



## Μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα - Ασηπτικές μέθοδοι εργασίας - Αποστείρωση

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

*Μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα: Κάθε υγρό ή στερεό σώμα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ονομάζεται θρεπτικό υπόστρωμα.*

Τα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να καλύπτουν τις θρεπτικές απαιτήσεις των μικροοργανισμών. Γενικά ένα θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να περιέχει:

- νερό (70%)
- πηγή άνθρακα και ενέργειας (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες κλπ)
- πηγή αλάτων (ανόργανων και οργανικών)
- πηγή αζώτου [ανόργανα αζωτούχα άλατα ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) πρωτεΐνες, κλπ]
- διάφορα ιχνοστοιχεία

### Μερικές κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να διακριθούν σε διάφορες κατηγορίες, όπως:

**Κατηγορία I:** ως προς το αν είναι **Υγρά** ή **Στερεά**. Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα είναι κατ' αρχήν υγρά και στερεοποιούνται με την προσθήκη του πολυσακχαρίτη άγαρ (εκχύλισμα θαλάσσιων φυκών). Το άγαρ τήκεται στους 100 °C περίπου και πήζει στους 40-43 °C. Δεν επηρεάζει, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων, τη μικροβιακή αύξηση και δε χρησιμοποιείται ως τροφή από τους μικροοργανισμούς.

**Κατηγορία II:** ως προς τη χημική σύσταση (γνωστή ή άγνωστη) διακρίνονται σε:

**α) Ορισμένα ή Συνθετικά.** Αυτά τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάζονται στο εργαστήριο ή στη βιομηχανία σύμφωνα με οδηγίες, οι οποίες αναφέρουν πλήρως την ποιοτική και ποσοτική τους σύσταση [Czaprek-Dox Άγαρ (CzA), MacConkey Άγαρ (McA) κλπ]. Δηλαδή είναι εκείνα τα υποστρώματα των οποίων γνωρίζουμε πλήρως τη σύσταση.

β) **Εμπειρικά ή Φυσικά ή Σύνθετα ή Πολύπλοκα.** Είναι τα υποστρώματα εκείνα των οποίων δε γνωρίζουμε πλήρως τη σύσταση. Τα υποστρώματα αυτά, κατά κανόνα, λαμβάνονται από τη φύση (π.χ. εκχυλίσματα φρούτων: μούστος, απόβλητα βιομηχανιών: μελάσα, πούλπα κλπ). Είναι φτηνά και περιέχουν ποικιλία θρεπτικών ενώσεων, άρα είναι εύκολη η αύξηση των μικροοργανισμών.

**Κατηγορία III:** ως προς το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σ' αυτά διακρίνονται

α) **Τυπικά ή Γενικού σκοπού.** Είναι εκείνα τα υποστρώματα στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός διαφορετικών μικροβιακών ειδών (θρεπτικός ζωμός, Czapek-Dox Άγαρ κλπ).

β) **Εκλεκτικά.** Είναι τα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία αυξάνουν ορισμένες ομάδες μικροοργανισμών. Ένα τέτοιο υπόστρωμα είναι το MacConkey Άγαρ, στο οποίο αναπτύσσονται τα εντεροβακτήρια. Σχεδόν κάθε τυπικό υπόστρωμα μπορεί να μετατραπεί σε εκλεκτικό, αρκεί κατά την παρασκευή του να προστεθεί κάποια χημική ουσία (αντιβιοτικό ή άλλος αναστολέας της αύξησης) ή να γίνει αλλαγή της πηγής άνθρακα, αζώτου ή του pH.

γ) **Διαγνωστικά.** Είναι εκείνα στα οποία αυξάνουν ορισμένα είδη μικροοργανισμών, οι οποίοι παράγουν χαρακτηριστικές αποικίες, επιτρέποντας έτσι την εύκολη αναγνώρισή τους. Η *E. coli* π.χ. στο MacConkey Άγαρ παράγει βυσσινί αποικίες, γιατί ζυμώνει την περιεχόμενη στο υπόστρωμα λακτόζη, ενώ η *Salmonella sp.* παράγει άχρωμες αποικίες, καθόσον δε ζυμώνει τη λακτόζη· άρα το MacConkey Άγαρ είναι διαγνωστικό για το βακτήριο *E. coli*.

