων.

VI. Παράγωγα οργανικών οξέων

Το **σορβικό οξύ** (συχνά λέγεται και άλας σορβικού καλίου), χρησι-

μοποιείται σαν αναστολέας της αύξησης της μούχλας σε αλκαλικές τροφές όπως το τυρί. Το **βενζοϊκό οξύ** (συχνά ως άλας βενζοϊκού νατρίου) έχει αντιμυκητιακή δράση σε χαμηλές τιμές pH και χρησιμοποιείται ευρέως σε μη αλκοολούχα ποτά και άλλα αλκαλικά τρόφιμα. Το **προπιονικό ασβέστιο** εμποδίζει την αύξηση της μούχλας στο ψωμί. **Η ενεργότητα όλων αυτών των οξέων δεν έχει σχέση με την οξύτητα τους, αλλά με την ικανότητά τους να εμποδίζουν την ενζυμική και μεταβολική ενεργότητα.**

VII. Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες θεωρούνται οι πλέον δραστικές αντιμικροβιακές ενώσεις. Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται η **φορμαλδεΐδη** και η **γλουταραλδεΐδη** οι οποίες αδρανοποιούν τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς με έναν αριθμό οργανικών ριζών στις πρωτεΐνες (-NH₂, -HO, -COOH, και -SH). Η αέρια φορμαλδεΐδη είναι

ένα εξαιρετικό απολυμαντικό. Η συχνότερα όμως διαθέσιμη ουσία είναι η φορμαλίνη, η οποία είναι ένα υδατικό διάλυμα 37% της αέριας φορμαλδεΰδης.

Η γλουταραλδεΰδη είναι μια χημική ένωση συγγενής της φορμαλδεΰδης λιγότερο ερεθιστική και περισσότερο δραστική. Το συνηθέστερο διάλυμα έχει συγκέντρωση 2% και είναι βακτηριοστατικό, ιστατικό (όταν χρησιμοποιείται για 10 ώρες).

Αέρια χημειοαποστειρωτικά

Ως αέριο χημειοαποστειρωτικό θεωρείται το οξειδίο του αιθυλενίου (C_2H_4O). Η δράση του οφείλεται στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών κατά την οποία ρίζες όπως οι $-SH$, $-COOH$ και $-OH$ αντικαθίστανται από αλκιλικές ομάδες όπως $-CH_2CH_2OH$. Συνήθως νεκρώνει όλα τα μικρόβια και τα ενδοσπόρια και απαιτεί μακρά έκθεση

(από 4 έως 18 ώρες). Είναι τοξικό και εκρηκτικό στην καθαρή του μορφή και συνήθως αναμιγνύεται με μη αναφλέξιμα αέρια όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το άζωτο.

ΙΧ. Οξειδωτικοί παράγοντες

Το **όζον** (O_3) είναι υψηλή ενεργειακά μορφή οξυγόνου η οποία αναδημιουργείται εάν το αδρανές οξυγόνο διέρθει διαμέσου αποφορτιστών υψηλής ηλεκτρικής τάσης. Το όζον συνήθως χρησιμοποιείται για να ενισχύσει την απολύμανση του νερού με χλώριο.

Το **υπεροξείδιο του υδρογόνου** είναι ένας αντιμικροβιακός παράγοντας ο οποίος έχει ευρεία οικιακή και νοσοκομειακή χρήση. Είναι ένα πολύ καλό αντισηπτικό υλικό για ανοικτές πληγές, του οποίου η δράση υποβοηθείται από το ένζυμο καταλάση το οποίο υπάρχει στα ανθρώπινα κύτταρα.

- ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
-ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Για την καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού, θα πρέπει να εξασφαλισθούν οι συνθήκες που επιτρέπουν τη διεκπεραίωση όλων των βασικών λειτουργιών του οργανισμού.

ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι βασικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη καθορίζονται είτε από τις χημικές παραμέτρους των θρεπτικών μέσων, όπως το pH, η οσμωτική πίεση, το οξυγόνο ή από συνδυασμό των ανωτέρω όπως το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και από το περιβάλλον όπως είναι η θερμοκρασία.

pH

Υπάρχουν βακτήρια που αναπτύσσονται σε ακραία pH ,δηλαδή σε περιβάλλον με τιμές pH 1 ή 11,τα περισσότερα αναπτύσσονται όμως κοντά στην ουδέτερη ζώνη.

Στις περιπτώσεις που δεν χρειάζεται μεγάλη ακρίβεια στο pH είναι δυνατόν ο έλεγχος να γίνεται με την χρήση ειδικών δεικτών που είναι χρωστικές των οποίων μεταβάλλεται το χρώμα ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος.

Σε ορισμένες περιπτώσεις το διάλυμα του δείκτη ενσωματώνεται στο θρεπτικό μέσο του

μικροοργανισμού μ' αυτόν τον τρόπο έχουμε τη δυνατότητα παρακολούθησης των μεταβολών του pH που συμβαίνουν κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Πολλοί μικροοργανισμοί, εξαιτίας του μεταβολισμού τους, καταναλώνουν ή παράγουν ενώσεις, που στο διάλυμα ανάπτυξης τους δίνουν υψηλές συγκεντρώσεις όξινων ή βασικών ιόντων. Αν σε μια καλλιέργεια μικροοργανισμών η παραγωγή ή η κατανάλωση αυτών των ενώσεων δεν είναι εξισορροπημένη δημιουργούνται

σημαντικές μεταβολές του pH που σχεδόν πάντα είναι οδυνηρές στους ίδιους τους μικροοργανισμούς. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με ενσωμάτωση, στο θρεπτικό μέσο των καλλιεργειών, ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία είναι εναρμονισμένα με το ιδανικό pH ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού.

Τα συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα είναι μείγματα ασθενών οξέων ή βάσεων με τα συζυγή άλατα τους (άλατα με τα οποία έχουν κοινό ιόν). Οι ενώσεις αυτές ρυθμίζουν το pH αποτελεσματικά σε διαλύματα pH που το 50% του οξέος ή της βάσης ευρίσκεται σε διάσταση. Η περιοχή pH την οποία μπορεί να καλύψει αποτελεσματικά από άποψη ρύθμισης ένα οξύ ή μια βάση θα πρέπει να περιλαμβάνει τις τιμές οι οποίες δεν απέχουν περισσότερο από 1 μονάδα pH από το pK_a του οξέος ή της βάσης.

Τα ρυθμιστικά αυτά διαλύματα στηρίζονται στο κιτρικό οξύ με 3 σταθερές pK_a (3,13, 4,76 , 6,39) και το τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθανικό, tris, $pK_a=8,08$. Τέλος ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για ρύθμιση σε περιοχή pH από 6,0 έως 8,0. Το γνωστότερο από αυτά, το HEPES.

Πίνακας 3. Διαλύματα με σταθερό pH που χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση του πεχάμετρου.

Διάλυμα	pH στους 20°C
0,1M HCl	1,10
0,01M τετραοξαλικό κάλιο	2,16
0,05M όξινο φθαλικό κάλιο	4,00
0,025M KH_2PO_4 και 0,025M Na_2HPO_4	6,88
0,01M βόραξ	9,22
0,025M $NaHCO_3$ και 0,025M Na_2CO_3	10,02

Πίνακας 4. Δείκτες pH και περιοχές pH για τις οποίες χρησιμοποιούνται

Δείκτης	περιοχή pH	Χρώμα	
		με οξύ	με βάση
Κυανούν της Θυμόλης	8,0-9,6	Κίτρινο	Κυανούν
Κόκκινο της Φαινόλης	6,8-8,4	»	Κόκκινο
Κυανούν της Βρωμοθυμόλης	6,0-7,6	»	Κυανούν
Ιώδες της Βρωμοκρεζόλης	5,2-6,8	»	Ιώδες
Κόκκινο του Μεθυλίου	4,4-6,0	»	Κόκκινο
Πράσινο της Βρωμοκρεζόλης	3,8-5,4	»	Κυανούν
Κυανούν της Βρωμοφαινόλης	3,0-4,6	»	Κυανούν

Πίνακας 5. Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

Επιθυμητό pH	Τιμές X σε ml, στους 25°C	
	X ml 0,1M κιτρικού οξέος αναμειγνύονται με (50-X) ml 0,2M Na ₂ HPO ₄ για να δώσουν 100 ml (συμπλήρωση με H ₂ O) ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών	50 ml 0,2M tris αναμειγνύονται με X ml 0,2M HCl για να δώσουν 100 ml (συμπλήρωση με H ₂ O) ρυθμιστικών διαλυμάτων tris-HCl
4,0	30,7	—
4,2	29,4	—
4,4	27,8	—
4,6	26,7	—
4,8	25,2	—
5,0	24,3	—
5,2	23,3	—
5,4	22,2	—
5,6	21,0	—
5,8	19,7	—
6,0	17,9	—
6,2	16,9	—
6,4	15,4	—
6,6	13,6	—
6,8	9,1	—
7,0	6,5	—
7,2	—	44,2
7,4	—	41,4
7,6	—	38,4
7,8	—	32,5
8,0	—	26,8
8,2	—	21,9
8,4	—	16,5
8,6	—	12,2
8,8	—	8,1
9,0	—	5,0

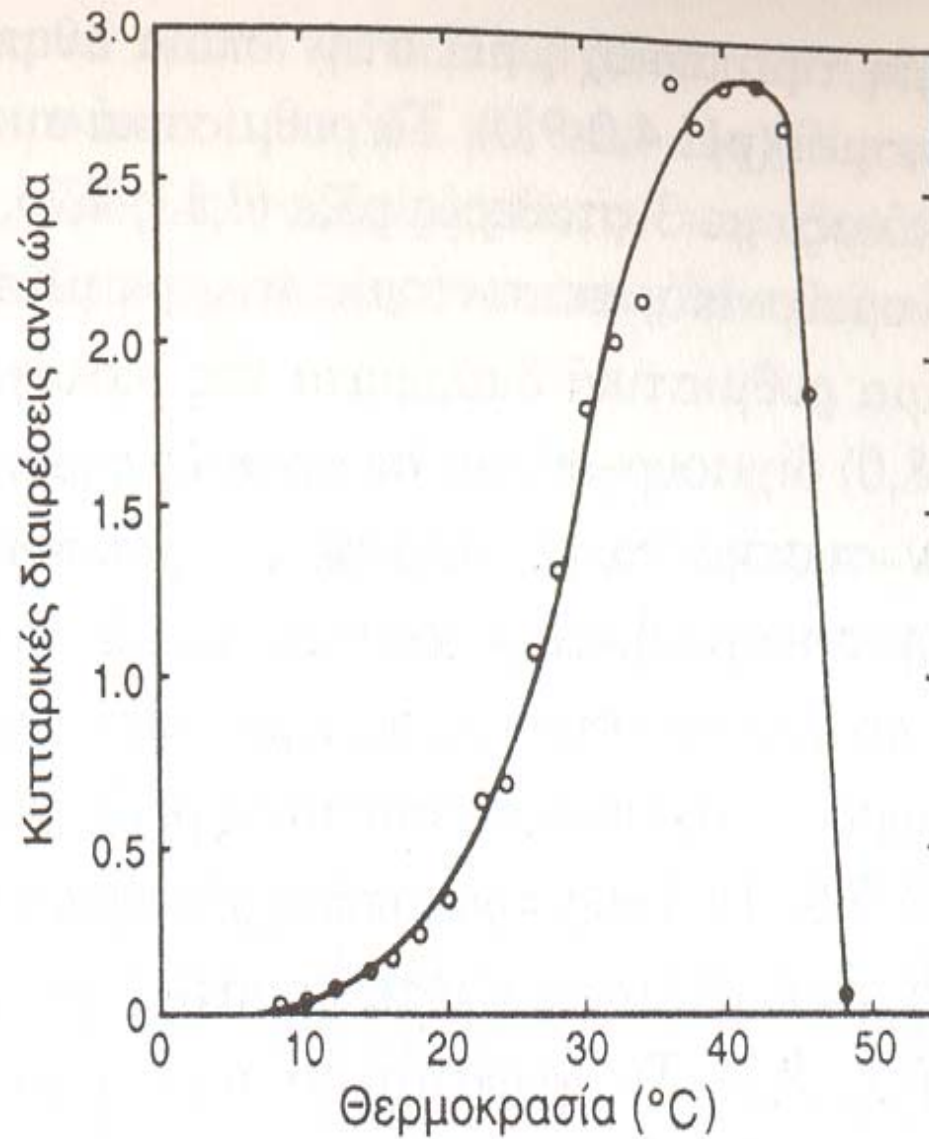
ΟΣΜΩΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ

Η οσμωτική πίεση ενός διαλύματος είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων χημικών ενώσεων σ' αυτό. Η οσμωτική πίεση ενός διαλύματος, στο οποίο διατηρούνται ή αναπτύσσονται μικροοργανισμοί, θα πρέπει να έχει τέτοια τιμή έτσι ώστε να εξουδετερώσει την πίεση την οποία ασκούν τα διαλυμένα συστατικά του κυττάρου στα τοιχώματά του.

Οι κυτταρικοί μικροοργανισμοί διατηρούνται και αναπτύσσονται στα μέσα τα οποία περιέχουν, για την εξασφάλιση ορθής οσμωτικής πίεσης, διάφορα άλατα (συνήθως NaCl).

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Η θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας ενός μικροοργανισμού επηρεάζει ιδιαίτερα την ανάπτυξη του. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης απέχει ελάχιστα (λίγους °C) από τη μέγιστη θερμοκρασία (που είναι απαγορευτική για ανάπτυξη).



Σχήμα 12. Ρυθμός αύξησης καλλιέργειας βακτηρίων σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.

ΟΞΥΓΟΝΟ

Τα αερόβια βακτήρια χρησιμοποιούν για την ανάπτυξη τους διαλυμένο στο θρεπτικό τους μέσο οξυγόνο γι' αυτό και ο ρυθμός μεταβολισμού και ανάπτυξης τους εξαρτάται από την συγκέντρωση του O_2 στο διάλυμα. Επειδή το οξυγόνο είναι δυσδιάλυτο στο νερό (διαλυτότητα μικρότερη των 10 mg/λίτρο) η συγκέντρωση του σε μια καλλιέργεια γίνεται πολύ σύντομα, ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης. Θα πρέπει γι' αυτό να λαμβάνονται πάντα μέτρα έτσι ώστε να εξασφαλίζεται καλός αερισμός της καλλιέργειας. Ο λόγος

επιφάνεια/όγκος του υγρού να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερος· αυτό εξασφαλίζεται με χρήση δοχείων επώασης μεγάλου όγκου ακόμη και για μικρού όγκου καλλιέργειες. Η συνεχής ανακίνηση των καλλιεργειών, δεδομένου όγκου, αυξάνει την επιφάνεια τους, γι' αυτό και σε πολλές περιπτώσεις η επώαση τους γίνεται σε ειδικούς επωαστήρες με ανακίνηση.

Ο διαχωρισμός μεταξύ αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων δεν είναι σαφής γιατί υπάρχουν τα προαιρετικά αναερόβια που αναπτύσσονται εξίσου καλά με ή χωρίς οξυγόνο και τα υποχρεωτικά μικροαερόφιλα, τα οποία απαιτούν για την ανάπτυξη τους μικρές

συγκεντρώσεις οξυγόνου. Ένα βακτήριο χαρακτηρίζεται ως υποχρεωτικά αναερόβιο, όταν δεν αναπτύσσεται στην επιφάνεια ή κοντά στην επιφάνεια ενός στερεού θρεπτικού μέσου που βρίσκεται σε άμεση επαφή με την ατμόσφαιρα.

Η εκτίμηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (Eh) ενός διαλύματος αντικατοπτρίζει την τάση που υπάρχει σ' αυτό για χορήγηση ή πρόσληψη ηλεκτρονίων (δυνατότητα οξείδωσης ή αναγωγής του) η οποία εκφράζεται σε μονάδες διαφοράς ηλεκτρικού δυναμικού, δηλαδή Volts.

Όσο μεγαλύτερο (πιο θετικό) το Eh ενός διαλύματος, τόσο μεγαλύτερη η σχετική συγκέντρωση των οξειδωτικών προς τις αναγωγικές ενώσεις του διαλύματος .

Τα συνήθη θρεπτικά μέσα οφείλουν το υψηλό τους οξειδοαναγωγικό δυναμικό κυρίως στο οξυγόνο και οι θετικές τιμές του Eh που προκύπτουν, εξαιτίας του διαλυμένου οξυγόνου, θεωρούνται απαγορευτικές για την ανάπτυξη των αναερόβιων βακτηρίων.

Γενικά είναι αποδεκτό ότι συνήθη θρεπτικά μέσα με Eh μεγαλύτερο του -100mV θεωρούνται ακατάλληλα για αναερόβιο ανάπτυξη.

Η χρησιμοποίηση στη Μικροβιολογία οξειδοαναγωγικών χρωστικών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη. Οι χρωστικές αυτές μεταβάλλουν το χρώμα τους σε αναλογία της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του θρεπτικού μέσου.

συνήθως χάνουν το χαρακτηριστικό τους χρώμα όταν βρίσκονται σε αναγμένη μορφή.

Η κάθε χρωστική ανάγεται σε διαφορετικό Eh και το Eh στο οποίο τα μισά μόρια της χρωστικής ευρίσκονται σε αναγμένη κατάσταση χαρακτηρίζεται ως Standard Eh ή Eo'.

Οι τιμές του Eo' μεταβάλλονται με το pH του διαλύματος, σε γενικές γραμμές ισχύει ότι το Eo' ενός διαλύματος αυξάνει κατά 30-60mV για κάθε μονάδα μείωσης του pH. Αν υπάρχει ανάγκη παρακολούθησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της καλλιέργειας κατά την ανάπτυξη, ενσωματώνεται στο θρεπτικό μέσο η

κατάλληλη οξειδοαναγωγική χρωστική που θα πρέπει να είναι αβλαβής για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Στα θρεπτικά μέσα των αναερόβιων μικροοργανισμών, τις πιο πολλές φορές ενσωματώνονται και ισχυρές αναγωγικές ενώσεις και οι οποίες εξασφαλίζουν το αναερόβιο περιβάλλον με χαμηλό E_o' .

Πίνακας 6. E_o' οξειδοαναγωγικών χρωστικών σε ουδέτερα διαλύματα και θερμοκρασία 30°C.

Χρωστική	E_o' (mV)
Κυανούν Μεθυλενίου	11
Κυανούν Τολουιδίνης	-11
Indigoditetrakisulfonate	-46
Resorufin (αναγμένη reasurin)	-51
Indigotrisulfonate	-81
Indigosulfonate	-125
Θειϊκή 1,5-Ανθρακινόνη	-200
Benzyl viologens	-359

Πίνακας 7. Αναγωγικές ενώσεις για αναερόβια θρεπτικά μέσα.

Χημική Ένωση	Εο΄	Συγκέντρωση στο μέσο
Θειογλυκολικό Νάτριο	<-100	0,05 %
Κυστεΐνη HCl	-210	0,025%
Διθειοθρεϊτόλη	-330	0,05 %
H ₂ + Χλωριούχο παλλάδιο	-420	μικρή
Τιτάνιο III (κιτρικό)	-480	0,5-2mM
Na ₂ S.9H ₂ O	-571	0,025%

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Τα βακτήρια χρειάζονται για την ανάπτυξη τους μια εξωτερική πηγή ενέργειας και τις ενώσεις που θα αποτελέσουν πηγή των απαραίτητων για τη ζωή, χημικών στοιχείων.

Τα **αυτότροφα** βακτήρια έχουν στοιχειώδεις μόνο τροφικές απαιτήσεις: **νερό, CO₂ και ορισμένα ανόργανα άλατα**. η **ενέργεια που χρειάζονται διατίθενται είτε από το φως είτε από την οξείδωση ενός ή περισσότερων ανόργανων χημικών ενώσεων.**

Τα **ετερότροφα** βακτήρια από την άλλη μεριά, έχουν συνήθως περισσότερες απαιτήσεις, η ενέργεια προέρχεται από την οξείδωση οργανικών ενώσεων. **Η γλυκόζη που αποτελεί συστατικό πολλών θρεπτικών μέσων εξυπηρετεί**

ακριβώς αυτόν τον σκοπό.

Η χρησιμοποίηση μιας οργανικής ένωσης από τα ετερότροφα βακτήρια, πέρα από το ρόλο της ως πηγής ενέργειας, εξυπηρετεί, σε πολλές περιπτώσεις, κι ένα άλλο σκοπό: η ίδια ένωση αποτελεί και την πηγή οργανικών υλικών από τα οποία σχηματίζονται, άμεσα ή έμμεσα με χημικές αντιδράσεις και κατανάλωση ενέργειας, τα απαραίτητα συστατικά του κυττάρου. Άλλοι μικροοργανισμοί έχουν, πέρα από τις πηγές ενέργειας και άνθρακα και πρόσθετες απαιτήσεις για άλλες οργανικές ενώσεις (βιταμίνες, αμινοξέα κλπ) τις οποίες αδυνατούν να συνθέτουν και οι οποίες χαρακτηρίζονται ως παράγοντες ανάπτυξης (growth factors).

