

## Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στη μικροβιακή αύξηση

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η αύξηση των μικροοργανισμών επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες καλλιέργειας οι οποίες διακρίνονται σε:

- φυσικές (θερμοκρασία, ακτινοβολία, οσμωτική πίεση κλπ)
- χημικές (σύσταση του θρεπτικού μέσου, pH) και
- βιολογικές (συνύπαρξη, ανταγωνισμός κλπ)

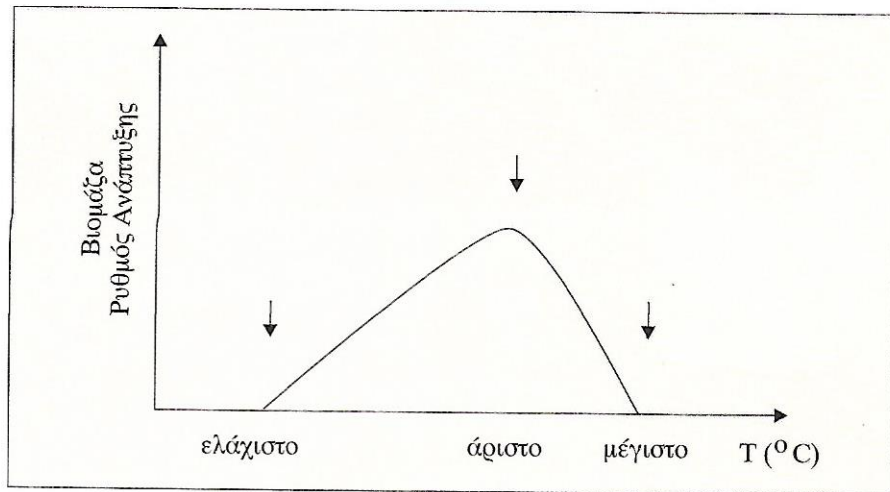
Η κατανόηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην αύξηση των μικροοργανισμών βοηθά στην εξήγηση της κατανομής τους στη φύση και στη δημιουργία μεθόδων απαραίτητων για τον έλεγχο των μικροβιακών δραστηριοτήτων. Επίσης βοηθά στην καταπολέμηση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και στην προώθηση των επωφελών.

#### Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία θεωρείται ο σημαντικότερος παράγοντας περιβάλλοντος γιατί επηρεάζει την επιβίωση και την αύξηση του μικροοργανισμού, το ρυθμό ανάπτυξής τους αλλά και το ρυθμό νέκρωσής τους.

Αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως συνέπεια την αύξηση του μικροοργανισμού μέχρι κάποιου ορίου τιμών θερμοκρασίας, πέραν του οποίου οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τα άλλα κυτταρικά συστατικά καταστρέφονται ανεπανόρθωτα. Άρα για κάθε μικροοργανισμό υπάρχουν συγκεκριμένα θερμοκρασιακά όρια και κάθε μικροοργανισμός έχει μία ελάχιστη, μία μέγιστη και μία άριστη τιμή θερμοκρασίας.

Η άριστη θερμοκρασία συνήθως είναι πιο κοντά στη μέγιστη τιμή παρά στην ελάχιστη. Βάσει των θερμοκρασιακών ορίων τους οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε:



- Άκρως θερμοφίλους (άνω των 80 °C),
- Θερμοφίλους ( 65-75 °C),
- Μεσόφίλους ( 35-45 °C),
- Ψυχροαυτοθεκτικούς ( 20-30 °C) και
- Ψυχρόφίλους (10-20 °C)

## pH

Η αύξηση των μικροοργανισμών απαιτεί ένα συγκεκριμένο φάσμα τιμών pH το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε είδος μικροοργανισμού.