## Ασηπτικές Μέθοδοι Εργασίας

Για την οποιαδήποτε μικροβιακή μελέτη είναι απαραίτητο να λαμβάνονται μέτρα προστασίας του κάθε ερευνητή, αλλά και προστασίας του μικροοργανισμού που μελετάται, ώστε να αποκλειστεί η επιμόλυνση από άλλους μικροοργανισμούς. Πρέπει ο χώρος εργασίας να καθαρίζεται με απολυμαντικό. Τα εργαστηριακά αντικείμενα (π.χ. δοχεία θρεπτικών υλικών, δοχεία καλλιέργειας, σιφόνια, δοκιμαστικοί σωλήνες κλπ.) να είναι τοποθετημένα προσεκτικά πάνω στον πάγκο εργασίας. Ο λύχνος Bunsen είναι απαραίτητος στο χώρο της μικροβιολογικής εργασίας, γιατί διατηρεί τις συνθήκες ασηψίας με τη δημιουργία στοιχειωδώς αποστειρωμένου χώρου και βοηθά στη γρήγορη αποστείρωση (με τη φλόγα του λύχνου δημιουργείται ξηρή θερμότητα) ορισμένων αντικειμένων π.χ. του κρίκου εμβολιασμού.

**Αποστείρωση:** Αποστείρωση ονομάζουμε την απώλεια της ικανότητας αναπαραγωγής όλων των μικροοργανισμών, οι οποίοι υπάρχουν πάνω σε ένα αντικείμενο ή σε ένα χώρο.

Κατά την αποστείρωση δεν καταστρέφονται υποχρεωτικά όλα τα ένζυμα ή τα προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού (π.χ. τοξίνες). Η διαδικασία θανάτου των μικροοργανισμών εξαρτάται από τη μέθοδο αποστείρωσης. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αποστείρωσης καθορίζεται από **το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού, το είδος των μικροβιακών κυττάρων** (σπόρια, υφές, ενδοσπόρια βακτηρίων κλπ) και **το ρυθμό θανάτου τους.**

## Τρόποι αποστείρωσης

### I. Θερμότητα ξηρή ή υγρή:

α) Με ξηρή θερμότητα (φλόγα λύχνου Bunsen, ανακυκλούμενος θερμός αέρας σε κλίβανο, υπέρυθρη ακτινοβολία, ανάφλεξη). Αποστειρώνονται αντικείμενα, τα οποία αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες και απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας.

- Με φλόγα Bunsen (Εικόνα 1) αποστειρώνονται: κρίκοι, βελόνες εμβολιασμού, στόμια γυάλινων φιαλών ή δοκιμαστικών σωλήνων κ.α.
- Με ανάφλεξη ύστερα από εμβύθιση του αντικειμένου (νυστέρια, σπάτουλες, αντικειμενοφόροι κλπ) σε διάλυμα 70% αιθυλαλκοόλης.
- Με υπέρυθρη ακτινοβολία αποστειρώνονται μικρά αντικείμενα (σύριγγες, λαβίδες, σιφώνια κλπ) στα κέντρα αποστείρωσης νοσοκομειακών μονάδων. Κάθε αντικείμενο θερμαίνεται στους 180 °C επί 15 min. Ο συνολικός χρόνος αποστείρωσης διαρκεί 22,5 min.
- Με ανακυκλούμενο θερμό αέρα σε κλίβανο αποστειρώνονται τρυβλία, δοκιμαστικοί σωλήνες, φιάλες, σιφώνια, μεταλλικά αντικείμενα, σύριγγες, ξηρές σκόνες, ορυκτέλαια τοποθετημένα σε αβαθή δοχεία κ.α. Τα αντικείμενα (στεγνά) πρέπει να τοποθετούνται στον κλίβανο κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να διευκολύνεται η κυκλοφορία του θερμού αέρα ανάμεσά τους. Ο χρόνος ο οποίος απαιτείται, εξαρτάται από τη θερμοκρασία αποστείρωσης. Έτσι σε:

160 °C χρειάζονται 45 min

170 °C χρειάζονται 18 min

180 °C χρειάζονται 7,5 min

β) Με υγρή θερμότητα (βρασμός, ατμός 100 °C, αυτόκαυστο κλπ)

- Με υδρατμό 121 °C υπό πίεση. Η αποστείρωση γίνεται με ειδικές συσκευές, οι οποίες ονομάζονται **αυτόκαυστα** (Εικόνα 2). Η μέθοδος είναι ταχεία και αποτελεσματική. Εφαρμόζεται ευρέως για την αποστείρωση διαφόρων αντικειμένων (γυαλικών, θρεπτικών υποστρωμάτων κλπ) καθώς και για τη νέκρωση ανεπιθύμητων ή παλαιών μικροβιακών καλλιιεργειών. Η αποστείρωση με αυτόκαυστο εξαρτάται από: **το χρόνο, τη θερμοκρασία, την πίεση, την υγρασία και τον εγκλωβισμένο αέρα στο θάλαμο του αυτόκαυστου, καθώς και από την ποσότητα των προς αποστείρωση υλικών**. Πρέπει να σημειωθεί ότι για την αποτελεσματική αποστείρωση επιβάλλεται η αντικατάσταση του αέρα με υδρατμό στο θάλαμο του αυτόκαυστου ώστε να αποφευχθεί η θερμοκρασιακή στρωμάτωση του θαλάμου αποστείρωσης.

### II. Ακτινοβολήση: με ακτίνες γ, χ κλπ.

Η αποτελεσματικότητα των ακτινοβολιών επηρεάζεται, σημαντικά από τη διεισδυτικότητά τους, η οποία εξαρτάται από την ενέργειά τους. Η υπεριώδη ακτινοβολία χρησιμοποιείται για τη μείωση του αριθμού των βακτηρίων του αέρα στα νοσοκομεία, καθώς και για την απολύμανση θαλάμων εμβολιασμού στα μικροβιολογικά εργαστήρια. **Ο τύπος της ακτινοβολίας, ο χρόνος έκθεσης των μικροοργανισμών σ' αυτή, το είδος, ο αριθμός και η φάση του κύκλου ανάπτυξης του μικροβίου καθορίζουν τη**

**θανατογόνο δόση της ακτινοβολίας.** Έτσι, τα μη σποριογόνα βακτήρια παρουσιάζουν την ελάχιστη αντίσταση, ενώ τα ενδοσπόρια των βακτηρίων τη μέγιστη. Ενδιάμεση θέση κατέχουν οι μύκητες. Η θανατογόνο δόση της υπεριώδους ακτινοβολίας κυμαίνεται μεταξύ 1000-6000  $\mu\text{w}/\text{sec}/\text{cm}^2$ .