Μικροοργανισμοί που προϋποθέτουν για την ανάπτυξη τους, σ' ένα συγκεκριμένο θρεπτικό

μέσο, την προσθήκη μιας τέτοιας οργανικής ένωσης θεωρούνται **αυξοτροφικοί για την ένωση αυτή.**

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΑΙΩΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση των μικροοργανισμών σε εναιώρημα για μεγάλα σχετικά χρονικά διαστήματα. Τα διαλύματα αυτά θα πρέπει να ικανοποιούν τις απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε ό,τι αφορά κυρίως δυο παραμέτρους, **το pH και την ιοντική ισχύ, γιατί οι δυο αυτοί παράγοντες, ακόμη και αν ο μικροοργανισμός δεν μεταβολίζεται ενεργά, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του σε καλή κατάσταση.**

- Φυσιολογικό αλατούχο διάλυμα (saline). Είναι διάλυμα 0,85% NaCl σε νερό. Το φυσιολογικό αλατούχο διάλυμα δεν περιέχει σύστημα ρύθμισης, γι' αυτό και δεν προσφέρεται για εναιωρήσεις μεγάλης διάρκειας.
- Αλατούχο διάλυμα με ρύθμιση φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS).

Το διάλυμα αυτό, με pH 7,3 είναι γενικής χρήσης και περιέχει τα πολύ σημαντικά, για τη φυσιολογία του κυττάρου, φωσφορικά και ιόντα καλίου.

- Αλατούχο διάλυμα με ρύθμιση βορικών/ασβεστίου. Το διάλυμα αυτό, με pH 7,3 χρησιμοποιείται σε πειράματα αιμοσυγκόλλησης για τα οποία θεωρείται απαραίτητη η παρουσία ασβεστίου.
- Αλατούχο διάλυμα Veronal-NaCl. Το διάλυμα αυτό, με pH 7,1-7,2, χρησιμοποιείται σε πειράματα συμπληρώματος
- Διάλυμα Krebs Ringer με δικαρβονικά. Το διάλυμα αυτό με το οποίο διατηρούνται ζωντανά για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα βακτήρια και

ευκαρυωτικά κύτταρα, είναι ισότονο και γι' αυτό μπορεί να αναμειχθεί, με ορό θηλαστικών.

1. 100 μέρη NaCl (9 gr/λίτρο)
2. 4 » KCl (11,5 gr/λίτρο)
3. 3 » CaCl₂ (12,2 gr/λίτρο)
4. 1 » KH₂PO₄ (21,1 gr/λίτρο)
5. 1 » MgSO₄·7H₂O (38,2gr/λίτρο)

Φυσική κατάσταση των θρεπτικών μέσων

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη μικροοργανισμών με κυτταρική δομή, από άποψη φυσικής κατάστασης, μπορεί να είναι υγρά ή στερεά.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε υγρά θρεπτικά μέσα δεν συνοδεύεται με ειδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και γι' αυτό δεν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την αναγνώριση και ταυτοποίηση τους εκτός αν η ανάπτυξη αυτή είναι σχεδιασμένη για την εφαρμογή βιοχημικών ελέγχων. Με την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε υγρά θρεπτικά μέσα δεν υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού των διαφόρων ειδών ή στελεχών του μικροοργανισμού, που είναι δυνατό να υπάρχουν στο αρχικό για καλλιέργεια δείγμα.

Τα μειονεκτήματα αυτά ξεπερνιούνται με τη χρήση στερεών θρεπτικών μέσων, μια και σ' αυτά οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται υπό μορφή αποικιών οι οποίες, για τις πιο πολλές ομάδες μικροοργανισμών, συνοδεύονται από διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά που είναι χρήσιμα για την αναγνώρισή τους.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, στα θρεπτικά μέσα υπό μορφή αποικιών, αποτελεί τη βάση διαχωρισμού των διαφόρων ειδών μικροοργανισμών και το σημείο εκκίνησης για τη λήψη καθαρών καλλιεργειών.

ΣΥΝΗΘΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

Το απιονισμένο νερό παράγεται από δυο στήλες ιοντο-ανταλλακτών από τις οποίες περνά διαδοχικά το προς απιονισμό νερό (μια στήλη με ανιοανταλλάκτη και μια με κατιοανταλλακτή). Το απιονισμένο νερό, εφ' όσον οι ιοντοανταλλάκτες είναι σε καλή κατάσταση θεωρείται σε ό,τι αφορά την περιεκτικότητα του σε ανόργανες ενώσεις, εφάμιλλο με το δίπλα αποσταγμένο νερό.

Το άγαρ είναι προϊόν που λαμβάνεται από ορισμένα θαλάσσια φύκη και διατίθενται με μόρφη σκόνης. Το κύριο συστατικό του άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες D-γαλακτοπυρανόζης.

- Το άγαρ μπορεί να προστεθεί σε οποιοδήποτε θρεπτικό μέσο, σε συγκέντρωση 1 έως 2%. Αν το θρεπτικό μέσο περιέχει θερμοευαίσθητα συστατικά, αυτά προετοιμάζονται χωριστά με αποστείρωση άλλου τύπου (π.χ. διήθηση). Τα συστατικά αυτά προστίθενται, ασηπτικά, στο θερμοανθεκτικό μέρος του θρεπτικού μέσου (άγαρ και οτιδήποτε άλλο) μετά την αποστείρωση του στο αυτόκαυτο και αφού προηγουμένως κρυώσει στους 45°-50°C. Ζεστό υγρό άγαρ, ενώ ψύχεται, παραμένει υγρό μέχρι τους 42°C, γεγονός που επιτρέπει πολλές εργασίες με θερμοευαίσθητα υλικά ή την ανάμειξη του με μικροοργανισμούς, όταν όμως

στερεοποιηθεί με ψύξη κάτω των 42°C παραμένει στερεό σ' όλες τις φυσιολογικές θερμοκρασίες ανάπτυξης οργανισμών (στερεό μέχρι 80-85°C).

Το άγαρ είναι «μικροβιολογικά» αδρανές μια και δεν μεταβολίζεται, εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις, από τους μικροοργανισμούς και γι' αυτό η προσθήκη του στα θρεπτικά μέσα δεν επηρεάζει την αναπτυξιακή συμπεριφορά των μικροοργανισμών.

- **Η πεπτόνη** αποτελείται από υδατοδιαλυτά προϊόντα της πρωτεόλυσης άπαχου κρέατος ή άλλων πλούσιων σε πρωτεΐνη φυσικών προϊόντων όπως είναι η σόγια.
- Η πρωτεόλυση γίνεται ενζυμικά με τα πρωτεολυτικά ένζυμα πεψίνη, τρυψίνη ή παπαΐνη.

- Η πεπτόνη, εκτός των αμινοξέων, περιέχει πολλά χρήσιμα για την ανάπτυξη ανόργανα άλατα (φωσφορικά, καλίου και μαγνησίου) όπως και πολλούς αυξητικούς παράγοντες μεταξύ των οποίων το νικοτινικό οξύ και η ριβοφλαβίνη.
- Η υδρολυμένη καζεΐνη περιέχει κυρίως αμινοξέα που είναι προϊόντα υδρόλυσης της καζεΐνης. Η καζεΐνη είναι πρωτεΐνη του γάλακτος, αλλά όπως και στην πεπτόνη, το προϊόν υδρόλυσης της περιέχει άλατα (κυρίως φωσφορικά) και αυξητικούς παράγοντες. Η υδρολυμένη με οξύ καζεΐνη θεωρείται

θρεπτικά υποδεέστερη, γιατί η **όξινη υδρόλυση** έχει ως συνέπεια την καταστροφή ορισμένων αμινοξέων και κυρίως της **τρυπτοφάνης**.

Το τελικό προϊόν θα πρέπει να συμπληρώνεται με τρυπτοφάνη αφού, για τα πιο πολλά βακτήρια, το αμινοξύ αυτό αποτελεί **αυξοτροφικό παράγοντα** και γι' αυτό πρέπει να τους παρέχεται έτοιμο.

- Το **εκχύλισμα κρέατος παρασκευάζεται από άπαχο κρέας** το οποίο βράζεται σε νερό και στη συνέχεια λαμβάνεται με εξάτμιση, το τελικό προϊόν. Αυτό είναι πλούσιο σε πολλά προϊόντα αποικοδόμησης πρωτεϊνών (ζελατίνη, πεπτόνες,

κρεατίνη, κρεατινίνη, πουρίνες, γλουταθειόνη), άλατα (κυρίως KH_2PO_4 και NaCl), αυξητικούς παράγοντες (θειαμίνη, νικοτινικό οξύ, ριβοφλαβίνη, πυριδοξίνη, πανταθενικό οξύ) και ορισμένους υδατάνθρακες.

- Το **εκχύλισμα ζύμης**, που παρασκευάζεται από πλυμένα κύτταρα της ζύμης ζύθου ή άρτου (*Saccharomyces cerevisiae*), **περιέχει 50% κατά βάρος αμινοξέα, 10% υδατάνθρακες, αυξητικούς παράγοντες και ανόργανα άλατα.**
- Το εκχύλισμα ζύμης θεωρείται πλήρες σε ό,τι αφορά αυξητικούς παράγοντες και αντικαθιστά, στα θρεπτικά μέσα, το εκχύλισμα κρέατος.

Το εκχύλισμα βύνης περιέχει τα διαλυτά συστατικά βύνης, προκύπτει με θέρμανση της βύνης σε νερό, στους 55°C. Το εκχύλισμα βύνης περιέχει μαλτόζη (50%), άμυλο, δεξτρίνες, γλυκόζη, πρωτεΐνες, αμινοξέα, ανόργανα άλατα και αυξητικούς παράγοντες.

- Το αίμα που χρειάζεται σε ορισμένα θρεπτικά μέσα μπορεί να είναι από άλογο (υπάρχει στο εμπόριο), από άνθρωπο (αίμα από τράπεζες αιμοδοσίας και για το οποίο ο χρόνος ισχύος για ανθρώπινη χρήση έχει εξαντληθεί) ή από ζώα, που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο ως πειραματόζωα.

Το αίμα είναι δυνατόν να περιέχει αντιβιοτικά,γι' αυτό πριν τη χρήση του θα πρέπει να ελεγχθεί αν επηρεάζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών που είναι ευαίσθητοι σε ευρύ φάσμα αντιβιοτικών.

- Ο ορός,από το αίμα θηλαστικών,αποτελεί βασικό συστατικό των θρεπτικών μέσων των κυτταροκαλλιεργειών που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη .Ο ορός χρειάζεται να αποστειρωθεί με διήθηση γεγονός που επιτυγχάνεται με το πέραςμα του διαδοχικά από μια σειρά φίλτρων με πόρο ολοένα και μικρότερης

διαμέτρου ή με ακτινοβολία γ.

Αφυδατωμένα θρεπτικά μέσα

Τα βασικά θρεπτικά μέσα (basal media) είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών και διακρίνονται σε συνθετικά, που είναι εντελώς καθορισμένης σύστασης (defined media) και σε φυσικά ή εμπειρικά που η ακριβής σύστασή τους δεν είναι γνωστή.

Το πιο κοινό βασικό συνθετικό θρεπτικό μέσο είναι το “Davis a Mingioli ελάχιστο μέσο” το οποίο περιέχει τα εξής:

Γλυκόζη 10%,αποστειρωμένη με διήθηση	20 ml
Όξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4	7 gr
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4	3 gr
Κιτρικό νάτριο, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	0,5gr
Θεικό μαγνήσιο, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1gr
Θεικό αμμώνιο, $(NH_4)_2SO_4$	1 gr
Άγαρ(μόνο στην περίπτωση στερεού μέσου)	20 gr
Αποσταγμένο νερό μέχρι	1000 ml

Το ελάχιστο αυτό θρεπτικό μέσο εμπλουτίζεται,σε πολλές περιπτώσεις, για κάθε λίτρο με 1 ml διαλύματος 1% χλωριούχου ασβεστίου, $CaCl_2$, και με

5 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων· το διάλυμα ιχνοστοιχείων παρασκευάζεται ως εξής:

Θεικός σίδηρος, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	gr
Θεικός ψευδάργυρος, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	gr
Θεικό μαγνήσιο, $\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,5	gr
Θεικό οξύ, H_2SO_4 , 0,1 M	10	ml
Αποσταγμένο νερό μέχρι	1000	ml

Το υψηλό περιεχόμενο του ελάχιστου αυτού θρεπτικού μέσου σε φωσφορικά θεωρείται απαραίτητο για την ρύθμιση του μέσου και τη διατήρηση του **pH στο 7,1** αφού κατά την ανάπτυξη

των μικροοργανισμών, με τη χρησιμοποίηση του σακχάρου, σχηματίζονται οξέα.

Στο θρεπτικό αυτό μέσο μπορούν να προστεθούν τα απαραίτητα αμινοξέα και αυξητικοί παράγοντες με τη μορφή υδρολύματος καζεΐνης.

Οι θρεπτικοί ζωμοί αποτελούν τη βάση πολλών θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη βακτηρίων και περιέχουν εκχύλισμα άπαχου φρέσκου κρέατος , πεπτόνη και χλωριούχο νάτριο.

Θρεπτικά μέσα εμπλουτισμού

Η προσθήκη στα βασικά θρεπτικά μέσα, συστατικών που ευνοούν την ανάπτυξη συγκεκριμένων

μικροοργανισμών, οδηγεί σε θρεπτικά μέσα που χαρακτηρίζονται ως εμπλουτισμένα.

- Το αιματούχο άγαρ που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην Ιατρική Βακτηριολογία, εκτός από το ό,τι θεωρείται για πολλά βακτήρια θρεπτικό μέσο εμπλουτισμού, είναι και δείκτης αιμολυτικής δραστηριότητας, ιδιότητα που συνοδεύει ορισμένα βακτήρια, όπως το *Streptococcus pyogenes*. Το αιματούχο άγαρ παρασκευάζεται με προσθήκη αίματος, σε συγκέντρωση 5 έως 50% ,σε υγροποιημένο θρεπτικό άγαρ που έχει ψυχθεί στους 50°C.

Ο θρεπτικός ζωμός Thioglycollate είναι ένα θρεπτικό μέσο αναερόβιας/αερόβιας διαβίωσης το οποίο περιέχει έναν αναγωγικό παράγοντα (sodium thioglycollate) και ένα δείκτη του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του μέσου. **Κάθε θρεπτικός ζωμός, με την προσθήκη του θειογλυκολικού νατρίου, μετατρέπεται σε κατάλληλο μέσο για αναερόβια/αερόβια βακτήρια.** Για την παρασκευή του, διαλύονται σε 1 λίτρο νερό, με βράσιμο στους 100°C, τα εξής:

Εκχύλισμα ζύμης	5	gr
Υδρολυμένη καζεΐνη	15	gr
Γλυκόζη	5,5	gr

L-κυστίνη	0,5	gr
Άγαρ	0,75	gr
Χλωριούχο Νάτριο	2,5	gr

Όταν το διάλυμα κρυώσει προστίθεται σε αυτό **0,5-1 gr θειογλυκολικού νατρίου και γίνεται ρύθμιση του pH στο 7,3.**

Ακολουθούν προσθήκη 1 ml διαλύματος resazurin (φρέσκο υδατικό διάλυμα sodium resazurin 1:1000), έντονη ανάμειξη, μοίρασμα σε κατάλληλα δοχεία, αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

Το άγαρ MacConkey είναι το κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη εντεροβακτηρίων· περιέχει, ένα άλας της χολής (sodium taurocholate) για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης άλλων, εκτός των εντεροβακτηρίων, μικροοργανισμών, και λακτόζη με έναν κατάλληλο δείκτη (neutral red) για την διάκριση των κολοβακτηρίων που ζυμώνουν το σάκχαρο αυτό, από όλα τα άλλα (Salmonella και άλλα που προκαλούν δυσεντερίτιδες). Το θρεπτικό αυτό μέσο περιέχει:

Πεπτόνη	20	gr
Sodium taurocholate	5	gr
Νερό	1	λίτρο
Άγαρ	20	gr
Neutral red (2% σε 50% αιθανόλη)	3,5	ml
Λακτόζη(10%)	100	ml

Η πενικιλλινάση είναι ένα ένζυμο που ανταγωνίζεται τη δράση της πενικιλλίνης γι' αυτό και προστίθεται στα θρεπτικά μέσα καλλιεργειών αίματος που προέρχεται από ασθενείς στους οποίους πιθανόν να έχει χορηγηθεί πενικιλλίνη.

Το “standard άγαρ” που χρησιμοποιείται για απομονώσεις πολλών μικροοργανισμών παρασκευάζεται με ανάμειξη των εξής:

Υδρολυμένη καζεΐνη	5	gr
Εκχύλισμα ζύμης	2,5	gr
Γλυκόζη	1	gr
Άγαρ	15	gr
Αποσταγμένο νερό	1000	gr

Γίνεται ρύθμιση του pH στο 7,0, διαλυτοποίηση του άγαρ με βράσιμο και αποστείρωση με θέρμανση στους 121° C για 15 λεπτά.

Το Sabouraud agar που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη μυκήτων περιέχει τα εξής συστατικά:

Γλυκόζη	20 gr
Πεπτόνη(mycological)	10 gr
Άγαρ	15 gr
Νερό	1000 gr

Το άγαρ διαλυτοποιείται με θέρμανση και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 5,4 και αποστείρωση στο αυτόκαυστο (115° C για 15 λεπτά).

Το αλκαλικό θρεπτικό μέσο **Wiley and Stokes** που χρησιμοποιείται για την απομόνωση του *Bacillus pasteurii* και άλλων μικροοργανισμών, που αναπτύσσονται σε αλκαλικό περιβάλλον, παρασκευάζεται με ανάμειξη των εξής συστατικών :

Εκχύλισμα ζύμης	20	gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	gr
Tris(hydroxymethyl) Aminomethane	15,7	gr
Αποσταγμένο νερό	1000	ml

Το pH του διαλύματος Tris θα πρέπει, πριν την αποστείρωση, να είναι 9,0 ενώ μετά την ανάμειξη των συστατικών του θρεπτικού μέσου το τελικό pH θα πρέπει να είναι **8,7**.

Το στερεό Wiley&Stokes θρεπτικό μέσο περιέχει, σε κάθε λίτρο, 15 gr άγαρ.

Το θρεπτικό μέσο Violet Red Bile Agar που είναι ένα γενικό μέσο εμπλουτισμού εντεροβακτηρίων, περιέχει τα εξής συστατικά:

Εκχύλισμα ζύμης	3,0	gr
Πεπτόνη	7,0	gr
Μείγμα αλάτων χολής	1,5	gr
Λακτόζη	10,0	gr
NaCl	5,0	gr
Neutral red	0,03	gr
Κρυσταλλικό ιώδες	0,002	gr
Άγαρ	15	gr
Αποσταγμένο νερό	1000	ml

Γίνεται ρύθμιση του **pH στο 7,4** και ακολουθεί, για την διαλυτοποίηση του άγαρ, θέρμανση μέχρι βρασμού.

Θρεπτικά μέσα για μεταφορά και συντήρηση μικροβιολογικών δειγμάτων

Για την συντήρηση βακτηρίων χρησιμοποιούνται κοινά εμπλουτισμένα θρεπτικά μέσα όπως ο θρεπτικός ζωμός, κλίσεις θρεπτικού άγαρ ή αιματούχου άγαρ και ημίρευστο θρεπτικό άγαρ στο οποίο οι μικροοργανισμοί ενοφθαλμίζονται με βελόνα (agar stabs).

Ειδικό θρεπτικό μέσο, **το μέσο μεταφοράς Stuart** το οποίο παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση σε 1 λίτρο νερού των εξής χημικών ενώσεων:

Θειογλυκολικό νάτριο	1	gr
Γλυκερόλη	10	gr
Χλωριούχο ασβέστιο	0,1	gr
Άγαρ	6,0	gr

Γίνεται ρύθμιση του pH στο 7,4, προσθήκη 4 ml (0,1% σε νερό) κυανού του μεθυλενίου και ακολουθεί υγρή αποστείρωση. Το θρεπτικό αυτό μέσο όταν κρυώσει γίνεται άχρωμο.

Διατήρηση Θρεπτικών μέσων

Τα θρεπτικά μέσα, όπως είναι αποστειρωμένα μέσα σε κατάλληλα δοχεία με αεροστεγή πώματα, διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετές βδομάδες ενώ αντίθετα, η διατήρηση τριβλίων με αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα, είναι προβληματική εκτός αν αυτά είναι ερμητικά κλειστά σε αποστειρωμένα δοχεία ή πλαστικές σακούλες.

Η διατήρηση των τριβλίων με θρεπτικά μέσα στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 4-5° C, δεν πρέπει να υπερβαίνει την μια βδομάδα γιατί, εκτός των πιθανών επιμολύνσεων, δημιουργούνται και προβλήματα σε ό,τι αφορά την περιεκτικότητα σε υγρασία, pH κλπ. Ορός, διαλύματα αντιβιοτικών, διαλύματα αμινοξέων κ.λ.π. διατηρούνται καλύτερα σε συνθήκες υψηλής κατάψυξης (-10 μέχρι -80° C).

Έλεγχος θρεπτικών μέσων

Η ποιότητα των θρεπτικών μέσων θα πρέπει να ελέγχεται κάθε φορά που αυτά παρασκευάζονται, από επί μέρους υλικά, στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως θετικοί ή αρνητικοί μάρτυρες για τη καλή ποιότητα συγκεκριμένων θρεπτικών μέσων.