Ως pH ορίζεται ο προσδιορισμός της ενεργότητας των ιόντων υδρογόνου σε ένα διάλυμα και εκφράζεται ως ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου (ο οποίος εκφράζεται ως γραμμομοριακότητα):

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] = \log (1/[\text{H}^+])$$

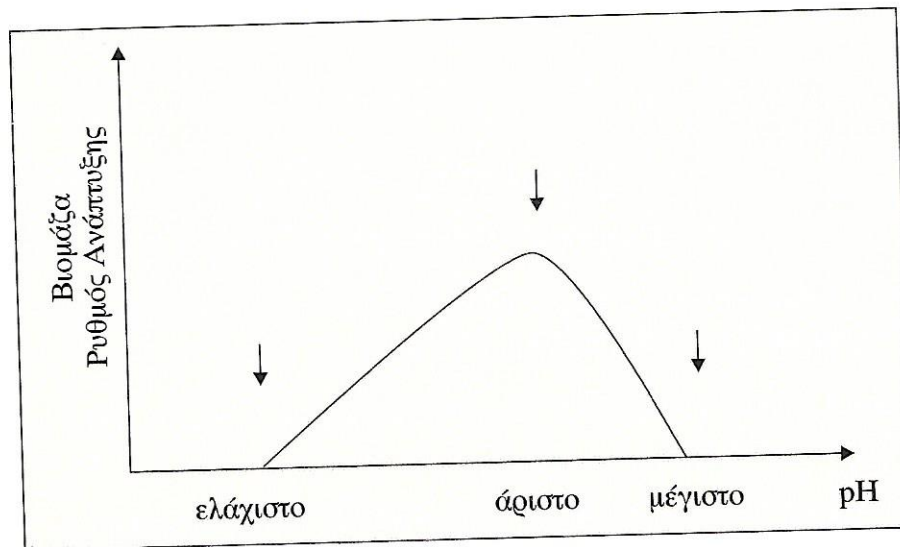
Η οξύτητα και η αλκαλικότητα ενός διαλύματος εκφράζεται ως pH σε μία κλίμακα από 0 έως και 14. Η τιμή pH=7 αντιστοιχεί στο ουδέτερο pH.

Οι μικροοργανισμοί βάσει του εύρους των τιμών pH εντός του οποίου αναπτύσσονται διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Οξεόφιλοι (από pH= 0-5,5)
- Ουδετερόφιλοι (από pH= 5,5-8)
- Βασεόφιλοι (από pH= 8,5-11) και
- Άκρως βασεόφιλοι (από pH άνω του 10)

Για τη μελέτη της επίδρασης ενός περιβαλλοντικού παράγοντα στην αύξηση ενός μικροοργανισμού απαιτούνται πειράματα κατά τα οποία θα πρέπει να κρατούνται σταθερές όλες οι άλλες παράμετροι περιβάλλοντος και να μεταβάλλεται μόνο ο προς μελέτην παράγοντας.





## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σας δίνονται 20 δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν υγρό θρεπτικό υλικό και εναιώρημα βακτηρίου *E. coli* και *B. stearotherophilus* και εναιώρημα ζύμης *S. cerevisiae* K<sub>2</sub>. Οι 10 εξ' αυτών πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για το πείραμα της θερμοκρασίας και οι 10 για το πείραμα του pH.

Αντικείμενα	Θρεπτικά Υποστρώματα	Μικροοργανισμοί	Όργανα
Δοκιμαστικοί σωλήνες	Θρεπτικός ζωμός σε υγρή μορφή [Nutrient Broth (NB)] για βακτήρια.	<i>Escherichia coli</i>	Σπεκτροφωτόμετρο
Σιφόνια (1ml, 5 ml)		<i>Bacillus stearotherophilus</i>	Πεχάμετρο Metrohm 691
Κυψελίδα σπεκτροφωτόμετρου Αντικειμενοφόρος Neubauer	Malt Extract broth (MEB) (εκλεκτικό υπόστρωμα ζυμών σε υγρή μορφή)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K <sub>2</sub>	Μικροσκόπιο
Καλυπτρίδες			Επωαστικοί κλίβανοι
Κωνικές φιάλες			
Γυάλινος διανομέας εμβολιασμού			

## Διαδικασία Εκτέλεσης της Άσκησης

### Μέρος Πρώτο

Εκτίμηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αύξηση της *E. coli* και του *B. steurothermophilus*

- Εμβολιάζετε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες με 1 ml εναιωρήματος *E. coli* και 5 δοκιμαστικούς σωλήνες με 1 ml εναιωρήματος *B. steurothermophilus* τον καθένα
- Προσδιορίστε τη βιομάζα με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας και του ολικού αριθμού κυττάρων (όπως στην 4η άσκηση).
- Επωάστε τις καλλιέργειες σε θερμοκρασία 5 °C (ψυγείο), 20 °C (πάγκος εργασίας), 28 °C, 37 °C και 55 °C (επωαστικοί κλίβανοι), για 2 ώρες.