### III. Διήθηση: με ηθμούς.

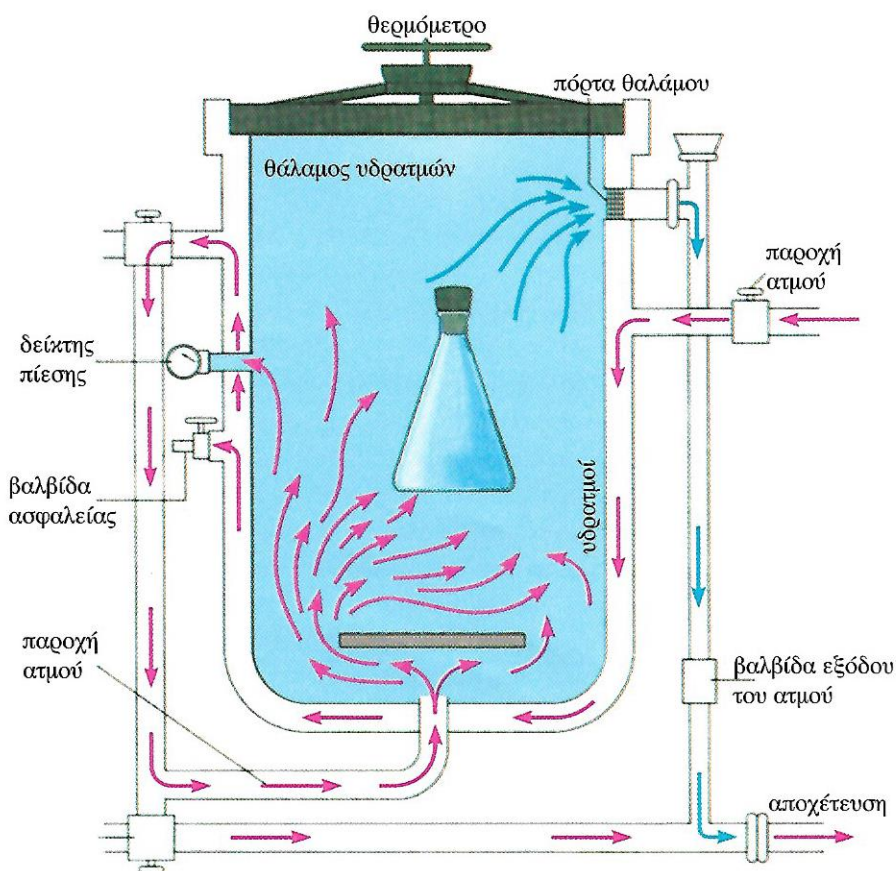
Αποστειρώνονται θερμοευαίσθητα αέρια ή υγρά σώματα, όπως είναι: ο ορός αίματος, διαλύματα αντιβιοτικών, ειδικά θρεπτικά υποστρώματα, σάκχαρα κ.α. Ορισμένοι ολιγο- και πολυσακχαρίτες σε όξινο περιβάλλον υδρολύονται μερικώς κατά την αποστείρωση με αυτόκαυστο. Στη Μικροβιολογία χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι ηθμών, όπως είναι οι δίσκοι ασβέστου, οι μεμβράνες οι οποίες είναι κατασκευασμένες από πλαστικό ή εστέρες (νιτρικοί, οξικοί) κυτταρίνης κλπ. Η διάμετρος των πόρων των ηθμών κυμαίνεται μεταξύ 0,22-0,45  $\mu\text{m}$ . Το πάχος της ηθμομεμβράνης είναι 120  $\mu\text{m}$  περίπου.

### IV. Χημική επεξεργασία: με αλκοόλες, αλδεΐδες, οξέα κ.α.

Η αποστείρωση γίνεται με πτητικές χημικές ουσίες τοξικές για τους μικροοργανισμούς. Τέτοιες ουσίες είναι το αιθυλενοξειδίο ή άλλες ετεροκυκλικές ενώσεις, η φορμαλδεΐδη και οι οξόνες. Το αιθυλενοξειδίο, το οποίο είναι πολύ τοξικό για τους ιούς, τα βακτήρια, τα ενδοσπόρια τους και τους μύκητες και η φορμαλδεΐδη, η οποία αποτελεί ισχυρό ιστατικό, βακτηριοστατικό και σποριοκτόνο μέσο, αν και παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα, εντούτοις είναι οι πιο χρησιμοποιούμενες χημικές ενώσεις. Η χρησιμοποίηση της φορμαλδεΐδης περιορίζεται εξαιτίας ορισμένων μειονεκτημάτων της όπως είναι η δριμεία και πνιγηρή οσμή, η έλλειψη διάχυσης και διαπερατότητας και η τάση της να πολυμερίζεται και να σχηματίζει λευκά στρώματα στην επιφάνεια των αντικειμένων.