Θετικοί μάρτυρες θεωρούνται οι μικροοργανισμοί ελέγχου που αναπτύσσονται σε θρεπτικά μέσα τα οποία προορίζονται για την ανάπτυξή τους, ενώ αρνητικοί μάρτυρες θεωρούνται οι μικροοργανισμοί ελέγχου των οποίων η ανάπτυξη αποκλείεται από τα συγκεκριμένα θρεπτικά μέσα, τα οποία προορίζονται για εμπλουτισμό με ένα άλλο μικροοργανισμό.

Η απουσία επιμολύνσεων από ένα θρεπτικό μέσο αποτελεί το δεύτερο είδος ελέγχου που πρέπει να γίνεται σ' ένα φρέσκο θρεπτικό μέσο.

Ο έλεγχος περιορίζεται στην επώαση μικρής ποσότητας του ίδιου θρεπτικού μέσου, στους 30° C για μερικές μέρες οπότε αυτό εξετάζεται μακροσκοπικά για την εμφάνιση οποιασδήποτε μικροβιακής ανάπτυξης.

Για τα θρεπτικά μέσα όμως που προορίζονται για την ανάπτυξη κυτταροκαλλιεργειών και τα οποία αποστειρώνονται με διήθηση, χρειάζονται πρόσθετοι έλεγχοι στειρότητας, οι οποίοι γίνονται πριν την προσθήκη αντιβιοτικών του θρεπτικού μέσου.

Οι έλεγχοι αυτοί περιλαμβάνουν προσθήκη μικρής ποσότητας του υπό έλεγχον θρεπτικού μέσου σε 2 σωλήνες με ζωμό thioglycollate, σε 2 με ζωμό Sabouraud και σε 2 τριβλία με αιματούχο άγαρ.

Η μία σειρά των δειγμάτων ελέγχου επωάζεται στους 30° C και η άλλη στους 37° C με καθημερινή μακροσκοπική εξέτασή τους, για 10 μέρες, για τον εντοπισμό μικροβιακής ανάπτυξης.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Καθαρές καλλιέργειες μικροβίων (καλλιέργειες που περιέχουν ένα είδος μικροοργανισμού) παίρνονται μέτρα έτσι ώστε να αποκλείεται η επιμόλυνση με άλλους μικροοργανισμούς. Γενικά, η χρήση σχολαστικά αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων και συσκευών και η εργασία σε αποστειρωμένο χώρο αποτελούν το ελάχιστο από αυτά που θα πρέπει να έχει υπόψη του ο Μικροβιολόγος. Το λυχνάρι **bun-**
sen είναι απαραίτητο για τη γρήγορη αποστείρωση ορισμένων συσκευών αλλά και για τη δημιουργία στοιχειωδώς αποστειρωμένου χώρου στον πάγκο εργασίας.

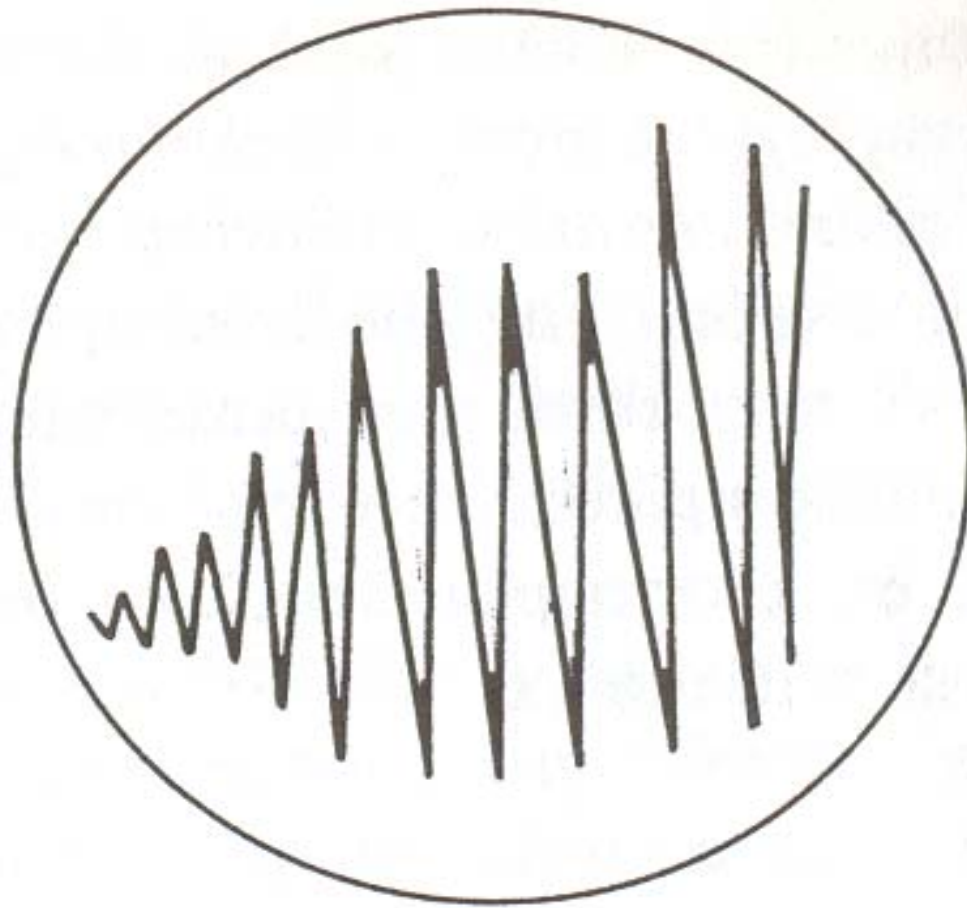
Ο **μικροβιολογικός κρίκος** είναι ένα κυκλικό κομμάτι νικελοχρωμίου συνδεδεμένο σ' ένα στέλεχος που είναι ανθεκτικό στη θερμοκρασία. Το σύρμα του νικελοχρωμίου έχει την ιδιότητα να ψύχεται ταχύτατα ύστερα από πυράκτωσή του. Ο μικροβιολογικός κρίκος ο οποίος αποστειρώνεται στη φλόγα του bunsen, αφού κρυώσει εμβα-

πτίζετσει στθν καλλιέργεια από τθν οποία μεταφέρεται ένα πολύ μικρό μέρος της σ' ένα άλλο δοχείο.

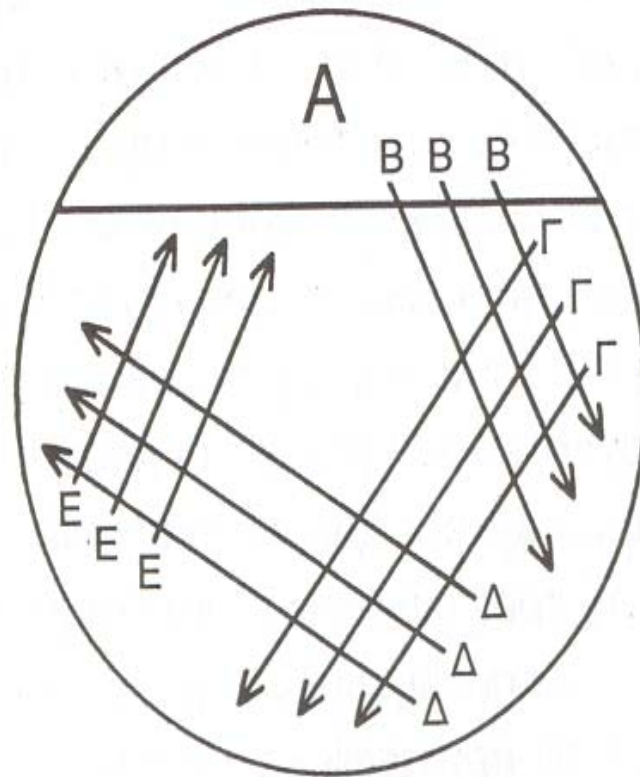
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Καλλιέργεις σε στερεά θρεπτικά μέσα

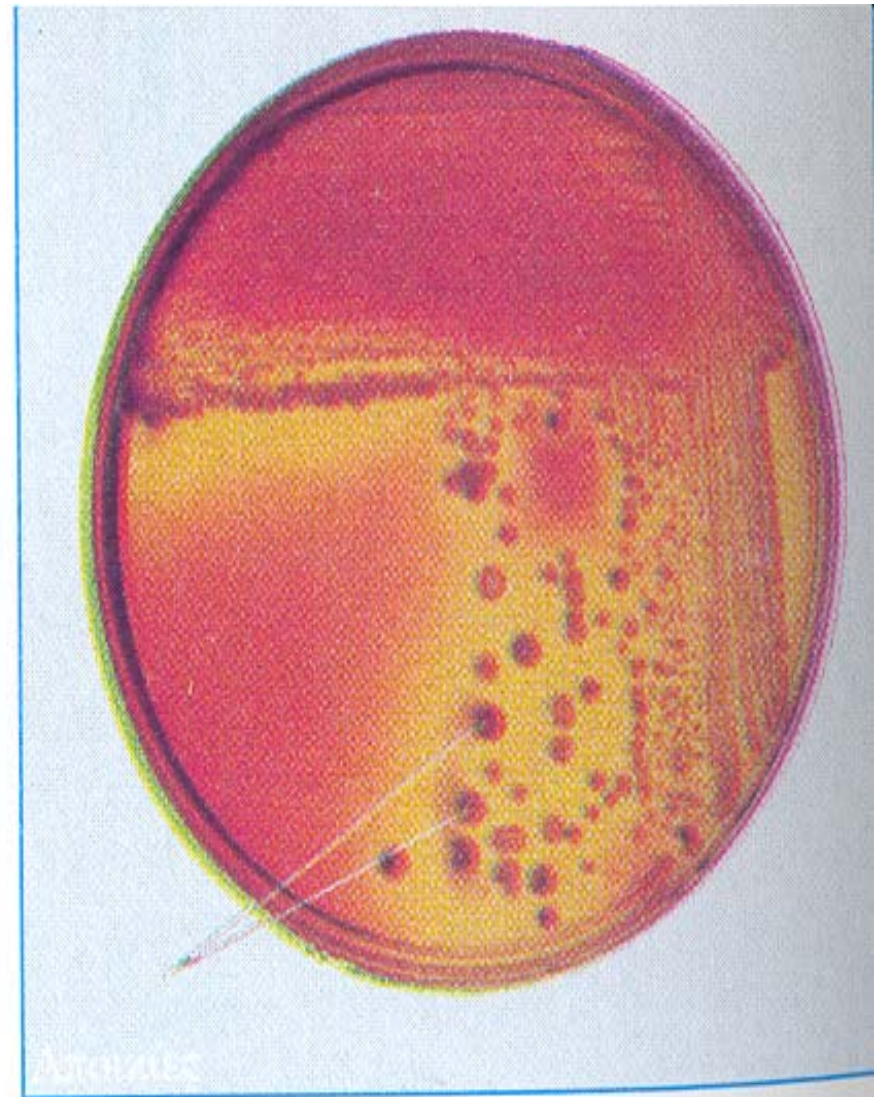
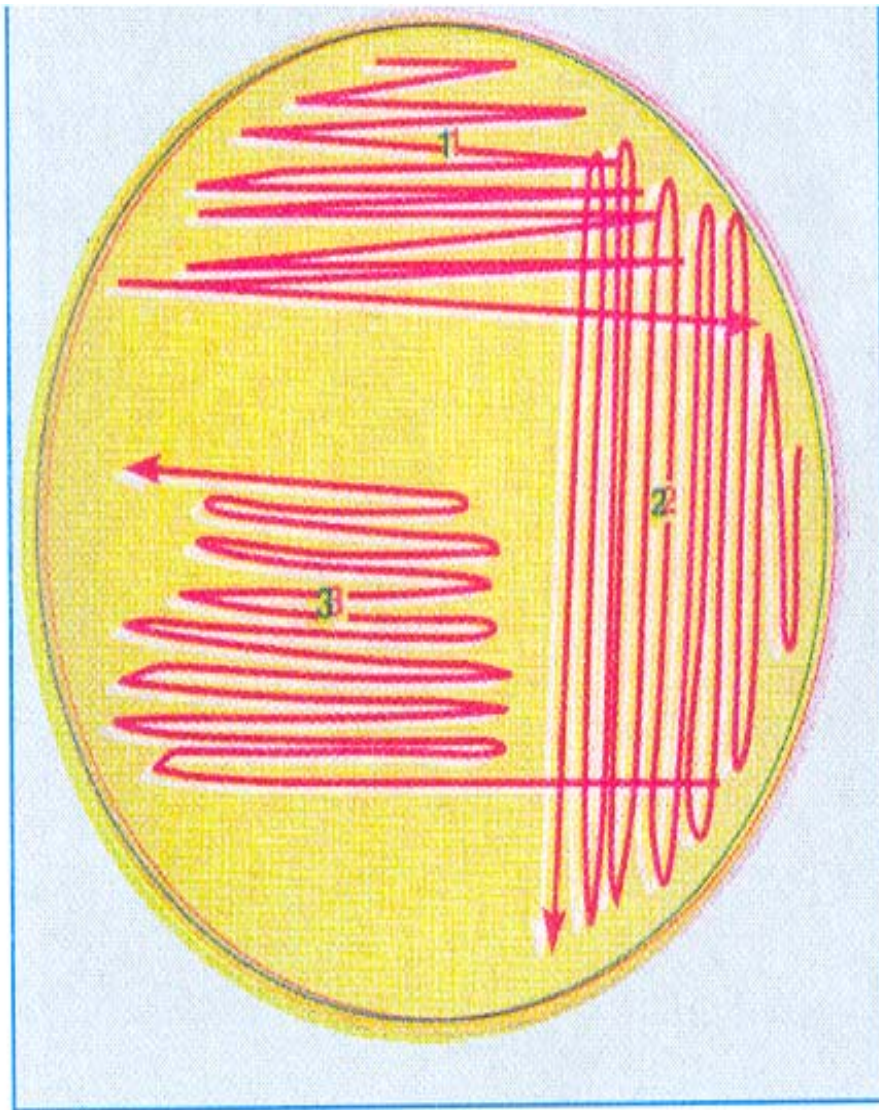
Το στερεό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι θρεπτικό άγαρ που μπορεί να είναι και εμπλουτισμένο με διάφορα, κατά περίπτωση απαραίτητα συστατικά. Το άγαρ αποτελεί τον παράγοντα που σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1% προκαλεί στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου. Στην αρχή της επίστρωσης οι μικροοργανισμοί είναι τόσο κοντά ο ένας στον άλλο, έτσι ώστε να μη δίνουν, όταν αναπτυχθούν, ξεχωριστές αποικίες· καθώς όμως η επίστρωση προχωρεί, απομένουν στο σύρμα του νικελοχρωμίου όλο και λιγότεροι μικροοργανισμοί και γι' αυτό οι μικροοργανισμοί που επιστρώνονται στην επιφάνεια του άγαρ είναι πιο απομακρυσμένοι μεταξύ τους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί όταν πολλαπλασιασθούν δίνουν ξεχωριστές αποικίες.



Σχήμα 16. Επίστρωση μικροοργανισμών.



Σχήμα 17. Επίστρωση μικροοργανισμών. Ο βιολογικός κρίκος αποστειρώνεται κάθε φορά που αλλάζουν οι παράλληλες γραμμές.



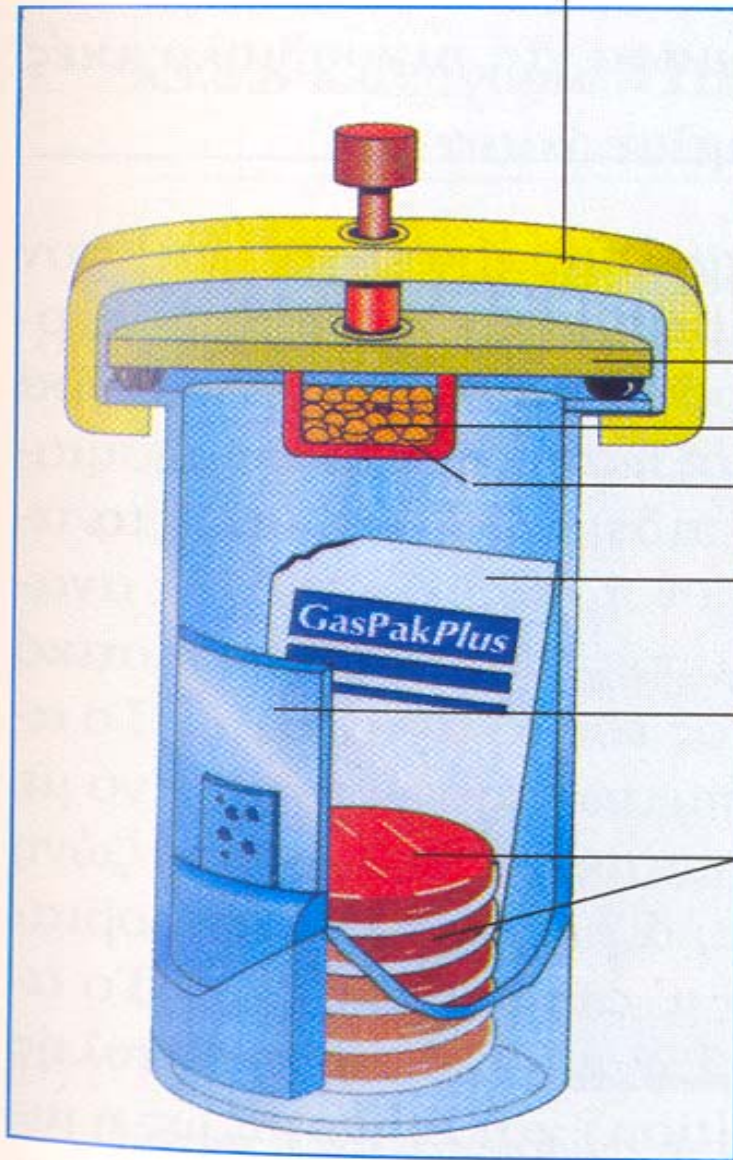
Εικόνα 5.4 Μέθοδος παραλλήλων γραμμών. Κατά τον εμβολιασμό με κρίκο εμβολιασμού χρησιμοποιείται όλη η επιφάνεια του τρυβλίου και το αποτέλεσμα είναι η αραιώση και ο διαχωρισμός των κυττάρων μεταξύ τους, τα οποία θα δώσουν το καθένα μια αξενική καλλιέργεια.

Για αναερόβιες καλλιέργειες σε στερεά θρεπτικά μέσα (τριβλία) θα πρέπει στο θρεπτικό μέσο να περιέχεται αναγωγικός παράγοντας και η επώαση να γίνεται σε ειδικό χώρο που να μην υπάρχει οξυγόνο.

Αυτό εξασφαλίζεται με ένα απλό θάλαμο κενού ή σε ειδικά δοχεία στα οποία τοποθετείται και κατάλληλος καταλύτης.

Στις αναερόβιες καλλιέργειες που χρησιμοποιείται καταλύτης αυτός είναι ενσωματωμένος στο ειδικό δοχείο επώασης με μορφή δισκίων αλουμίνας που είναι επιστρωμένα με παλλάδιο. Η παρουσία του καταλύτη και του H_2 οδηγεί στην πλήρη απομάκρυνση του O_2 από το περιβάλλον των καλλιιεργειών, αφού σχηματίζεται H_2O .

Σφικτήρας με βίδα σύσφιξης



Καπάκι με στεγανοποίηση

Σωματίδια καταλύτη

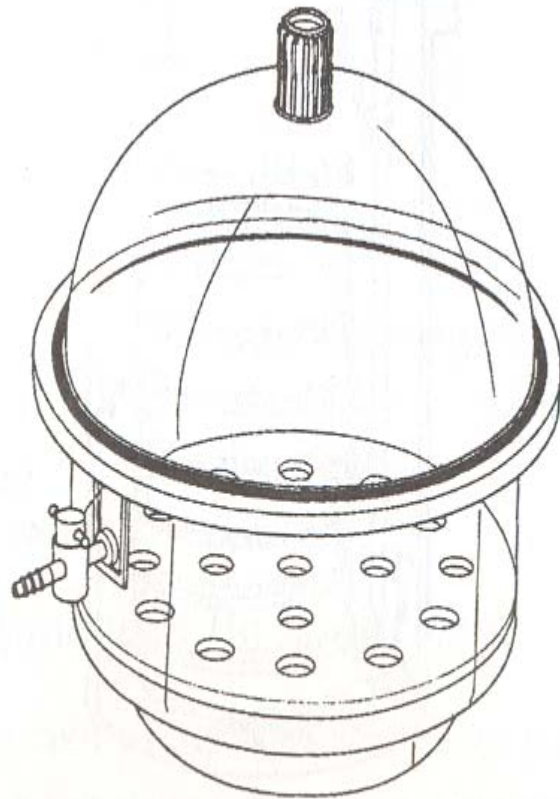
Θάλαμος κατάλυσης

Φάκελος, μιας χρήσης, για τη δημιουργία αέριου υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα

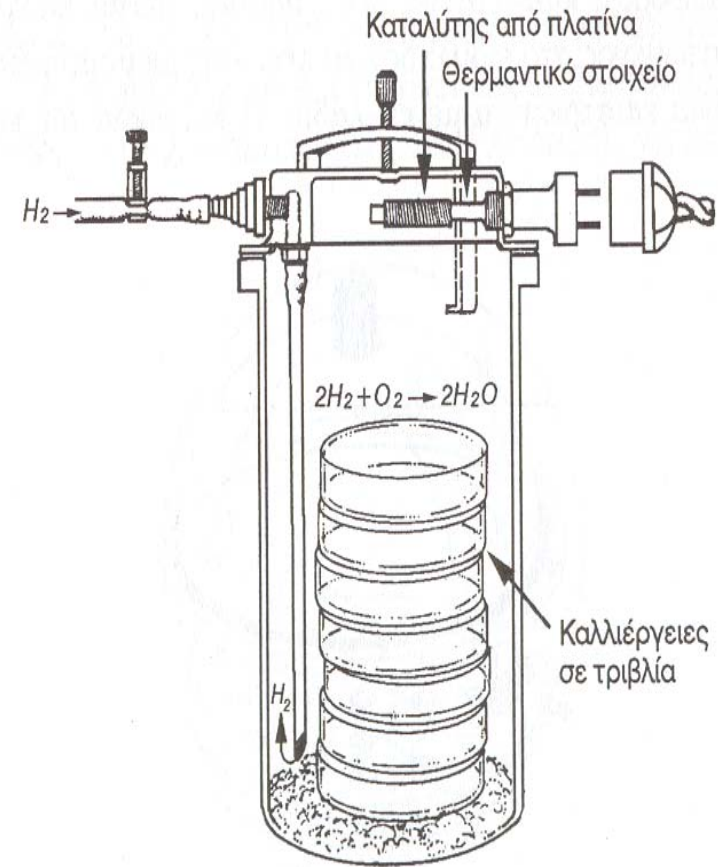
Δείκτης, μιας χρήσης, αναερόβιου περιβάλλοντος

Τρυβλία καλλιέργειών

Εικόνα 3.3. Ειδικό επωαστικό κλίβανο για αναερόβιους μικροοργανισμούς



Σχήμα 18. Απλός θάλαμος κενού (*vacuum dessicator*).