**Σημείωση:** Οι καλλιέργειες πρέπει να μπουν στις αντίστοιχες θερμοκρασίες συγχρόνως ( $t=0$  για όλες τις καλλιέργειες το ίδιο) και να βγουν από τις αντίστοιχες θερμοκρασίες στον ίδιο χρόνο ( $t_1=2$  ώρες) που είναι και ο χρόνος επώασης της κάθε καλλιέργειας.

- Μετά την πάροδο των 2 ωρών προσδιορίστε τη βιομάζα των καλλιεργειών με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) και του ολικού αριθμού των κυττάρων (ΑΚ) (όπως στην 4η άσκηση).
- Καταγράψτε τα αποτελέσματα σας στον Πίνακα 1.

### Μέρος Δεύτερο

Εκτίμηση της επίδρασης του pH στην αύξηση της *E. coli* και της ζύμης *S. cerevisiae* K<sub>2</sub>

- Σε κάθε ένα από τους 10 δοκιμαστικούς σωλήνες με την ένδειξη pH, προσδιορίστε το pH σε πεχάμετρο τύπου 691 Metrohm. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες ανά δύο έχουν το ίδιο pH. Η μια σειρά των 5 σωλήνων προορίζεται για την *E. coli* και η δεύτερη σειρά για τη ζύμη *S. cerevisiae* K<sub>2</sub>
- Εμβολιάζετε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες με 1 ml εναιωρήματος *E. coli* και 5 δοκιμαστικούς σωλήνες με 1 ml εναιωρήματος *S. cerevisiae* K<sub>2</sub> τον καθένα.
- Προσδιορίστε τη βιομάζα με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) και του ολικού αριθμού κυττάρων (ΑΚ).
- Επωάστε τις καλλιέργειες στη θερμοκρασία των 30 °C για 24 ώρες.
- Καταγράψτε τα αποτελέσματα σας στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** (α) Οι τιμές της μεταβολής της βιομάζας του *E. coli* και του *B. stearothermophilus* κατά τη διάρκεια της αύξησής τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες. (β) Οι τιμές της μεταβολής της βιομάζας του *E. coli* και του *S. cerevisiae* κατά τη διάρκεια της αύξησής τους σε διαφορετικές τιμές pH.

T (°C)	5	20	28	37	55
<i>E.coli</i> ( ΟΠ)					
<i>B. stearothermophilus</i> (ΟΠ)					
pH	2	4	6	8	10
<i>E.coli</i> ( ΟΠ)					
<i>S. cerevisiae</i> K <sub>2</sub> (ΟΠ)					

### Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Περιγράψτε τα αποτελέσματά σας και προσδιορίστε τις ελάχιστες, άριστες και μέγιστες τιμές θερμοκρασίας και pH για κάθε μικροοργανισμό.

Στην περίπτωση που δεν ήταν δυνατός αυτός ο προσδιορισμός των τιμών εξηγήστε το λόγο.

Απαντήστε στο ερώτημα: Ήταν σωστός ο σχεδιασμός του πειράματος της θερμοκρασίας και για τους δύο μικροοργανισμούς; ναι ή όχι και γιατί.

Στο πείραμα της καμπύλης του pH τι παρατηρείτε για τους δυο μικροοργανισμούς; Ομοιότητες, διαφορές, τιμών άριστου pH;

Σε ποια συμπεράσματα θα μπορούσατε να οδηγηθείτε για το μικροενδιάστημα που θα προτιμούσε ο κάθε μικροοργανισμός και γιατί;