Εικόνα 1. Λύχνος Bunsen



Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση συσκευής αυτόκαυστου

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

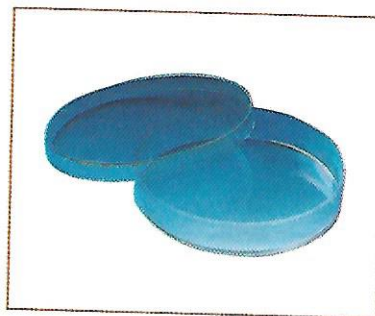
Αντικείμενα	Θρεπτικά Υποστρώματα	Όργανα
Κωνική φιάλη (Εικ. 3) Δοκιμαστικός σωλήνας (Εικ. 3) Ογκομετρικός κύλινδρος 100 ml Σιφόνιο (1ml, 10 ml) Κρίκος εμβολιασμού Τρυβλίο Petri (Εικ. 3)	MacConkey Broth + Άγαρ	Ζυγός Αυτόκαυστο

### Διαδικασία Εκτέλεσης της Άσκησης

- 1) Λύχνος Bunsen: ασηπτική μέθοδος χρήσης σιφωνίου, τρυβλίου, κωνικής φιάλης, κρίκου εμβολιασμού.
- 2) Παρασκευή 50 ml θρεπτικού υποστρώματος MacConkey Άγαρ: η συνταγή απαιτεί 30 g ανά λίτρο MacConkey Broth και άγαρ 15 g ανά λίτρο. (Να γίνει ο σωστός υπολογισμός για τα 50 ml).
- 3) Αποστείρωση θρεπτικού υποστρώματος σε αυτόκαυστο.
- 4) Ασηπτική μεταφορά θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο Petri (δοχείο καλλιέργειας) και δοκιμαστικό σωλήνα (δοχείο καλλιέργειας) υπό κλίση: α) κατ' ευθείαν από την κωνική φιάλη, β) με σιφόνιο των 10 ml (Εικόνα 4).



Κωνικές φιάλες

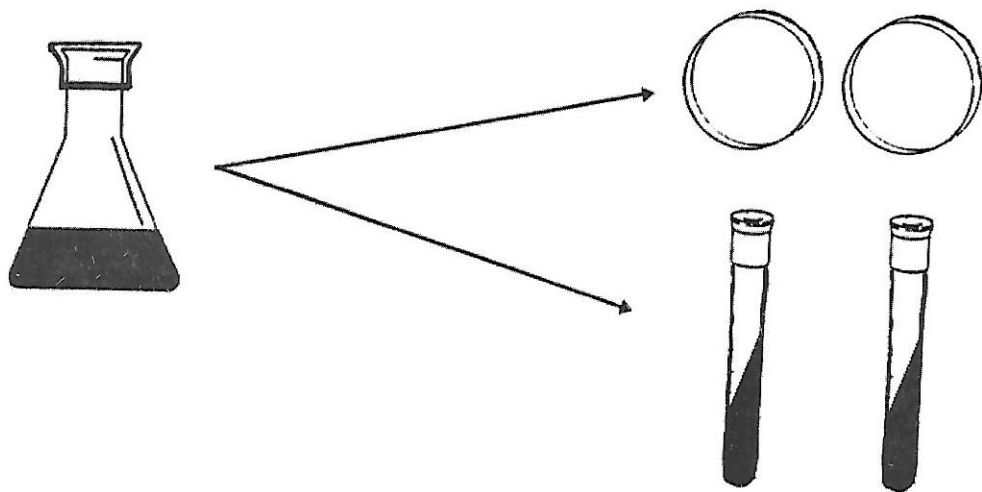


Τρυβλίο Petri



Σωλήνας τύπου Universal

Εικόνα 3. Διαφορετικοί τύποι δοχείων καλλιέργειας



Εικόνα 4. Σχηματική Παράσταση της διαδικασίας μεταφοράς του θρεπτικού υποστρώματος στα δοχεία καλλιέργειας

## Ερωτήσεις

1. Τι περιέχει ένα βασικό θρεπτικό υπόστρωμα; Πώς ορίζονται τα τυπικά, εκλεκτικά και διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα;
2. Ποιά η χρησιμότητα των ασηπτικών συνθηκών και πότε εφαρμόζονται;
3. Αναφέρατε όλα τα είδη αποστείρωσης επιγραμματικά.
4. Πότε και πως ένα τυπικό ή γενικού σκοπού υπόστρωμα μετατρέπεται σε εκλεκτικό;