Σχήμα 19. Συσκευή για την ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών.

Οι καλλιέργειες σε στερεά θρεπτικά μέσα θεωρούνται απαλλαγμένες από διάφορα μακρομοριακά και μικρομοριακά συστατικά γιατί όλα αυτά παραμένουν μέσα στο εσωτερικό του στερεού θρεπτικού μέσου.

Γενικά η μικροβιακή μάζα από καλλιέργειες σε στερεά θρεπτικά μέσα θεωρείται αρκετά καθαρή.

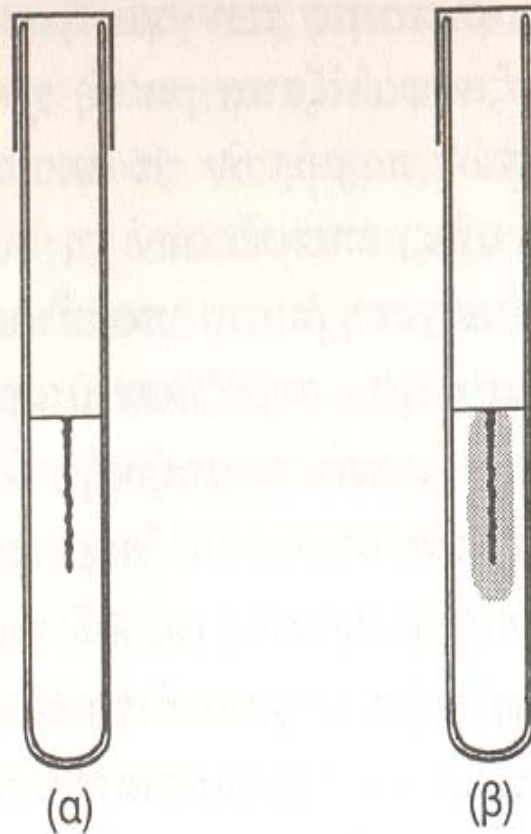
Καλλιέργειες σε ημίρευστα θρεπτικά μέσα

Τα ημίρευστα θρεπτικά μέσα δημιουργούνται αν το άγαρ που περιέχεται σ' αυτά είναι σε συγκέντρωση χαμηλότερη της κανονικής (συνήθως 0,2-0,5%).

Τα μικροαερόφιλα είναι αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί αφού, στις διάφορες μεταβολικές διαδικασίες, χρησιμοποιούν ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το O_2 . Οι οργανισμοί αυτοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου π.χ. στον ατμοσφαιρικό αέρα, όπου η περιεκτικότητα σε O_2 είναι περίπου 18%. Το

Campylobacter fetus για παράδειγμα αναπτύσσεται σε ατμόσφαιρα με 6% οξυγόνο.

Η ανάπτυξη των μικροαερόφιλων μικροοργανισμών ευνοείται στα ημίρευστα θρεπτικά μέσα γιατί η παρουσία του άγαρ, στα θρεπτικά αυτά μέσα έχει ως αποτέλεσμα τη βαθμιαία ελάττωση του διαχυμένου οξυγόνου καθώς απομακρυνόμαστε από την επιφάνεια του μέσου. Ανάλογα της συγκέντρωσης του άγαρ δημιουργείται μια διαβάθμιση στη συγκέντρωση του O_2 και γι' αυτό οι μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί θα αναπτυχθούν στο στρώμα με την κατάλληλη ποσότητα O_2 . Η ανάπτυξη αναερόβιων οργανισμών, σε τέτοια θρεπτικά μέσα, ξεκινά από βαθύτερα στρώματα του μέσου. Τα ημίρευστα θρεπτικά μέσα χρησιμοποιούνται και για τον έλεγχο της δυνατότητας ενεργού μετακίνησης των μικροοργανισμών. Ο δοκιμαστικός σωλήνας με το ημίρευστο θρεπτικό μέσο (θρεπτικός ζωμός με 0,4% άγαρ) μολύνεται με βαθύ τρύπημα βελόνας. Ενώ οι μη μετακινούμενοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται μόνο κατά μήκος της γραμμής μόλυνσης, τα βακτήρια που διαθέτουν δυνατές ενεργού μετακίνησης αναπτύσσονται και πέρα από την αρχική ευ-



Σχήμα 21. Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο όταν ο μικροοργανισμός δεν κινείται (α) ή όταν έχει δυνατότητα ενεργού κίνησης (β).

θεία δημιουργώντας μια παχειά στήλη ανάπτυξης.

Καλλιέργειες σε υγρά θρεπτικά μέσα

Η ανάπτυξη μικροοργανισμών σε υγρά θρεπτικά μέσα εφαρμόζεται όταν χρειάζεται να καλλιεργηθεί σε μεγάλη ποσότητα ένα είδος μικροοργανισμού (καθαρή καλλιέργεια). Σε υγρές καλλιέργειες μπορεί να υπάρχει είτε **εξισορροπημένη ανάπτυξη** όπου η αύξηση αριθμού των κυττάρων συμβαδίζει με την αύξηση της κυτταρικής μάζας ή μη εξισορροπημένη ανάπτυξη όπου μια ή περισσότερες από τις παραμέτρους ανάπτυξης είναι ανεξάρτητες από τον αριθμό των κυττάρων. Ως **κλειστές καλλιέργειες** χαρακτηρίζονται εκείνες όπου, μετά τον ενοφθαλμισμό του θρεπτικού μέσου με μικροοργανισμούς, δεν γίνεται καμία προσθήκη θρεπτικών υλικών ούτε αφαίρεση των προϊόντων που σχηματίζονται. Αντίθετα ως **συνεχείς καλλιέργειες** χαρακτηρίζονται εκείνες στις οποίες γίνεται συνεχής προσθήκη νέων θρεπτικών συστατικών και ταυτόχρονα αφαίρεση μικροοργανισμών και των προϊόντων τους.

Οι υγρές καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες θα πρέπει να μπορούν να προσαρμόζονται σε ειδικούς αναδευόμενους επωαστήρες έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η κατά το δυνατόν καλύτερη οξυγόνωση της καλλιέργειας. Δυο είναι τα σημεία που θα πρέπει να προσεχθούν για την ικανοποίηση των αναγκών της καλλιέργειας σε οξυγόνο: το κλείσιμο της φιάλης και η έκταση της διαχωριστικής επιφάνειας υγρού-αέρα. Η έκταση της επιφάνειας της υγρής καλλιέργειας αυξάνεται αν, για δεδομένο όγκο καλλιέργειας, χρησιμοποιείται όσο το δυνατόν μεγαλύτερου όγκου φιάλη (**δεν πρέπει ο όγκος της καλλιέργειας να υπερβαίνει το 20% του όγκου της φιάλης**) και φυσικά να υπάρχει συνεχής ανάδευση της καλλιέργειας. Η καλλιέργεια τοποθετείται στον ανακινούμενο επωαστήρα στην κατάλληλη για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού θερμοκρασία.

Για υγρές καλλιέργειες αναερόβιων μικροοργανισμών, στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται, πρέπει να έχει ληφθεί πρόνοια για την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση.

είναι απαραίτητο το οξειδοαναγωγικό δυναμικό τους να είναι χαμηλότερο του -150 mV και φυσικά θα πρέπει να έχει αφαιρεθεί ο αέρας από το άμεσο περιβάλλον της καλλιέργειας.

Τα θρεπτικά μέσα πρέπει να περιέχονται σε δοχεία στα οποία ο λόγος επιφάνεια/όγκος είναι μικρός. Φιάλες με στενό λαιμό που έχουν γεμισθεί 100% με φρέσκο καυτό θρεπτικό μέσο και έχουν κλεισθεί αεροστεγώς με κατάλληλο πώμα, αποτελούν την ιδανικότερη λύση για την ανάπτυξη αναερόβιων βακτηρίων που δεν παράγουν αέριο.

Το αναερόβιο περιβάλλον βελτιώνεται αν στο υγρό θρεπτικό μέσο προστεθεί λίγο άγαρ (0,05-0,1%).

Η αποστείρωση γίνεται αμέσως μετά την προσθήκη του αναγωγικού παράγοντα και τα θρεπτικά μέσα δεν πρέπει να φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και ποτέ στο ψυγείο, γιατί η διαλυτότητα του O_2 αυξάνεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας.

ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Το πρώτο βήμα για τη δημιουργία καθαρής καλλιέργειας ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού είναι αυτό που χαρακτηρίζεται ως **εμπλουτισμός** με τον οποίο επιδιώκεται η αύξηση του αριθμού του μικροοργανισμού που μας ενδιαφέρει σε σχέση με τους αριθμούς των άλλων μικροοργανισμών στο ίδιο δείγμα.

Στις φυσικές μεθόδους εμπλουτισμού περιλαμβάνονται η επιλογή μιας θερμοκρασίας ανάπτυξης και το μέγεθος (σημαντικό στη διήθηση).

Οι χημικές μέθοδοι εμπλουτισμού προϋποθέτουν τη χρησιμοποίηση ειδικών θρεπτικών ή τοξικών ουσιών επιτυγχάνεται με αυτό τον τρόπο επιλεκτικά η καταστολή της ανάπτυξης των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών.

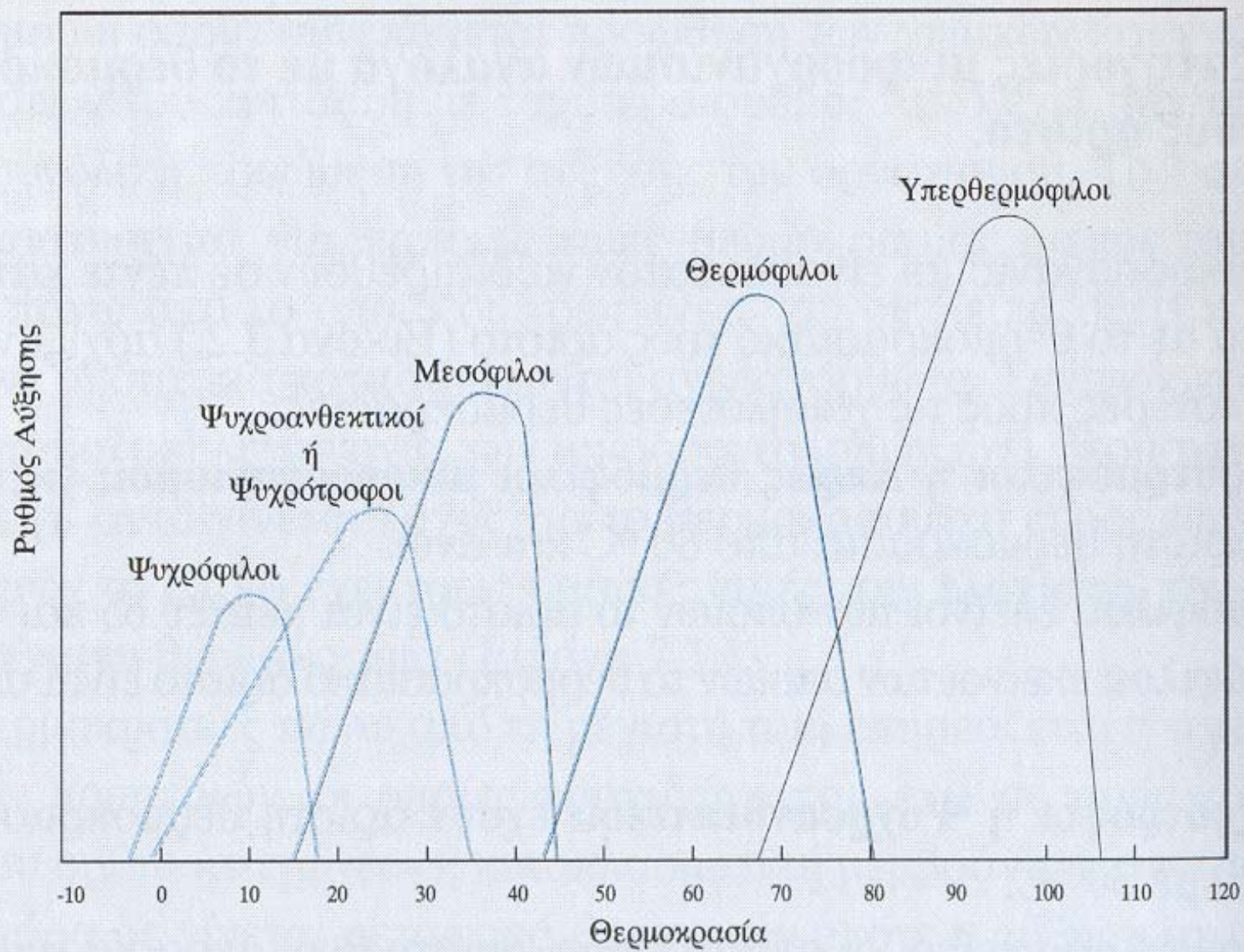
Βιολογικές μέθοδοι εμπλουτισμού.

- Στη Βακτηριολογία ο εμπλουτισμός ακολουθείται με την απομόνωση του μικροοργανισμού η οποία γίνεται σε στερεά θρεπτικά μέσα με επίστρωση,
- ενώ αν πρόκειται για υγρά θρεπτικά μέσα γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις του εμπλουτισμένου δείγματος μέχρι τέτοιου σημείου ώστε να υπάρχουν σωλήνες καλλιέργειας με **1 μικροοργανισμό**, ο οποίος πολλαπλασιαζόμενος θα δώσει τον δικό του κλώνο, δηλαδή **καθαρή καλλιέργεια**.

Εμπλουτισμός με επώαση σε χαμηλές θερμοκρασίες

Π.Χ. *Listeria monocytogenes*.

Οι μολυσμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί βυθίζονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 5 ml ειδικού θρεπτικού ζωμού *Listeria* και φυλάσσονται στους 4° C για 3 μήνες.



Εικόνα 7.2 Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών ανάλογα με το θερμοκρασιακό τους άριστο.

Εμπλουτισμός με επώαση σε υψηλές θερμοκρασίες ή με κατεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες

Θερμόφιλα βακτήρια επωάζονται σε θερμοκρασία ανώτερη των 60° C. Για τα θερμόφιλα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια ο εμπλουτισμός γίνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 80° C για 10 λεπτά.

Για τα υπερθερμόφιλα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια ο εμπλουτισμός γίνεται με θέρμανση, για 5 λεπτά στους 100° C.

Εμπλουτισμός βασιζόμενος στην κινητικότητα των μικροοργανισμών.

Ο εμπλουτισμός με το *Clostridium tetani*, γίνεται με ενοφθαλμισμό του δείγματος (εδαφικά δείγματα, ζωικά περιττώματα ή κλινικό υλικό) βαθειά μέσα σε μια μικρή περιοχή του τριβλίου με αιματούχο άγαρ και επώαση του τριβλίου σε αναερόβιες συνθήκες, στους 37° C, για 1 μέρα. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι εμφανής υπό μορφή λεπτού υμένα σε μικρή απόσταση από την αρχική περιοχή του ενοφθαλμισμού.

Εμπλουτισμός με ανάπτυξη σε θρεπτικά μέσα με ασυνήθεις τιμές pH.

Ο εμπλουτισμός του αιτιολογικού παράγοντα της φυματίωσης, του **Mycobacterium tuberculosis**, γίνεται με κατεργασία του δείγματος, σε αλκαλικό διάλυμα. Το NaOH καταστρέφει τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, αφού το Mycobacterium είναι ανθεκτικό στην αλκαλική κατεργασία.

Εμπλουτισμός με ανάπτυξη σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν ειδικές ουσίες.

Ο εμπλουτισμός με τον αιτιολογικό παράγοντα της διφθερίτιδας, το **Corynebacterium diphtheriae** και με διάφορα είδη **στρεπτοκόκκων** (*Streptococcus mitis* και *S. salivarius*) γίνεται με επίστρωση σε τριβλία αιματούχου άγαρ με κυστίνη τα οποία περιέχουν **potassium tellurite** σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ανάλογα του μικροοργανισμού του οποίου επιδιώκεται η απομόνωση. Το potassium tellurite που παρεμποδίζει

την ανάπτυξη των gram αρνητικών και πολλών gram θετικών βακτηρίων, επιτρέπει σε συγκέντρωση 0,0375% την ανάπτυξη του *C. diphtheria* το οποίο σχηματίζει, εξαιτίας του tellurite, γκρίζες ή μαύρες αποικίες.

Το potassium tellurite, σε συγκέντρωση 0,001%, επιτρέπει την ανάπτυξη στρεπτοκόκκων οι οποίοι σχηματίζουν γαλάζιες αποικίες.

Εμπλουτισμός με σταφυλόκοκκους μπορεί να γίνει και με τη χρήση θρεπτικών μέσων που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση NaCl (7,5%).

To Mannitol salt agar

(MSA) είναι ένα εκλεκτικό υλικό το οποίο περιέχει NaCl (7,5%), το σάκχαρο μαννιτόλη και ένα δείκτη pH το κόκκινο της φαινόλης (phenol red).

Βακτήρια τα οποία μπορούν να ζυμώσουν την μαννιτόλη παράγουν όξινα τελικά προϊόντα προκαλώντας αλλαγή του χρώματος. Το κόκκινο της φαινόλης σε pH μεγαλύτερο του 8,5 παρουσιάζει έντονο κόκκινο προς το μωβ χρώμα. Σε pH μεταξύ 6,9-8,5 κίτρινο-κόκκινο και σε pH κάτω του 6,9 έντονο κίτρινο.

Αν και τα βακτήρια *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus* αναπτύσσονται στο υλικό MSA μόνο ο *Staphylococcus aureus* ζυμώνει την μαννιτόλη προκαλώντας την αλλαγή του χρώματος από έντονο κόκκινο προς το κίτρινο.

Ετσι επιτυγχάνεται η διαφορική διάγνωση μεταξύ του *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus*.



Staphylococcus aureus

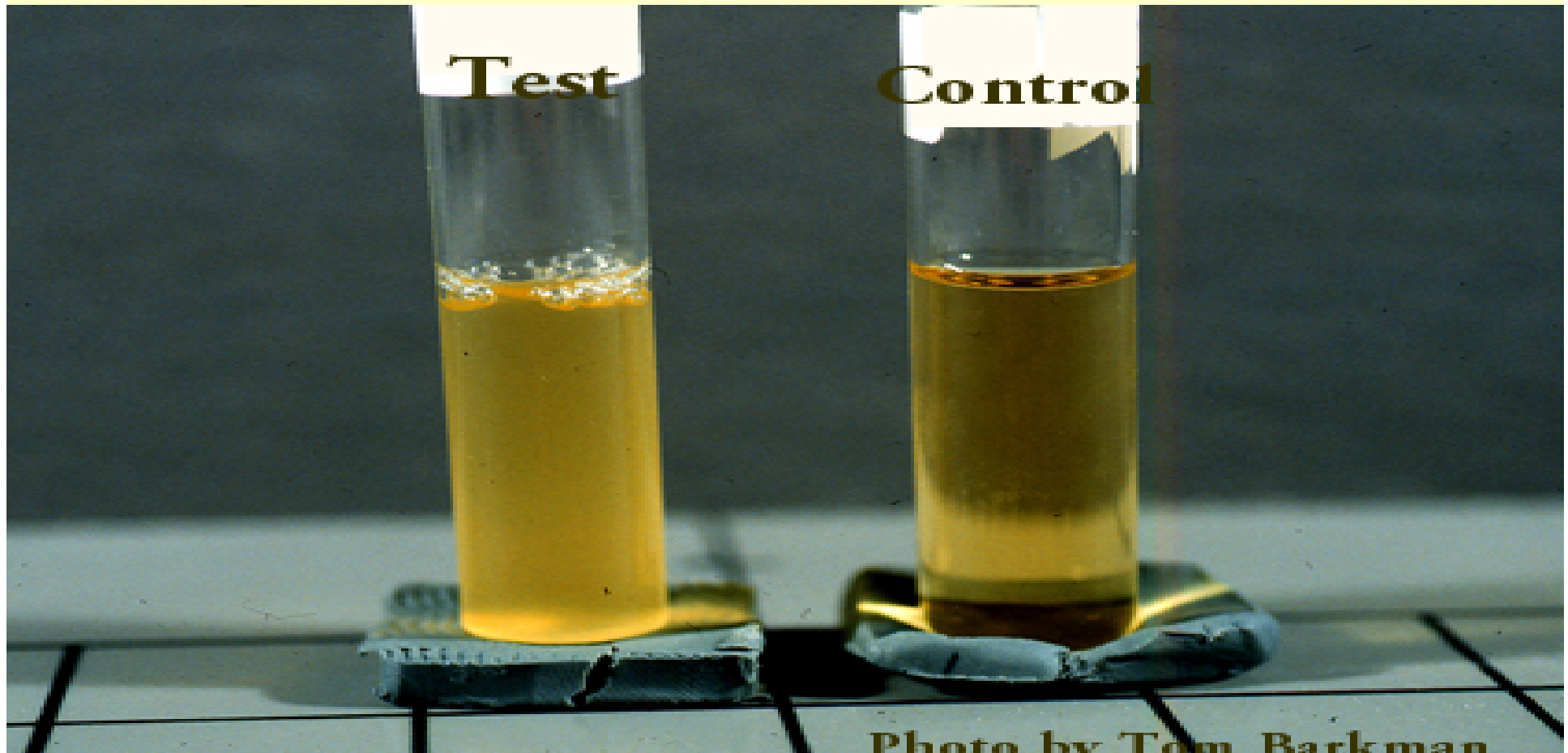
Staphylococcus epidermidis

Ο εμπλουτισμός με **Halobacteria**, στα οποία περιλαμβάνονται τα ερυθρά ραβδόμορφα του γένους *Halobacterium* και οι κόκκοι του γένους *Halococcus* που ευδοκιμούν σε έντονα αλατισμένα πρωτεϊνούχα προϊόντα (π.χ. παστά ψάρια), σε κλειστές θάλασσες και λίμνες με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, ή και στο ίδιο το αλάτι που προέρχεται από αυτές, γίνεται με καλλιέργεια των δειγμάτων σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν τουλάχιστον 20% NaCl όπως είναι το μέσο **Halophile Medium** το οποίο περιέχει:

Εκχύλισμα ζύμης	10,0	gr
Κιτρικό Νάτριο	3,0	gr
Casamino acids	7,5	gr
KCl	2,0	gr
MgSO₄ 7 H₂O	20,0	gr
FeCl₂	0,023	gr
NaCl	250,0	gr
Αποσταγμένο H₂O	1.000	ml

Το pH ρυθμίζεται σε 7,4 και ακολουθεί αποστείρωση 121 0C για 15 λεπτά.

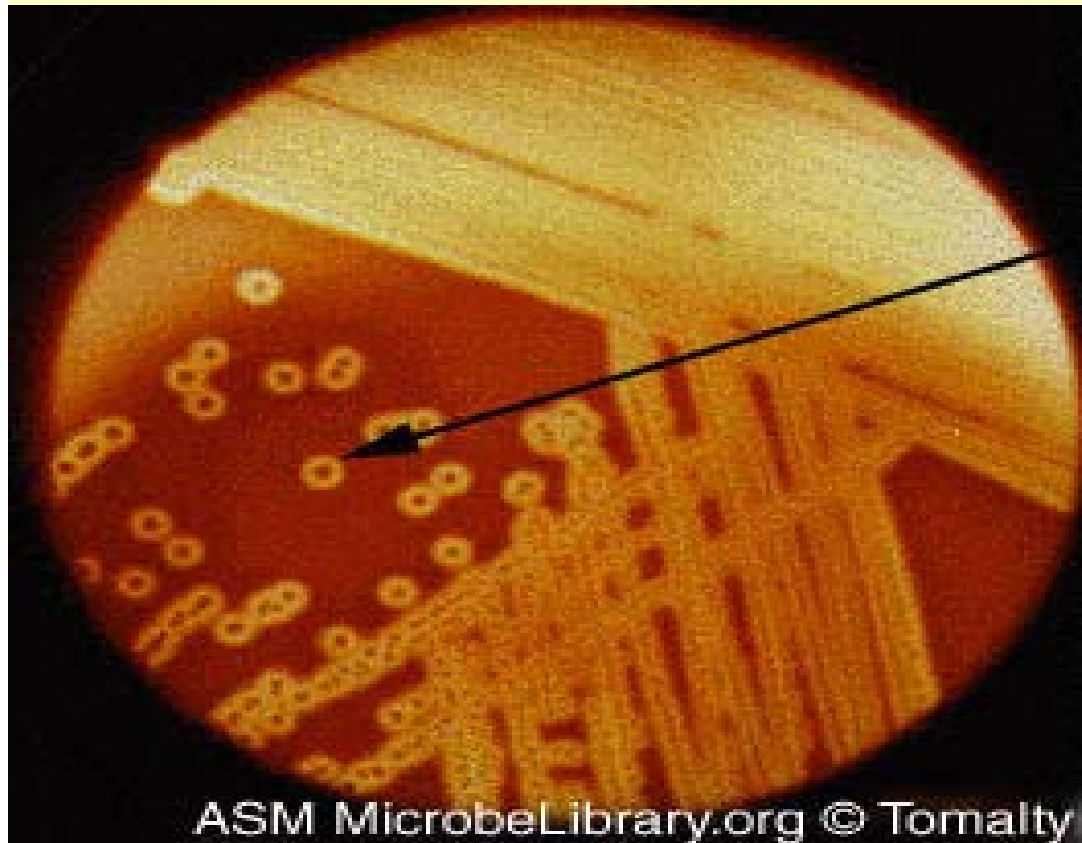
Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθενται 20 gr άγαρ /λίτρο.



Ανάπτυξη Halobacterium αριστερά. Δεξιά ο αρνητικός μάρτυρας.

Εμπλουτισμός με αιματούχο άγαρ

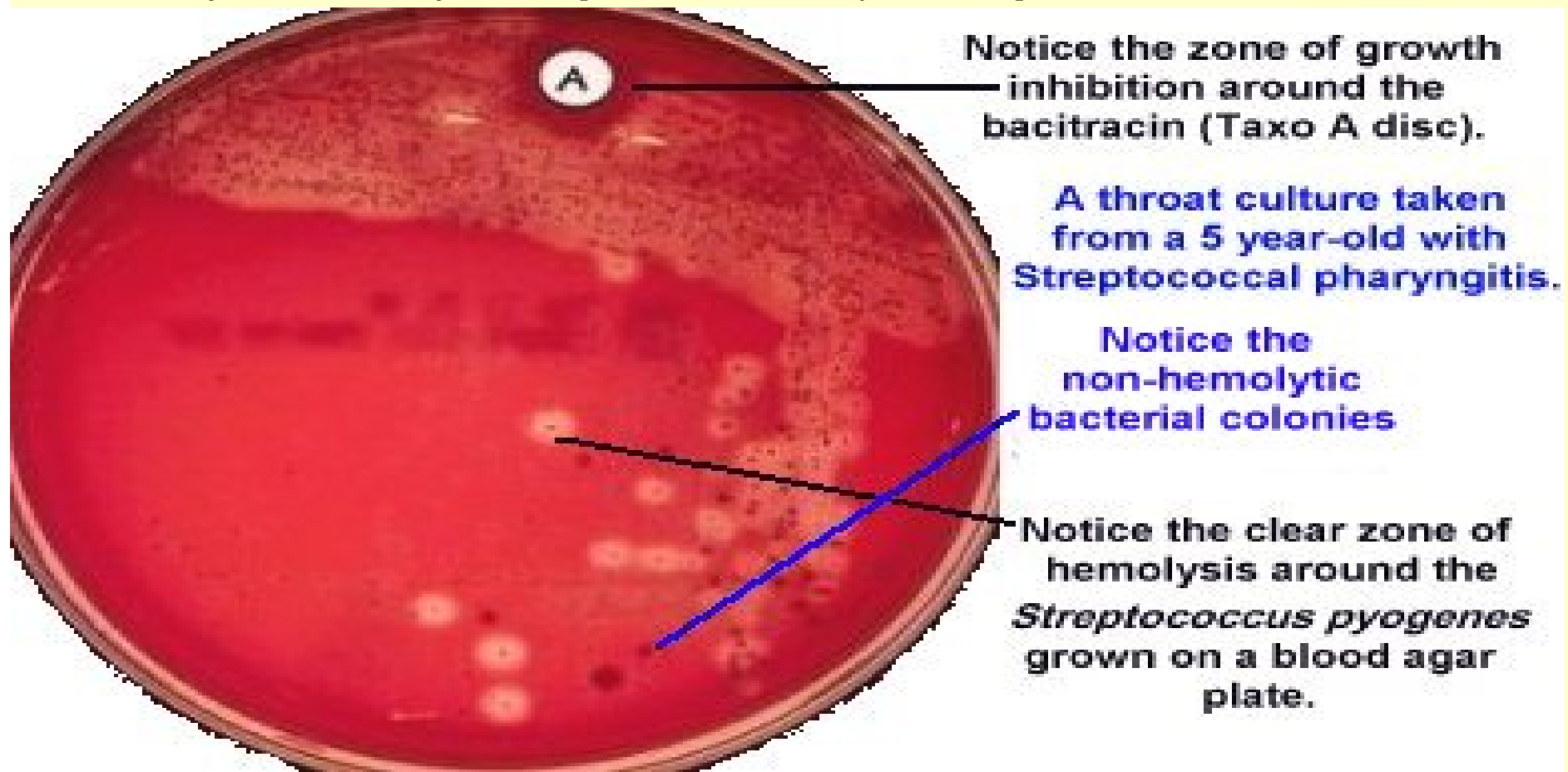
Χρησιμοποιείται ευρύτατα στην Ιατρική Βακτηριολογία .Είναι δείκτης αιμολυτικής δραστηριότητας, ιδιότητα που συνοδεύει ορισμένα βακτήρια, όπως το *Streptococcus pyogenes* το οποίο παράγει μια σειρά από τοξίνες εκ των οποίων ορισμένες προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας διαυγούς ζώνης γύρω από την αποικία η οποία αποκαλείται β-αιμόλυση.



Note the clear zone of beta-hemolysis surrounding the *Streptococcus* colonies when grown on blood agar.

Υπάρχουν όμως και άλλοι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι εκτός του *Streptococcus pyogenes*. Ο *Streptococcus pyogenes* είναι ευαίσθητος στο αντιβιοτικό Bacitracin (δίσκος A) και έτσι δεν θα παρατηρείται ανάπτυξη γύρω από τον δίσκο (A) εμποτισμένο με το αντιβιοτικό Bacitracin.

Παρατήστε ότι στο αιματούχο άγαρ αναπτύσσονται και άλλες αποικίες οι οποίες δεν προκαλούν αιμόλυση.



Εμπλουτισμός με χρήση αντιβιοτικών

Ο εμπλουτισμός με βακτήρια του γένους *Mycoplasma*, που ως γνωστό στερούνται κυτταρικού τοιχώματος, γίνεται με ενσωμάτωση στο θρεπτικό τους μέσο (E Agar) αντιβιοτικών τα οποία έχουν ως στόχο δράσης το κυτταρικό τοίχωμα. Ένα τέτοιο αντιβιοτικό, η πενικιλίνη, σε συγκέντρωση 194 U/ml, παρεμποδίζει την ανάπτυξη πολλών άλλων μικροοργανισμών, εκτός των μυκοπλάσμάτων.



Χαρακτηριστική αποικία μυκοπλάσματος (με την μορφή «τηγανιτού αυγού») σε θρεπτικό μέσο E Agar

ΘΡΕΨΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Στοιχείο	Συνήθης μορφή της θρεπτικής ουσίας στο περιβάλλον	Χημική μορφή στα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας
Άνθρακας (C)	CO ₂ , οργανικές ενώσεις	Γλυκόζη, πυροσταφυλικό οξύ, αμινοξέα, σύνθετα μείγματα (εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη κ.λπ.)
Υδρογόνο (H)	H ₂ O, οργανικές ενώσεις	H ₂ O, οργανικές ενώσεις
Οξυγόνο (O)	H ₂ O, O ₂ , οργανικές ενώσεις	H ₂ O, O ₂ , οργανικές ενώσεις
Άζωτο (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , οργανικές ενώσεις του αζώτου	Ανόργανα: NH ₄ Cl, (NH ₄)SO ₄ Οργανικά: Αμινοξέα, αζωτούχες βάσεις νουκλεοτιδίων
Φωσφόρος (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Κάλιο (K)	K ⁺ σε διάλυμα ή διάφορα άλατα K	KCl, KH ₂ PO ₄
Μαγνήσιο (Mg)	Mg ²⁺ σε διάλυμα ή διάφορα άλατα Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄
Νάτριο (Na)	Na ⁺ σε διάλυμα ή NaCl και άλλα άλατα Na	NaCl
Ασβέστιο (Ca)	Ca ²⁺ σε διάλυμα ή CaSO ₄ και άλλα άλατα Ca	CaCl ₂

ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

3.3 Μικροβιολογικά Θρεπτικά Υποστρώματα

3.3.1 Ορισμός

Μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα είναι κάθε υγρό ή στερεό μέσο το οποίο μπορεί να καλύψει τις θρεπτικές ανάγκες ενός μικροβιακού κυττάρου.

Περιέχει απαραίτητα: νερό, πηγή άνθρακα, πηγή ενέργειας, πηγή αζώτου και πηγή αλάτων.

Συχνά η πηγή άνθρακα και η πηγή αζώτου εξυπηρετείται από την ίδια χημική ουσία.

3.3.2 Κατηγορίες μικροβιολογικών θρεπτικών υποστρωμάτων

3.3.3.1 Κατηγορία I: ως προς τη χημική σύσταση (γνωστή ή άγνωστη)

α) **Χημικώς ορισμένα θρεπτικά υποστρώματα ή συνθετικά υποστρώματα.** Η χημική σύστασή τους είναι πλήρως γνωστή.

β) **Σύνθετα ή εμπειρικά θρεπτικά υποστρώματα.** Άλλοι όροι που

χρησιμοποιούνται για την ίδια κατηγορία είναι: **πολύπλοκα ή φυσικά υποστρώματα**. Η σύσταση αυτών είναι άγνωστη. **Τέτοια υποστρώματα είναι χρήσιμα γιατί είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και συνήθως καλύπτουν τις θρεπτικές απαιτήσεις πολλών διαφορετικών μικροοργανισμών.**

Κυρίως είναι εύχρηστα όταν δεν είναι γνωστές οι εξειδικευμένες θρεπτικές απαιτήσεις των μικροοργανισμών που μελετώνται διότι είναι δύσκολο να κατασκευαστεί ένα χημικώς ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα για κάποιο συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

Τέτοια φυσικά ή εμπειρικά υποστρώματα είναι οι πεπτόνες, το εκχύλισμα κρέατος, το εκχύλισμα ζύμης κ.λ.π. Οι πεπτόνες είναι υδρολυμένες πρωτεΐνες που παρασκευάζονται από μερική υδρολυτική πέψη κρέατος, σογιάλευρου και άλλων πηγών πρωτεϊνών. Συνεισφέρουν ως πηγές άνθρακα, ενέργειας και αζώτου. Το εκχύλισμα κρέατος περιέχει αμινοξέα, πεπτίδια,

νουκλεοτίδια, οργανικά οξέα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Το εκχύλισμα ζύμης είναι μια εξαιρετική πηγή βιταμινών Β καθώς επίσης αζώτου και άνθρακα.

Κοινά εμπειρικά θρεπτικά υποστρώματα είναι ο θρεπτικός ζωμός (Nutrient Broth), ζωμός σόγιας (Tryptic Soy Broth) και το άγαρ MacConkey.

Κατηγορία II: ως προς το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σ' αυτά

α) Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Είναι εκείνα τα θρεπτικά υποστρώματα τα οποία ευνοούν την αύξηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Χολικά άλατα, χρωστικές όπως το κρυσταλλικό ιώδες ευνοούν την αύξηση των Gram αρνητικών βακτηρίων αναστέλλοντας την αύξηση των Gram θετικών.

Ένα υπόστρωμα που περιέχει χολικά οξέα και χρωστικές κατά των Gram θετικών είναι το Mac-Conkey άγαρ το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο και χρησιμοποιείται

για την αύξηση του βακτηρίου *E. coli* (G^-) και άλλων βακτηρίων του υδάτινου οικοσυστήματος. Ένα θρεπτικό το οποίο περιέχει κυτταρίνη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας είναι κατάλληλο για την απομόνωση κυτταρινολυτικών βακτηρίων.

β) Διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα. Το άγαρ αίματος είναι διαγνωστικό υπόστρωμα και συγχρόνως υπόστρωμα εμπλουτισμού. Διαχωρίζει τα αιμολυτικά (π.χ. οι στρεπτόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι που προέρχονται από τον οισοφάγο παράγουν μια καθαρή ζώνη γύρω από τις αποκίεις λόγω καταστροφής των ερυθροκυττάρων) από τα μη αιμολυτικά βακτήρια.

Κατηγορία III: ως προς το αν υποστηρίζεται περισσότερο η αύξηση των βακτηρίων ή των μυκήτων

α) Βακτηριολογικά θρεπτικά υποστρώματα.

Τα βακτήρια ως γνωστό είναι αυτότροφα ή ετερότροφα και τα θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να αντανακλούν αυτά τα χαρακτηριστικά.

Τα **φωτοαυτότροφα** βακτήρια απαιτούν φως ως πηγή ενέργειας και CO₂ ως πηγή άνθρακα, νερό και μερικά διαλυτά ανόργανα ιόντα για την αύξησή τους.

Τα **χημειοαυτότροφα** βακτήρια έχουν τις ίδιες θρεπτικές απαιτήσεις αλλά ως πηγή ενέργειας προτιμούν απλές οργανικές ουσίες και όχι φως.

Οι οργανικές ενώσεις που απαιτούνται για την αύξηση ετερότροφων βακτηρίων ποικίλουν ανάμεσα στις ομάδες των βακτηρίων π.χ. η *E. coli* μπορεί

να αυξάνεται σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει οργανικές ενώσεις (σάκχαρα) και ανόργανα ιόντα. Άλλα όμως ετερότροφα βακτήρια απαιτούν τουλάχιστον 20 αμινοξέα και μερικές βιταμίνες για την αύξησή τους. Γενικά **οι περισσότεροι μικροοργανισμοί έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις και γι' αυτό το λόγο η καλλιέργειά τους απαιτεί εμπειρικά θρεπτικά υποστρώματα.**

β) Μυκητολογικά θρεπτικά υποστρώματα. Οι μύκητες απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος με τη βοήθεια ενζύμων που εκκρίνουν στο περιβάλλον και διασπούν μεγάλα οργανικά μόρια σε μικρότερα, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν μέσα στα μυκητιακά κύτταρα. **Όλοι οι μύκητες είναι ετερότροφοι.** Συνήθως αυξάνονται σε απλά θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν σάκχαρα, ανόργανη ή οργανική πηγή αζώτου και ελάχιστα ιχνοστοιχεία. Συνήθως τα θρεπτικά υποστρώματα που προορί-

ζονται για μυκητιακή αύξηση περιέχουν υψηλό ποσοστό σακχάρων και χαμηλό εύρος pH (3,8- 5,6). Αυτές οι συνθήκες περιορίζουν την αύξηση των περισσότερων βακτηρίων (εύρος pH 6,5-7,5).

Πίνακας 3.8

Συστατικό	Λειτουργία	Ποσότητα (g/l νερού)
Πεπτόνη	Πηγή αζώτου, άνθρακα, ιχνοστοιχείων	10
Γλυκόζη	Πηγή άνθρακα και ενέργειας, (υψηλή συγκέντρωση ευνοεί την αύξηση των μυκήτων αλλά αναστέλλει την αύξηση των βακτηρίων)	40
Άγαρ		15
pH	Χαμηλό pH καταστέλλει τη βακτηρική αύξηση, αλλά επάγει τη μυκητιακή αύξηση	5,6

Κατηγορία IV: ως προς το αν είναι υγρά ή στερεά

Στερεά θρεπτικά υποστρώματα. Για τη στερεοποίηση των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων, με σκοπό την επιφανειακή καλλιέργεια των μικροοργανισμών, γίνεται προσθήκη 1 έως 2% (με συνηθέστερη συγκέντρωση 1,5%) άγαρ. Το άγαρ είναι ένα θειϊκό πολυμερές το οποίο αποτελείται από D-γαλακτόζη, 3,6-ανυδρη-L-γαλακτόζη και γλυκουρονικό οξύ. Συνήθως εκχειλίζεται από ερυθροφύκη, στερεοποιείται σε θερμοκρασία 40-42° C έχει την δυνατότητα επανυγροποίησής του σε θερμοκρασία 80-90° C. Ένα επιπλέον πλεονέκτημά του είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να το αποικοδομήσουν.

Κατηγορία V: ως προς το αν υποστηρίζεται η αύξηση των αναερόβιων μικροοργανισμών

Αν σ' ένα θρεπτικό υπόστρωμα προστεθεί κάποιος αναγωγικός παράγοντας υπάρχει η δυνατότητα αφαίρεσης του οξυγόνου από το θρεπτικό υπόστρωμα. Τα θρεπτικά αυτά υποστρώματα καλούνται αναγωγικά και είναι κατάλληλα για την αύξηση αναερόβιων μικροοργανισμών. Για την ανάπτυξη των αποκλειστικά αναερόβιων μικροοργανισμών (όπως π.χ. τα Αρχαία που αναπτύσσονται απουσία οξυγόνου και παράγουν μεθάνιο). Κατά την προπαρασκευή του το θρεπτικό υπόστρωμα βράζει για την εξαέρωση όλου του διαλυμένου οξυγόνου και χρησιμοποιείται συνεχής ροή αερίου αζώτου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ ως αναγωγικός παράγοντας χρησιμοποιείται συνήθως η κυστεΐνη. Επιπλέον κατά την αύξηση αυτών των μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται ειδικοί επωαστικοί αναερόβιοι κλίβανοι

Κατηγορία VI: θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμού

Όταν στόχος μας είναι η απομόνωση κάποιου συγκεκριμένου είδους μικροοργανισμού το οποίο βρίσκεται σε χαμηλή πληθυσμιακή συγκέντρωση στο φυσικό του περιβάλλον είναι απαραίτητη η χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων εμπλουτισμού.

Σ' αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται ανασταλτικοί παράγοντες για τη μείωση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών.

Μετά από σειρά ανακαλλιεργειών σε νέα πανομοιότυπα θρεπτικά υποστρώματα το προς μελέτη μικροβιακό είδος γίνεται το κυρίαρχο στο εμπλουτισμένο υπόστρωμα.

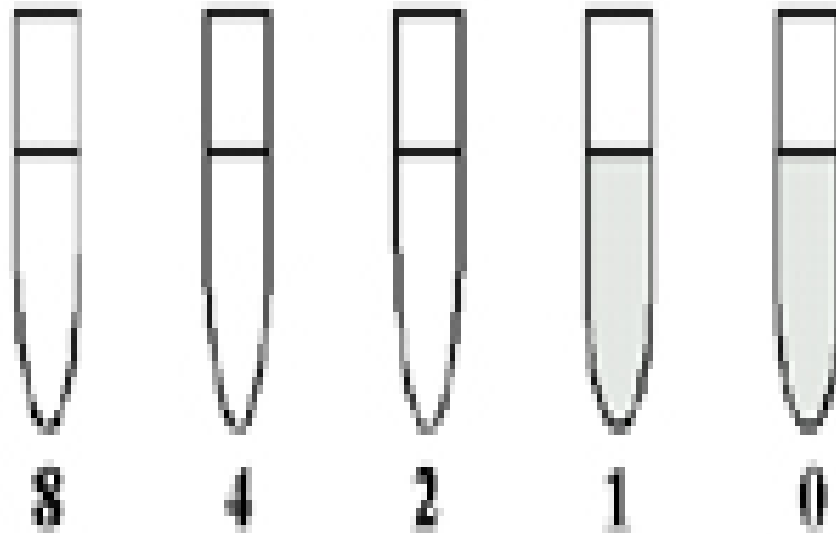
Για παράδειγμα τα **φαινολοοξειδωτικά** βακτήρια απομονώνονται σε δείγματα εδάφους εμπλουτισμένα με θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιέχει **άλατα αμμωνίου και φαινόλη σαν τη μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας**. Μετά από ένα μεγάλο αριθμό ανακαλλιεργειών στο παραπάνω υπόστρωμα θα επικρατήσουν οι μικροοργανισμοί που οξειδώνουν την φαινόλη.

Κατηγορία VII: Θρεπτικά υποστρώματα για μικροβιολογικές βιοδοκιμές

Συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί δείκτες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αντιβιοτικών σε διάφορα υποστρώματα. Αυτού του είδους οι δοκιμές απαιτούν προσδιορισμό της αναστολής της αύξησης η οποία προκαλείται από το περιεχόμενο αντιβιοτικό και συνήθως ο βαθμός αναστολής είναι ανάλογος του αντιβιοτικού. Το αντιβιοτικό διαχέεται ακτινωτά γύρω από τον εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό δίσκο (από διηθητικό χαρτί) και δημιουργεί ευδιάκριτη ζώνη αναστολής της μικροβιακής αύξησης. Το αποτέλεσμα της βιοδοκιμής είναι η **Ελάχιστη Συγκέντρωση Αναστολής (ΕΣΑ ή MCI= Minimum Concentration Inhibition)** και ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση του ανασταλτικού παράγοντα η οποία είναι ικανή να αναστείλει την αύξηση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

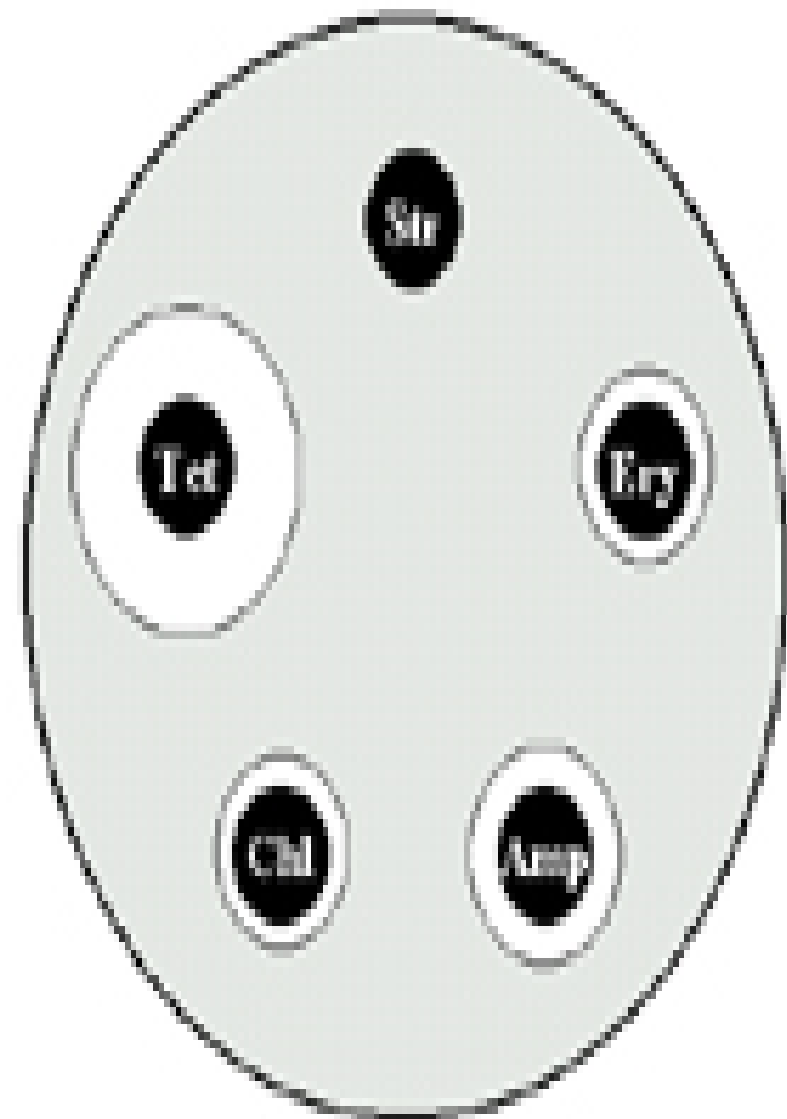
Disk Diffusion Test

Determination of MIC



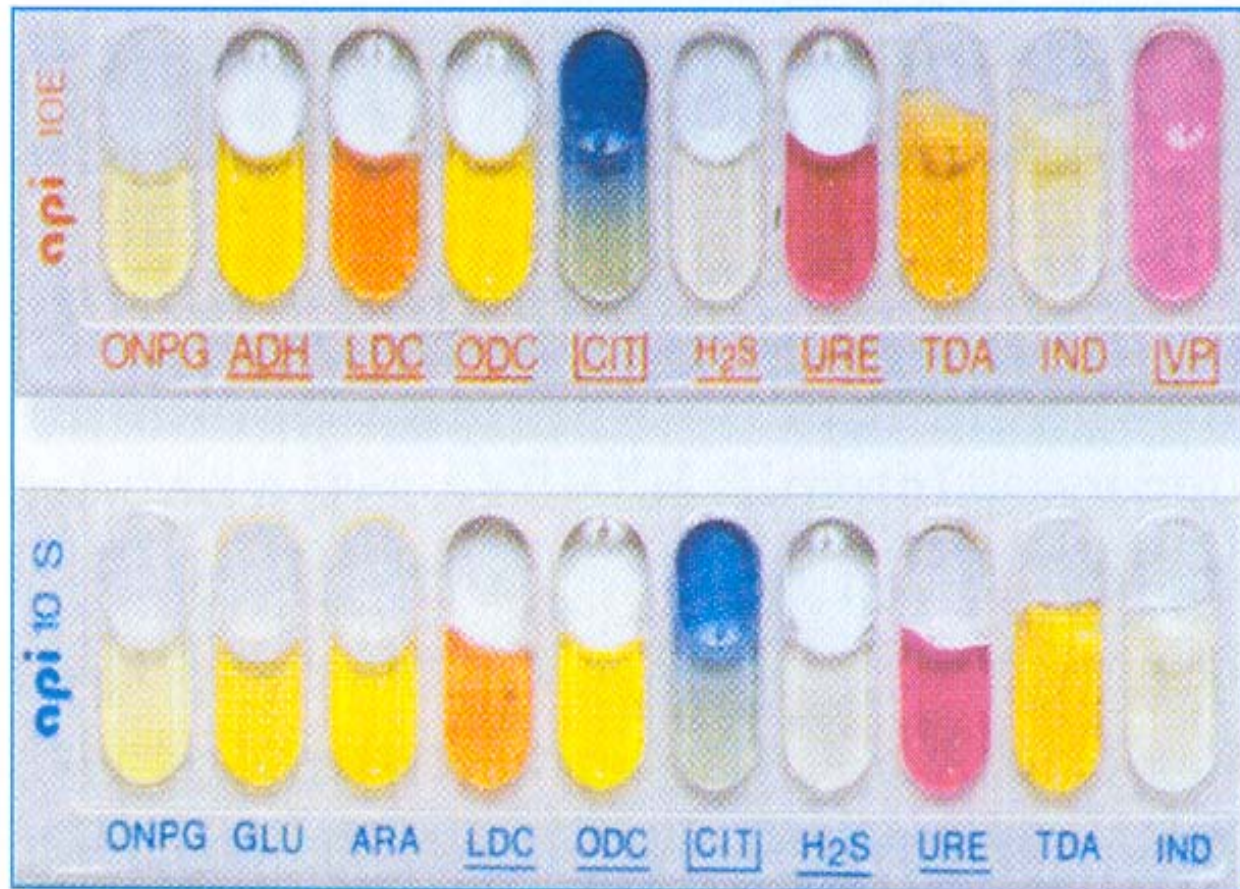
Tetracycline ($\mu\text{g/ml}$)

MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$



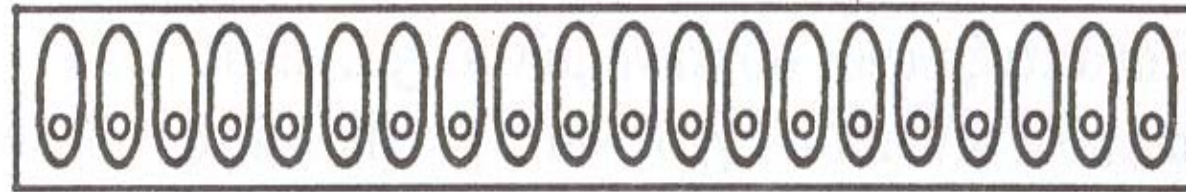
Κατηγορία VIII: Θρεπτικά υποστρώματα για τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών

Για τον άμεσο προσδιορισμό του είδους των μικροοργανισμών στο εργαστήριο, χρησιμοποιούνται πλαστικοί δίσκοι οι οποίοι περιέχουν πολλούς μικρούς σωλήνες με ξηρά λυοφιλοποιημένα διαφορετικά υποστρώματα. Όταν προστεθεί εναιώρημα μικροβιακής καλλιέργειας σε κάθε ένα από τους μικρούς σωλήνες, το θρεπτικό υπόστρωμα ενυδατώνεται και οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται μέσα σ' αυτούς μετά την επώαση των πλαστικών δίσκων σε κλιβάνους της απαιτούμενης θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα είναι άμεσα και αξιολογούνται εύκολα βάσει ειδικών πινάκων. (Σύστημα API)



Εικόνα 3.5. Το σύστημα ταυτοποίησης API 10E και API 10S που φαίνεται στην εικόνα χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (κυρίως βακίλλων). Αποτελεί ένα εύχρηστο σύστημα μικροσωλήνων σχεδιασμένο για την εκτέλεση βασικών βιοχημικών αντιδράσεων σε απομονωμένες αποικίες βακτηρίων που προέρχονται από τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Μετά τον εμβολιασμό και την επώαση (18 έως 24 ώρες στους 35 με 37 °C) κάθε κύτταρο αντιδρά με τα συστατικά των μικροσωλήνων προκαλώντας χρωματική αλλαγή.

API-20E



+ Έλεγχος οξειδάσης

Αποτελέσματα + - + + + + - - + - - - + - - - + - + + -

Τιμή θετικού αποτελέσματος 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

Άθροισμα τιμών των θετικών ελέγχων (ανά 3)



Σχήμα 30. Το σχήμα δείχνει πως τα αποτελέσματα του ελέγχου API-20E μετατρέπονται σε ένα επταψήφιο αριθμό ο οποίος μετά από επεξεργασία στον ηλεκτρονικό υπολογιστή αποκαλύπτει την ταυτότητα του μικροοργανισμού για τον οποίο εφαρμόστηκε ο έλεγχος.

Εξειδικευμένες Μικροβιακές Τεχνικές για την Καλλιέργεια των Μικροοργανισμών στο Εργαστήριο

Δοχείο καλλιέργειας μπορεί να είναι μια γυάλινη κωνική φιάλη, ένα τρυβλίο Petri, ένας δοκιμαστικός σωλήνας, ένας σωλήνας γενικής χρήσεως (universal) με βιδωτό πώμα.

Εμβόλιο μικροοργανισμού: είναι μικρή ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων μικροοργανισμού η οποία μπορεί να μεταφερθεί με κάποια μέθοδο εμβολιασμού σ' ένα καθαρό θρεπτικό υπόστρωμα.

Θρεπτικό υπόστρωμα

Απομόνωση μικροοργανισμού σε καθαρή καλλιέργεια

Είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί σε ένα φυσικό περιβάλλον αναπτύσσονται ως μικτοί πληθυσμοί πολλών διαφορετικών ειδών. Είναι λοιπόν απαραίτητο να επιτευχθεί **αξενική ή καθαρή καλλιέργεια** του συγκεκριμένου μικροβιακού είδους. Υπάρχουν πάρα

πολλοί τρόποι για να προετοιμάσει και να επιτύχει κάποιος μια καθαρή καλλιέργεια μικροοργανισμού. Παρατίθενται οι πλέον εύχρηστες μέθοδοι, των οποίων συνήθως απαιτείται συνδυασμός για την επίτευξη του καλύτερου αποτελέσματος.

1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Συνήθως είναι προκαταρκτική διαδικασία απαραίτητη για την απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού

2 Μέθοδος παραλλήλων γραμμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Εφαρμόζεται πάντα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ποσότητα εναιωρήματος μικροοργανισμών μεταφέρεται σε σημείο του τρυβλίου κοντά στο τοίχωμα και τοποθετείται πάνω στο στερεοποιημένο με άγαρ θρεπτικό υλικό. Έτσι δημιουργείται μια πηγή μικροοργανισμών για την περαιτέρω διασπορά των μικροοργανισμών μέσα στο δοχείο καλλιέργειας. Ένα χρήσιμο εργαλείο γι' αυτή τη μέθοδο είναι ο κρίκος εμβολιασμού μέσω του οποίου μεταφέρονται οι μικροοργανισμοί σ'

όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Σύροντας τον κρίκο πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου διαγράφονται ελικοειδείς παράλληλες γραμμές χωρίς να καταστρέφεται η στερεοποιημένη λεία επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Το αποτέλεσμα είναι η αραίωση και ο διαχωρισμός των κυττάρων μεταξύ τους, τα οποία θα δώσουν το καθένα μια αξενική αποικία.

3 Διασπορά των μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri

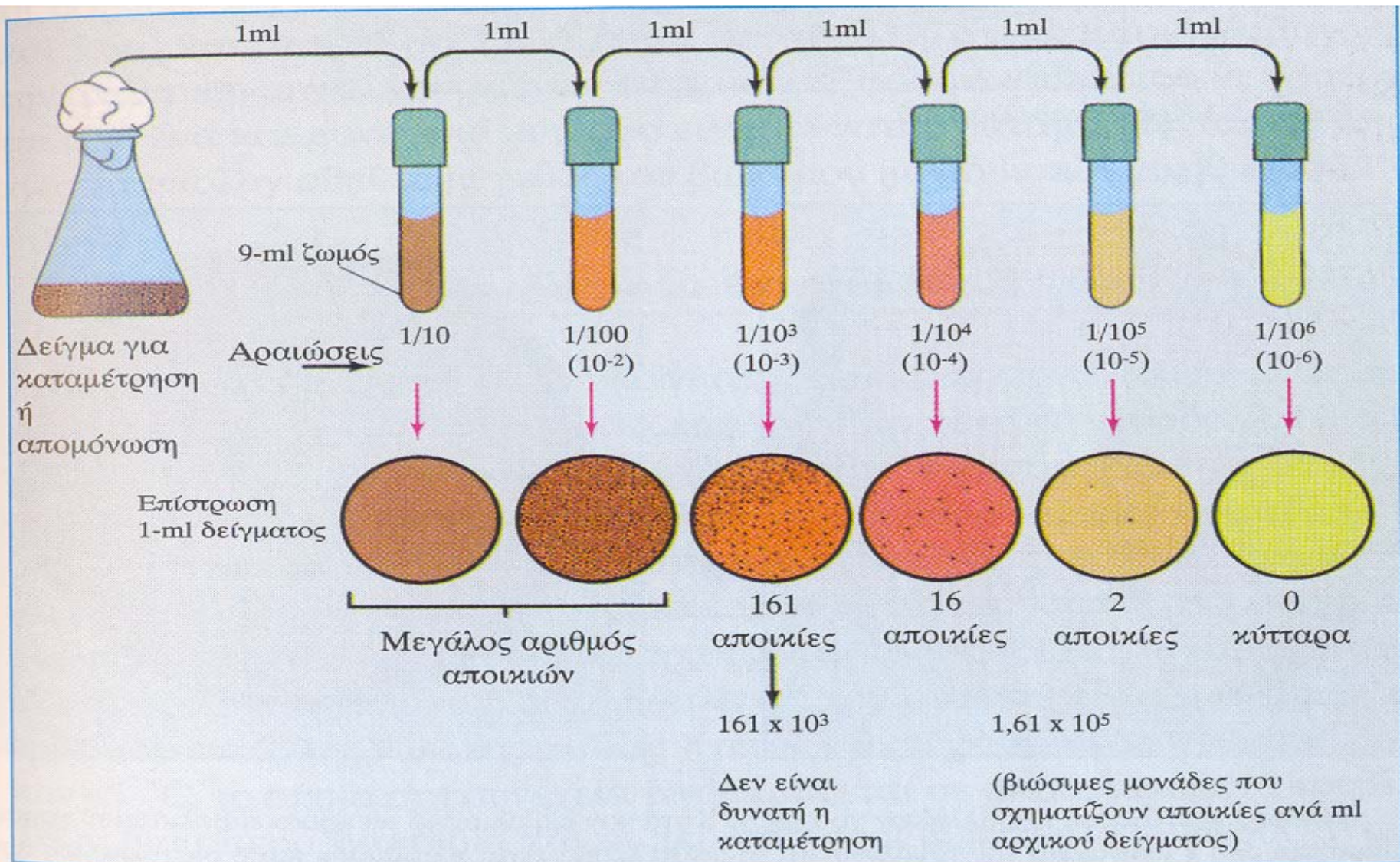
Εναιώρημα κυττάρων είναι δυνατόν να διασπαρθεί ομοιογενώς πάνω στη στερεοποιημένη επιφάνεια ενός θρεπτικού υλικού με την βοήθεια γυάλινης ράβδου η οποία καλείται διανομέας. Κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατός ο διαχωρισμός και η απομάκρυνση των κυττάρων μεταξύ τους ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Κάθε αποικία αντιπροσωπεύει μια καθαρή καλλιέργεια. Η διαδικασία έχει ως εξής: το δείγμα του μίγματος των μικροοργανισμών αραιώνεται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Από συγκεκριμένη αραίωση λαμβάνε-

ται μικρός όγκος εναιωρήματος ο οποίος πρέπει να περιέχει από 100 έως 200 κύτταρα περίπου και μεταφέρεται στο κέντρο στερεοποιημένου με άγαρ θρεπτικού υλικού το οποίο βρίσκεται μέσα σε τρυβλίο Petri. Το εναιώρημα των κυττάρων διασπείρεται πάνω στην επιφάνεια με τη βοήθεια της αποστειρωμένης κεκαμένης γυάλινης ράβδου και τα τρυβλία επωάζονται σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο για την ανάπτυξη των μεμονωμένων αποικιών.

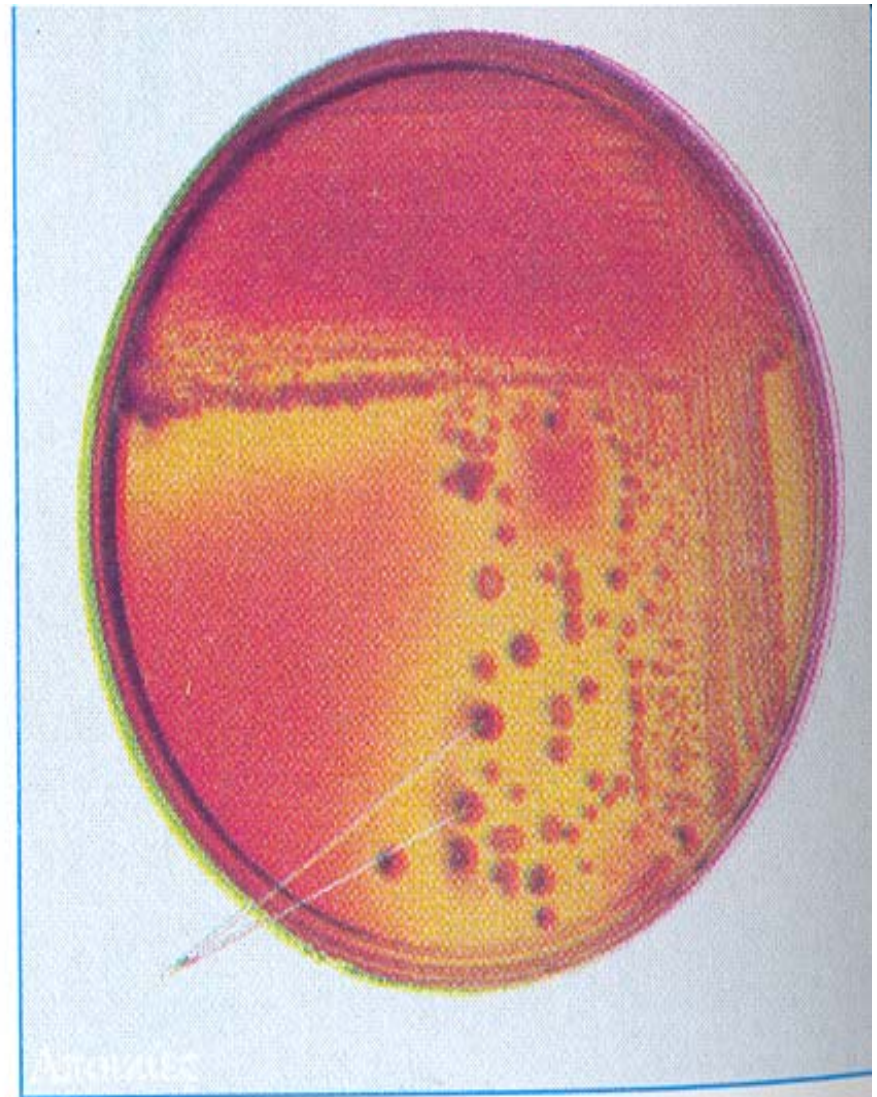
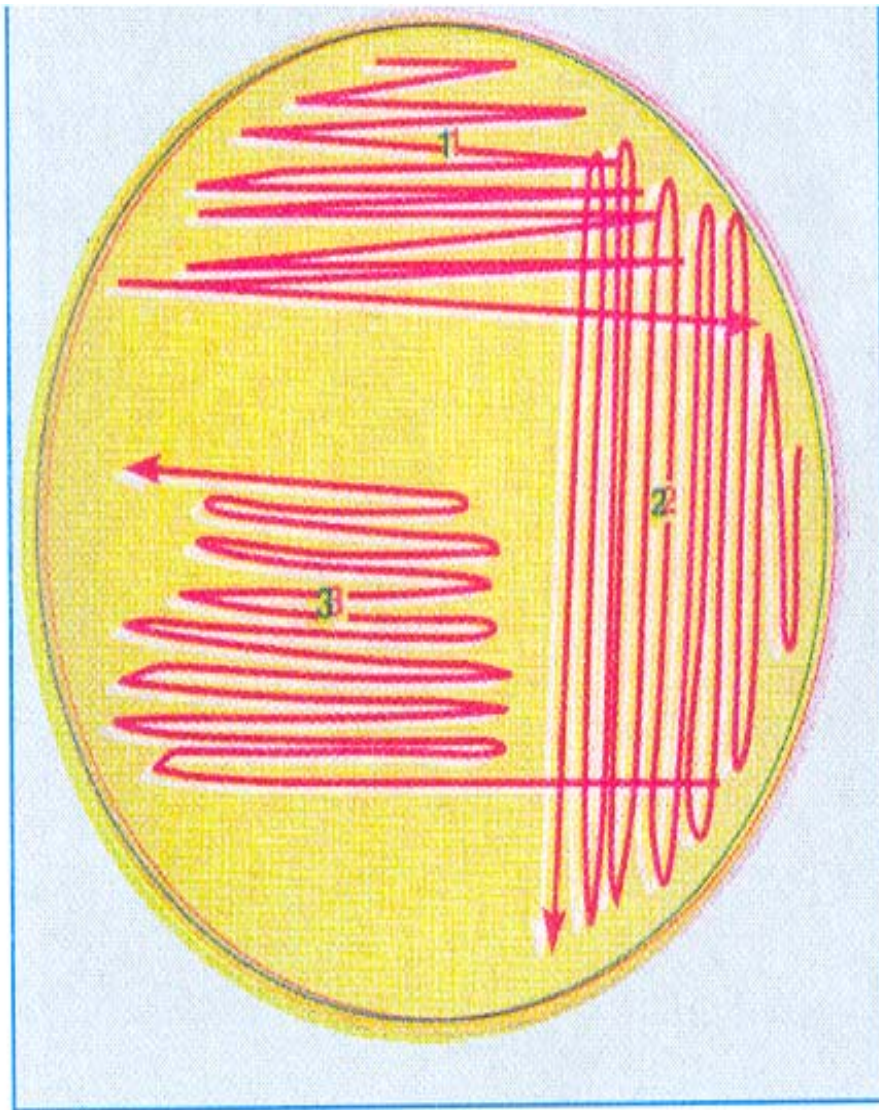
4 Αραιώση του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο

Η τεχνική της αραιώσης του δείγματος των μικροοργανισμών με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο εφαρμόζεται συνήθως μετά τη μεθοδο των διαδοχικών αραιώσεων που υφίσταται το δείγμα. Μικρός γνωστός όγκος αραιωμένου δείγματος εμβολιάζεται σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο και στη συνέχεια υγρό θρεπτικό άγαρ θερμοκρασίας περίπου 45° C αναμιγνύεται με το εμβόλιο εντός του τρυβλίου. Στη συνέχεια γίνεται ανακίνηση και ανάμιξη εντός του τριβλί-

ου δια περιστροφής αυτού (δεξιά, αριστερά, κάθετα και οριζόντια). Εναλλαγή του σταδίου είναι η ανάμιξη του εμβολίου εντός της κωνικής φιάλης η οποία περιέχει το υγρό θρεπτικό άγαρ στους 45° C, το οποίο στη συνέχεια διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα τρυβλία.. Τα περισσότερα βακτήρια και οι περισσότεροι μύκητες επιβιώνουν σ' αυτή τη σύντομη έκθεσή τους στο άγαρ των 45° C. Μετά τη στερεοποίηση του άγαρ κάθε κύτταρο αναπτύσσεται στη θέση που θα βρεθεί μια αξενική αποικία. Ο ολικός αριθμός των αποικιών ισούται με τον αριθμό των βιώσιμων μικροοργανισμών στο αρχικό αραιωμένο δείγμα. Οι αποικίες που αυξάνονται στην επιφάνεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε νέα θρεπτικά υποστρώματα για προετοιμασία νέων καθαρών μικροβιακών καλλιιεργειών. Η μέθοδος γίνεται ακόμα πιο εύχρηστη για την παραγωγή αξενικών καλλιιεργειών όταν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με εκλεκτικά ή διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα.



Εικόνα 5.2 Μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων. Κατά τις διαδοχικές αραιώσεις το αρχικό εμβόλιο αραιώνεται σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων. Στο παράδειγμα που φαίνεται στην εικόνα, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ύστερα από μια επιτυχή αραιώση θα περιέχεται μόνο το ένα δέκατο των μικροβιακών κυττάρων σε σχέση με τον αμέσως προηγούμενο σωλήνα. Κατόπιν δείγματα από κάθε αραιώση εμβολιάζονται σε τρυβλία Petri όπου σχηματίζονται αποικίες και είναι δυνατή η καταμέτρηση. Αυτή η καταμέτρηση χρησιμοποιείται αργότερα για τον υπολογισμό των βακτηρίων στο αρχικό δείγμα.



Εικόνα 5.4 Μέθοδος παραλλήλων γραμμών. Κατά τον εμβολιασμό με κρίκο εμβολιασμού χρησιμοποιείται όλη η επιφάνεια του τρυβλίου και το αποτέλεσμα είναι η αραιώση και ο διαχωρισμός των κυττάρων μεταξύ τους, τα οποία θα δώσουν το καθένα μια αξενική καλλιέργεια.

Μορφολογία και αύξηση αποικιών

Η ανάπτυξη των αποικιών πάνω σε στερεοποιημένο θρεπτικό άγαρ βοηθά τους μικροβιολόγους για τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών διότι η μορφή των αποικιών είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος.

Την ταχύτερη αύξηση τη συναντάμε στην περιφέρεια μιας αποικίας λόγω περίσσειας οξυγόνου και θρεπτικών υλικών. Στο κέντρο τα κύτταρα μεγαλώνουν πιο αργά και συγχρόνως παρατηρείται το φαινόμενο της αυτόλυσης των κυττάρων εξαιτίας της μεγάλης πυκνότητας, της δύσκολης διάχυσης θρεπτικών και της δημιουργίας τοξικών προϊόντων μεταβολισμού.

Εκτίμηση του Μικροβιακού Πληθυσμού

Ο μικροβιακός πληθυσμός προσδιορίζεται ακολουθώντας τις αλλαγές του αριθμού των κυττάρων ή της συγκέντρωσης της βιομάζας η οποία εκφράζεται με την οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος της καλλιέργειας των μικροοργανισμών ή του ξηρού βάρους της βιομά-

ζας ανά ml καλλιέργειας.

1. Ολικός αριθμός κυττάρων (άμεση μικροσκοπική καταμέτρηση)

Ο προσδιορισμός του ολικού αριθμού των κυττάρων σ' ένα μικροβιακό πληθυσμό είναι δυνατόν να προσδιοριστεί καταμετρώντας τα κύτταρα κάτω από το φωτονικό μικροσκόπιο. Ο προσδιορισμός αυτός μπορεί να γίνει ή σε στερεωμένο παρασκεύασμα ή σε υγρό δείγμα καλλιέργειας. Για την δεύτερη περίπτωση υπάρχουν ειδικές αντικειμενοφόροι πλάκες τύπου Neubauer. Τέτοιες αντικειμενοφόροι είναι χαραγμένες και σχηματίζουν μικρά τετράγωνα γνωστού όγκου. Είναι δυνατή η εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων κάτω από το μικροσκόπιο ανά μονάδα όγκου του κάθε τετραγώνου του οπτικού πεδίου που καταμετράται και η αναγωγή της ανά ml εναιωρήματος αρχικής καλλιέργειας. Η μέθοδος δίνει ένα άμεσο προσδιο-

ρισμό του αριθμού των μικροβιακών κυττάρων, εντούτοις έχει τα εξής μειονεκτήματα: 1) δεν γίνεται διαχωρισμός νεκρών και βιωσίμων κυττάρων, 2) τα μικρού μεγέθους κύτταρα δεν είναι ευδιάκριτα κάτω από το μικροσκόπιο και αρκετά κύτταρα είναι δυνατόν να μην καταμετρηθούν, 3) απαιτείται μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων όταν το δείγμα δεν είναι μόνιμο 4) τα κύτταρα που κινούνται είναι δύσκολο να καταμετρηθούν μ' αυτή τη μέθοδο και τέλος 5) απαιτείται συνήθως υψηλή συγκέντρωση κυττάρων.

Ο ολικός αριθμός των κυττάρων μιας καλλιέργειας είναι δυνατόν να καταμετρηθεί και από ηλεκτρονικούς καταμετρητές. Το εναιώρημα της καλλιέργειας διέρχεται με πίεση διαμέσου μικρής οπής.

Ηλεκτρικό ρεύμα διέρχεται κατά μήκος της οπής και ηλεκτρόδια που βρίσκονται τοποθετημένα στις δύο πλευρές μετρούν την ηλεκτρική αντίσταση.

2 Εκτίμηση του αριθμού βιώσιμων κυττάρων

Καθορίζεται ως εκείνος ο αριθμός των κυττάρων τα οποία είναι ικανά να διπλασιαστούν και να δώσουν νέα θυγατρικά κύτταρα.

Ως εκ τούτου ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων λέγεται απλά **κατά-μέτρηση των αποικιών επί τρυβλίου ή καταμέτρηση αποικιών.**

Δύο είναι οι μέθοδοι που επιτρέπουν την καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων : α) η διασπορά των μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri και β) η αραίωση του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο Petri. Και στις δύο περιπτώσεις το δείγμα προέρχεται από εναιώρημα μικροοργανισμών το οποίο έχει υποστεί τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων και είναι γνωστού όγκου, συνήθως από 0,1 έως 1 ml. Για να είναι δυνατή η καταμέτρηση των παραγόμενων αποικιών των οποίων ο αριθμός δεν πρέπει να είναι μεγάλος ώστε να αποφεύγονται τα στατιστικά σφάλματα (η συνήθης πρακτική για αξιόπιστα αποτελέσματα είναι η καταμέτρηση 30 αποικιών σε κάθε τρυβλίο). Πολλές φο-

ρές ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων εκφράζεται ως βιώσιμες μονάδες που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν αποικίες (Colony Forming Units = C.F.U.).

3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας

Σε πάρα πολλές μελέτες συνηθίζεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας αντί του αριθμού των κυττάρων. **Η βιομάζα μπορεί να μετρηθεί με δύο τρόπους: 1) ως ξηρή βιομάζα και 2) να γίνει εκτίμηση της πυκνότητάς της θολομετρικά.** Στην πρώτη περίπτωση η καθαρή μάζα των μικροοργανισμών συλλέγεται με φυγοκέντρωση ή διήθηση, ξηραίνεται στους 100-105° C για 12 έως 18 ώρες για τα βακτήρια ή για 24 ώρες για τα μυκήλια των μυκήτων και εκφράζεται ως mg ξηρής βιομάζας ανά ml αρχικής καλλιέργειας.

Στη δεύτερη περίπτωση γίνεται μέτρηση της πυκνότητας του εναιωρήματος της καλλιέργειας σε ένα σπεκτροφωτόμετρο και η βιομάζα εκφράζεται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (Optical Density= OD).

Στους μονοκύτταρους οργανισμούς η απορρόφηση είναι ανάλογη

του αριθμού των κυττάρων. Συνήθως κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη της σχέσης της οπτικής πυκνότητας και του αριθμού κυττάρων του μικροοργανισμού στον ίδιο χρόνο ανάπτυξης.

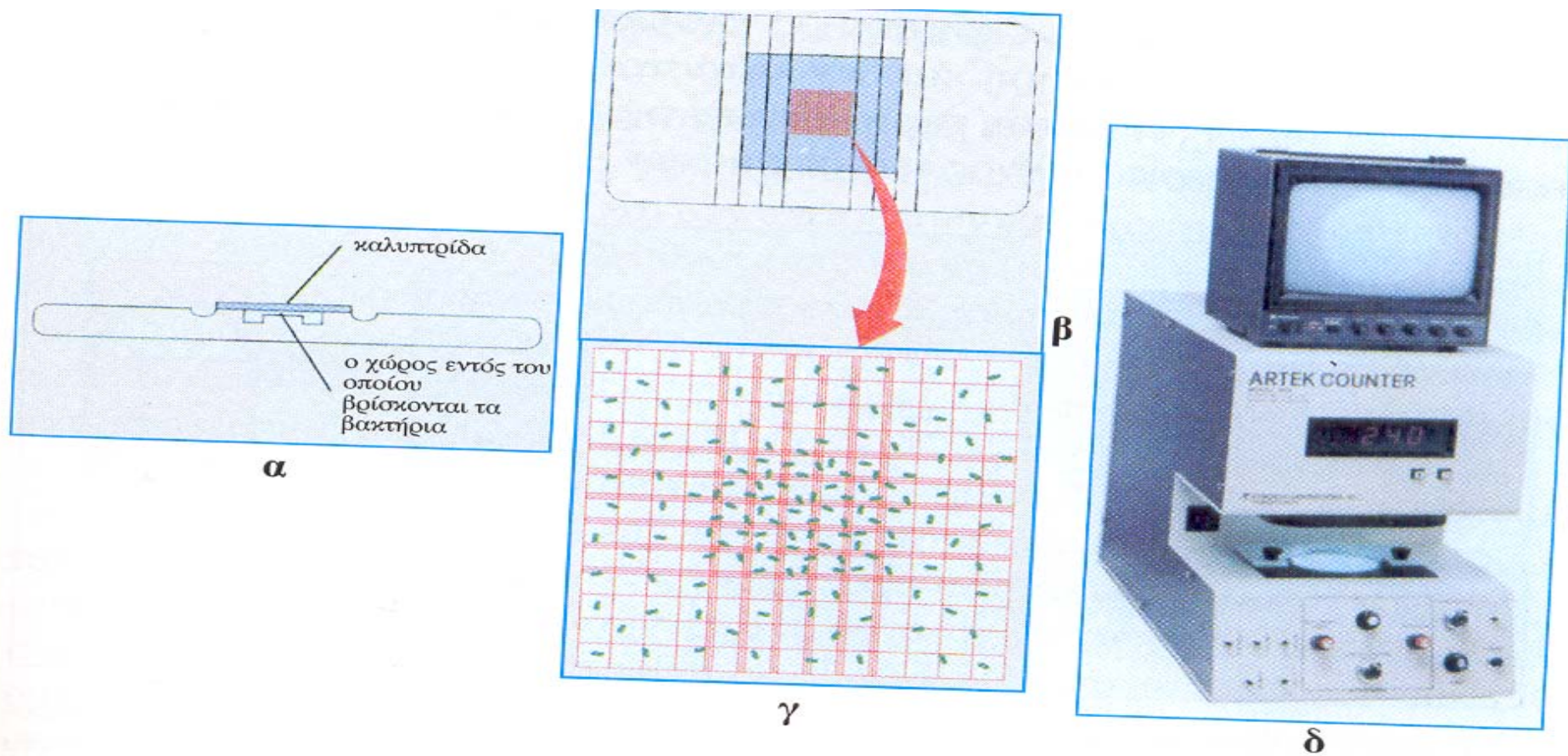
4 Μέθοδος ηθμομεμβράνης (διήθηση)

Ποσοτική εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού με τη μέθοδο της διήθησης, χρησιμοποιώντας ηθμομεμβράνες οι οποίες έχουν πολύ μικρούς πόρους και δεν επιτρέπουν στα βακτηριακά κύτταρα να διέλθουν διαμέσου αυτών. Οι ηθμοί τοποθετούνται στην επιφάνεια στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων και επωάζονται μέχρις ότου το κάθε κύτταρο του εμβολίου να σχηματίσει μια ευδιάκριτη αποικία. Η καταμέτρηση των αποικιών συνεπάγεται από τον αριθμό των μικροοργανισμών που εμπεριέχονται στο αρχικό δείγμα. Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για την επιλογή συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Η μέθοδος εφαρμόζεται συνήθως

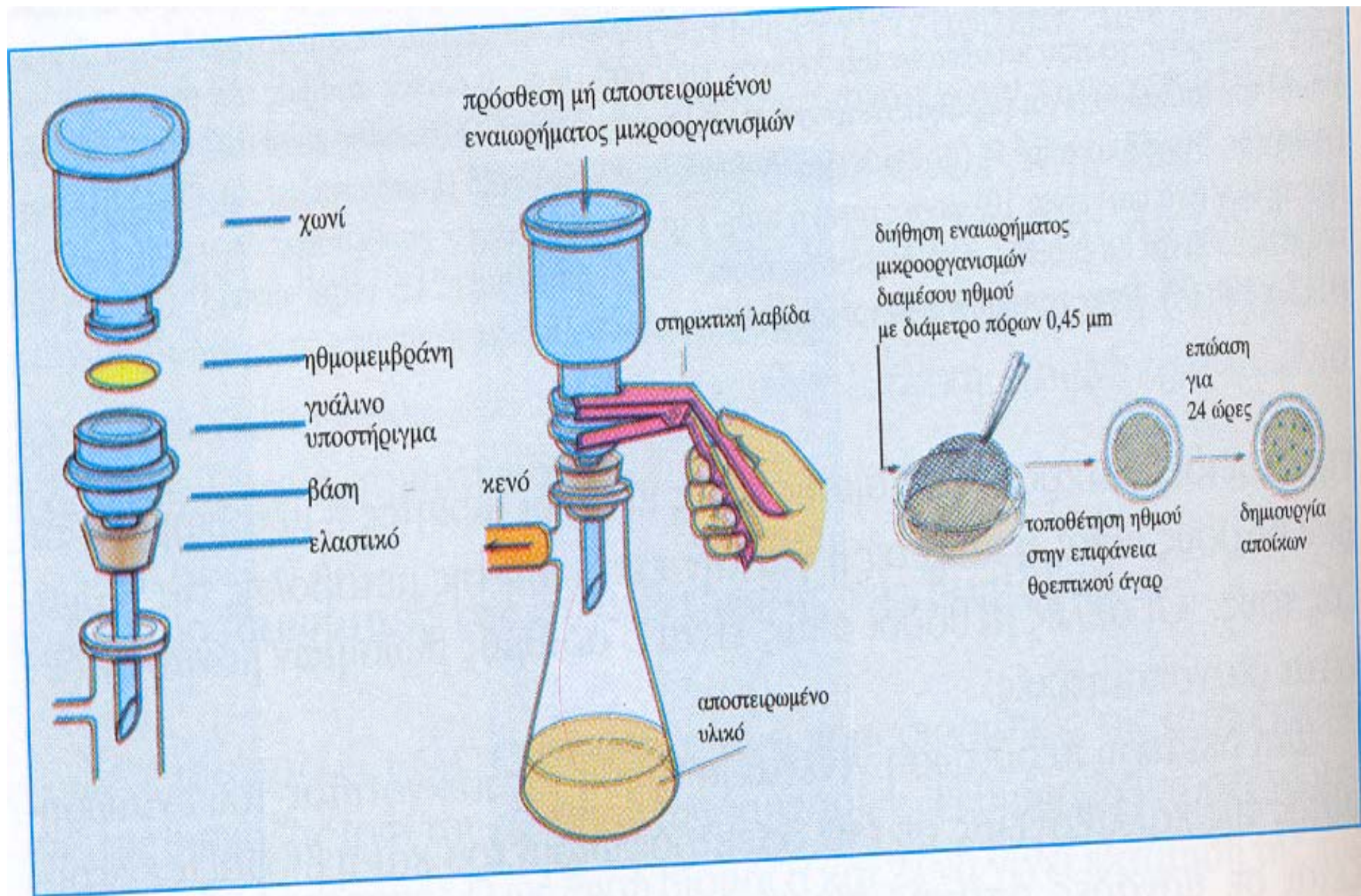
για δείγματα που προέρχονται από το υδάτινο οικοσύστημα.

Η μεθοδος της ηθμομεμβράνης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για άμεση καταμέτρηση των βακτηρίων ως εξής:

Το δείγμα κατ' αρχήν διηθείται διαμέσου της ηθμομεμβράνης και στη συνέχεια χρωματίζεται με μαύρη χρωστική για την απόκτηση ενός καλού φόντου. Στη συνέχεια τα βακτήρια βάφονται με μια φθορίζουσα ουσία, όπως είναι το πορτοκαλί της ακριδίνης και γίνεται μικροσκοπική καταμέτρηση.



Εικόνα 5.9 (α) Η αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer. Η πλάκα όπως φαίνεται από το πλάι. Φαίνεται η καλυπτρίδα και το κενό κάτω από αυτή όπου περιέχεται το βακτηριακό εναιώρημα. (β) Ο θάλαμος όπως φαίνεται από πάνω. Η περιοχή μέτρησης διακρίνεται στο κέντρο. (γ) Μια μεγέθυνση της περιοχής μέτρησης των κυττάρων. Τα βακτήρια μετρώνται σε διαφορετικά τετράγωνα του κέντρου συνήθως υπό μεγέθυνση 400x έως 500x. Ο μέσος όρος του αριθμού των βακτηρίων σ' αυτά τα τετράγωνα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων στο αρχικό δείγμα. Υπάρχουν 25 τετράγωνα που καλύπτουν μια περιοχή εμβαδού 1mm^2 , ο ολικός αριθμός των βακτηρίων στο 1mm^2 του θαλάμου είναι (αριθμός/τετράγωνο) \times (25 τετράγωνα). Ο θάλαμος είναι $0,02\text{mm}$ βαθύς και επομένως: $\text{βακτήρια}/\text{mm}^3 = (\text{αριθμός βακτηρίων}/\text{τετράγωνο}) \times (25 \text{ τετράγωνα}) \times (50)$. Ο αριθμός των βακτηρίων ανά cm^3 είναι 10^3 φορές αυτή η τιμή. Για παράδειγμα, αν υποθέσουμε ότι η μέση τιμή ανά τετράγωνο είναι 28 βακτήρια τότε: $\text{βακτήρια}/\text{cm}^3 = (28 \text{ βακτήρια}) \times (25 \text{ τετράγωνα}) \times (50) \times (10^3) = 3,5 \times 10^7$. (δ) Ένας αυτόματος καταμετρητής κυττάρων: Coulter Counter.



Εικόνα 5.11 Μέθοδος της ηθμομεμβράνης

Επίδραση Φυσικοχημικών Παραγόντων στη Μικροβιακή Αύξηση

Οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να αντεπεξέρχονται σε ορισμένες δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος με απλή επιβίωση, χωρίς αύξηση ή αναπαραγωγή.

Η θερμοκρασία, το pH, η διαθεσιμότητα νερού και το οξυγόνο, θεωρούνται οι σοβαρότεροι περιοριστικοί παράγοντες της αύξησης των μικροοργανισμών.

Η Επίδραση της Θερμοκρασίας στη Μικροβιακή Αύξηση

Αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν συνέπεια την αύξηση του μικροοργανισμού η οποία συνεπάγεται προώθηση των χημικών και ενζυμικών αντιδράσεων του κυττάρου με ταχύτερο ρυθμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συνολική προώθηση της αύξησης του μικροοργανισμού. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται για κάποιες τιμές

θερμοκρασίας, μέχρι του ορίου εκείνου πάνω από το οποίο οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και άλλα κυτταρικά συστατικά καταστρέφονται ανεπανόρθωτα. Το θερμοκρασιακό εύρος των μικροοργανισμών έχει τρεις βασικές τιμές: την **ελάχιστη**, την **άριστη** και τη **μέγιστη** θερμοκρασία. Σε θερμοκρασίες πάνω από τη μέγιστη τιμή επηρεάζεται η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών, ενώ σε τιμές κάτω του ελάχιστου ορίου «παγώνει» η κυτοπλασματική μεμβράνη, η οποία δεν λειτουργεί, άρα δεν γίνεται μεταφορά θρεπτικών οπότε η αύξηση σταματά.

Η πλειονότητα των μικροοργανισμών αυξάνεται με άριστη θερμοκρασία τους 30° C. Κάποιοι όμως μικροοργανισμοί έχουν άριστη θερμοκρασία μεταξύ 5-10° C, ενώ άλλοι πάνω από 100° C όπως το *Pyrodictium occultum*, που ανήκει στην ομάδα των Αρχαίων με άριστο τους 110° C. Οι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να διαιρεθούν σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με το θερμοκρασιακό τους άριστο αρχίζοντας από τις υψηλότερες προς τις χαμηλότερες

θερμοκρασίες:

α) **Υπερθερμόφιλοι ή Άκρως θερμόφιλοι μικροοργανισμοί:** εκείνοι που έχουν άριστη θερμοκρασία από 80°C και άνω.

β) **Θερμόφιλοι:** εκείνοι των οποίων το άριστο είναι μεταξύ 65 και 75°C .

γ) **Μεσόφιλοι:** εκείνοι των οποίων το θερμοκρασιακό άριστο είναι από 35°C έως 40°C .

δ) **Ψυχότροφοι ή Ψυχροανθεκτικοί:** έχουν άριστη θερμοκρασία γύρω στους 20 με 30°C .

ε) **Ψυχρόφιλοι:** εκείνοι οι οποίοι έχουν άριστη θερμοκρασία από 10 έως 20°C . Η διακύμανση της θερμοκρασίας στα φυσικά περιβάλλοντα είναι τεράστια: υπάρχουν εδάφη εκτεθειμένα στο φως του ηλίου των οποίων η θερμοκρασία στην επιφάνεια φθάνει τους 50°C κατά την διάρκεια της ημέρας. Υλικά τα οποία υφίστανται μικροβιακή ζύμωση, ή υλικά σε διαδικασία κομποστοποίησης

έχουν θερμοκρασίες μεταξύ 60-65° C. Στην κατηγορία των ακραίων θερμόφιλων ή υπερθερμόφιλων ανήκουν μικροοργανισμοί των θερμών πηγών, μικροοργανισμοί που ζουν στα θερμά οικοσυστήματα των ηφαιστειών.

Η θερμοκρασία των θερμών πηγών κυμαίνεται από 90-100° C.

Συνήθως οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται από περιβάλλοντα τέτοιου τύπου είναι προκαρυωτικής δομής και οι πλέον θερμόφιλοι ανήκουν στην ομάδα των Αρχαίων.

Οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί έχουν ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν άριστα σε υψηλές θερμοκρασίες.

Οι μεμβράνες των θερμόφιλων και άκρως θερμόφιλων οργανισμών, περιέχουν κορεσμένα λιπαρά οξέα, που τους επιτρέπουν να έχουν υψηλότερο σημείο τήξης και άρα να παραμένουν άθικτες στις υψηλότερες θερμοκρασίες.

Το DNA των Αρχαίων επίσης είναι προσδεμένο με πρωτεϊνικές αλυσίδες οι οποίες το προστατεύουν από την τήξη λόγω υψηλής θερμοκρασίας.

Στην Αρκτική και Ανταρκτική συνήθως υπάρχουν περιοχές παγωμένες καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, οι οποίες όμως αποτελούν μικροενδιαιτήματα κάποιων ψυχρόφιλων μικροοργανισμών.

Η υψηλότερη θερμοκρασία αύξησης γι' αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι εκείνη των 15° C.

Υπάρχει μια κατηγορία μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν άριστη θερμοκρασία μεταξύ 20° C και 30° C, αλλά αυξάνονται κανονικά και στη θερμοκρασία των 0° C. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ονομάζονται ψυχρότροφοι ή ψυχροανθεκτικοί και είναι περισσότερο διαδεδομένοι, σε φυσικά περιβάλλοντα, από τους ψυχρόφιλους

Απομονώνονται συνήθως από δείγματα εδάφους, ύδατος, τρόφιμα (π.χ. κρέας, γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, φρούτα και λαχανικά που συντηρούνται στο ψυγείο). Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί έχουν ένζυμα τα οποία λειτουργούν καλύτερα στις χαμηλές θερμοκρασίες. Η κυτοπλασματική μεμβράνη τους έχει την ικανότητα της ενεργού μεταφοράς των ουσιών ακόμα και σ' αυτές τις χαμηλές θερμοκρασίες.

Περιέχει υψηλό ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία επιτρέπουν στη μεμβράνη να διατηρεί τη ρευστότητά της στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Στα βακτήρια που έχουν απομονωθεί από την Ανταρκτική, έχει βρεθεί ότι τα λιπίδια της κυτοπλασματικής μεμβράνης περιέχουν ένα υδρογονάνθρακα (C_{31:9}) με εννέα διπλούς δεσμούς .

Κατηγορίες μικροοργανισμών ανάλογα με το εύρος του pH.

Ελάχιστοι μικροοργανισμοί αυξάνονται σε pH κάτω από 2 και πάνω από 10. Οι μικροοργανισμοί βάσει του εύρους των τιμών pH εντός του οποίου αναπτύσσονται διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες:

α) Ως **οξεόφιλοι** ορίζονται εκείνοι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται μεταξύ τιμών pH από **0 έως 5,5**.

β) Ως **ουδετερόφιλοι** ορίζονται εκείνοι οι μικροοργανισμοί που προτιμούν το εύρος του pH από **5,5 έως 8,0**

γ) Ως **βασεόφιλοι** ορίζονται εκείνοι οι μικροοργανισμοί που προτιμούν το εύρος του pH από **8,5 έως και 11,5**.

δ) **Άκρως βασεόφιλοι** θεωρούνται οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε pH **10 και άνω**.

Υπάρχουν τρεις βασικές τιμές του pH που αφορούν στη μικροβιακή αύξηση κάθε μικροοργανισμού: η ελάχιστη, η άριστη και η μέγιστη.

Οι τιμές του pH αφορούν πάντα το περιβάλλον αύξησης και όχι το pH που επικρατεί στο εσωτερικό του κυττάρου, το οποίο πρέπει να παραμένει ουδέτερο για την προστασία των μακρομορίων.

Στα άκρως οξεόφιλα ή άκρως βασεόφιλα το pH στο εσωτερικό του κυττάρου πιθανά να έχει μια απόκλιση της τάξης των 1-1,5 βαθμών από την ουδέτερη τιμή.

Οι μικροοργανισμοί συχνά βρίσκουν τρόπους να προσαρμοστούν στις αλλαγές του περιβάλλοντός τους, με σκοπό την επιβίωση. Πολλοί μικροοργανισμοί αλλάζουν οι ίδιοι το pH του περιβάλλοντος μέσου παράγοντας προϊόντα έκκρισης. Αρχαία όπως το *Sulfolobus* και *thermoplasma* οξειδώνουν θειώδη ορυκτά και παράγουν θειϊκό οξύ. Έχει παρατηρηθεί ότι σε υψηλό pH η κυτοπλασματική μεμβράνη αυτών των μικροοργανισμών διαλύεται και τα κύτταρα καταστρέφονται, γι' αυτό το λόγο η κυτοπλασματι-

κή μεμβράνη απαιτεί μεγάλες συγκεντρώσεις ιόντων υδρογόνου για τη σταθερότητά της.

Οι βασεόφιλοι μικροοργανισμοί απαντώνται σε αλκαλικές λίμνες ή αλκαλικά εδάφη. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν αερόβια, μη θαλάσσια βακτήρια και αρκετά είδη του γένους *Bacillus*.

Υδατοπεριεκτικότητα Περιβάλλοντος

Στο περιβάλλον αύξησης ενός μικροοργανισμού, αυτό που έχει σημασία είναι η **διαθεσιμότητα του νερού: δηλαδή πόση ποσότητα νερού του περιβάλλοντος μέσου του κυττάρου είναι διαθέσιμη για το κύτταρο**. Οι μικροοργανισμοί δεν είναι ικανοί να μεταφέρουν τα μόρια του νερού μόνοι τους, ούτε έχουν κάποιο μηχανισμό άντλησης του νερού από το θρεπτικό τους υπόστρωμα: η μετακίνηση νερού είναι μια φυσική διαδικασία. Ένα κύτταρο αποκτά νερό όταν αυξήσει την εσωτερική συγκέντρωση του κυτοπλάσματος είτε

αντλώντας ιόντα εντός του κυττάρου από το περιβάλλον, ή συνθέτοντας ή συσσωρεύοντας μια οργανική υδατοδιαλυτή ουσία.

Το νερό μετακινείται προς περιοχές με υψηλές συγκεντρώσεις .

Στο εσωτερικό του κυττάρου υπάρχει πάντα υψηλότερη συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών από ότι στο εξωτερικό περιβάλλον και γι' αυτό το λόγο το νερό πάντα τείνει να εισέλθει στο κύτταρο. Στις περιπτώσεις εκείνες όπου το περιβάλλον μέσο έχει χαμηλή σχετική υδατοπεριεκτικότητα, το νερό του κυττάρου μετακινείται προς το εξωτερικό περιβάλλον, άρα το κύτταρο χάνει το νερό συρρικνώνεται και υφίσταται πλασμόλυση.

Οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν δύσκολα ή καθόλου σε συνθήκες χαμηλής υδατοπεριεκτικότητας και γι' αυτό πολλές φορές αφυδατώνονται και δημιουργούν ανθεκτικές μορφές όπως είναι τα σπόρια.

ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Ανοκαλλιέργεια

Πολλά βακτήρια, όπως οι σταφυλόκοκκοι και τα εντεροβακτήρια μπορούν να επιβιώσουν στο ίδιο θρεπτικό μέσο για πολλά χρόνια ενώ για πιο ευαίσθητα είδη, όπως του γένους *Neisseria*, χρειάζεται να γίνονται ανοκαλλιέργειες κάθε λίγες βδομάδες. Ο χρόνος επιβίωσης μεταξύ δυο διαδοχικών ανοκαλλιεργειών γίνεται μεγαλύτερος όσο περισσότερο ελαττώνεται ο ρυθμός μεταβολισμού του μικροοργανισμού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί π.χ. με περιορισμό της ποσότητας του αέρα στο περιβάλλον αεροβίων μικροοργανισμών ή με επώαση σε χαμηλότερη από την κανονική θερμοκρασία. Ο περιορισμός του αέρα πολλές φορές επιτυγχάνεται με κάλυψη της καλλιέργειας με υγρή παραφίνη. Για την ελαχιστοποίηση του μεταβολικού ρυθμού των μικροοργανισμών χρησιμοποιείται η θερμοκρασία των 5° C χωρίς αυτό να αποτελεί τον κανόνα αφού για παράδειγμα είδη του *Neisseria* διατηρούνται καλύτερα στους 37° C.

Αποξήρανση

Η αποξήρανση καλλιέργειας γίνεται με διάφορες μεθόδους που όλες στηρίζονται στην αφυδάτωση. Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται κύρια σε **μύκητες και ζύμες** που φαίνονται να είναι πιο ανθεκτικά στη ξηρασία αλλά και σε ορισμένες ομάδες βακτηρίων όπως είναι τα **σποριογόνα**.

Αποξήρανση σε χαρτί

Διηθητικό χαρτί Whatman No 4 κόβεται σε τεμάχια με επιφάνεια περίπου 1 cm² και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο ενώ είναι τυλιγμένο σε αλουμινόχαρτο. Κάθε τεμάχιο χαρτιού εμποτίζεται με λίγα μl αιωρήματος της καλλιέργειας, ακολουθεί στέγνωμα και διατήρησή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα μέσα σε ένα ξηρό δοχείο, στους 4° C.

Αποξήρανση σε θρεπτικά υλικά

Μικρή ποσότητα πεπτόνης , εμποτίζεται με λίγα μl της καλλιέργειας. Ακολουθεί αποξήρανση και φύλαξη υπό κενό αέρος . Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη διατήρηση ευαίσθητων βακτηρίων όπως

είναι το *Neisseria gonorrhoeae* και το *Vibrio cholerae* τα οποία ως γνωστό δεν μπορούν να επιβιώσουν με κρυο-ξηρανση (freeze-drying).

Κατάψυξη

Κατά τη διάρκεια της ψύξης ή της απόψυξης μπορούν να προκληθούν στα κύτταρα βλάβες εξαιτίας των κρυστάλλων πάγου που σχηματίζονται.

Το πρόβλημα αυτό ελαχιστοποιείται με τη χρησιμοποίηση γλυκερίνης και διμεθυλοσουλφοξειδίου τα οποία έχουν την ιδιότητα να εξασφαλίζουν, κατά τη ψύξη και απόψυξη, την «ακεραιότητα» των κυττάρων. Οι ενώσεις αυτές συμπεριλαμβάνονται στο κανονικό θρεπτικό μέσο των μικροοργανισμών σε συγκεντρώσεις 10-20%.

Η κατάψυξη στους -70°C θεωρείται αρκετά ικανοποιητική για ιούς, βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα. Χαμηλότερες θερμοκρασίες κατάψυξης, όπως η θερμοκρασία των -196°C του υγρού αζώτου, είναι ιδανικές για τη διατήρηση για μεγάλα χρονικά διαστήματα όλων των μικροοργανισμών.

Κατάψυξη-ξήρανση

Με τη μέθοδο κατάψυξης-ξήρανσης (freeze-drying) γίνεται αφυδάτωση του κατεψυγμένου δείγματος με έκθεση του σε συνθήκες κενού. Οι υδρατμοί που σχηματίζονται απομακρύνονται με ψυχόμενο συμπυκνωτή και στη συνέχεια το αποξηραμένο δείγμα των μικροοργανισμών φυλάσσεται σε κενό.

Συσκευές ψύξης-ξήρανσης στις οποίες υπάρχει ενσωματωμένη φυγόκεντρος. Ο αφρός που δημιουργείται από τις φυσαλίδες, εξαιτίας του κενού, συγκρατείται σε χαμηλά επίπεδα με την ταυτόχρονη φυγοκέντρωση του δείγματος κατά τα αρχικά στάδια άντλησης του αέρα.

Η μέθοδος κατάψυξης-ξήρανσης εφαρμόζεται και για μακρόχρονη διατήρηση (έχει διαπιστωθεί καλή επιβίωση και μετά 50 χρόνια) πολλών ομάδων μικροοργανισμών όπως ζύμες, **βακτήρια και αρκετοί ιοί** ενώ δεν θεωρείται κατάλληλη για τη διατήρηση **κυττάρων**.