



Εκτίμηση της μικροβιακής αύξησης σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας (batch culture)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μικροβιακή αύξηση είναι η αύξηση των κυτταρικών συστατικών με αποτέλεσμα τη μεγέθυνση του μικροβιακού κυττάρου, επακόλουθο της οποίας είναι η διαίρεσή του. Στη Μικροβιολογία ορίζουμε ως “**αύξηση**” τον πολλαπλασιασμό του αριθμού των κυττάρων ενός μικροβιακού πληθυσμού.

Σ’ ένα κλειστό σύστημα καλλιέργειας, η μικροβιακή αύξηση ακολουθεί την καμπύλη της Εικόνας 1, στην οποία βασικά διακρίνουμε 6 φάσεις.

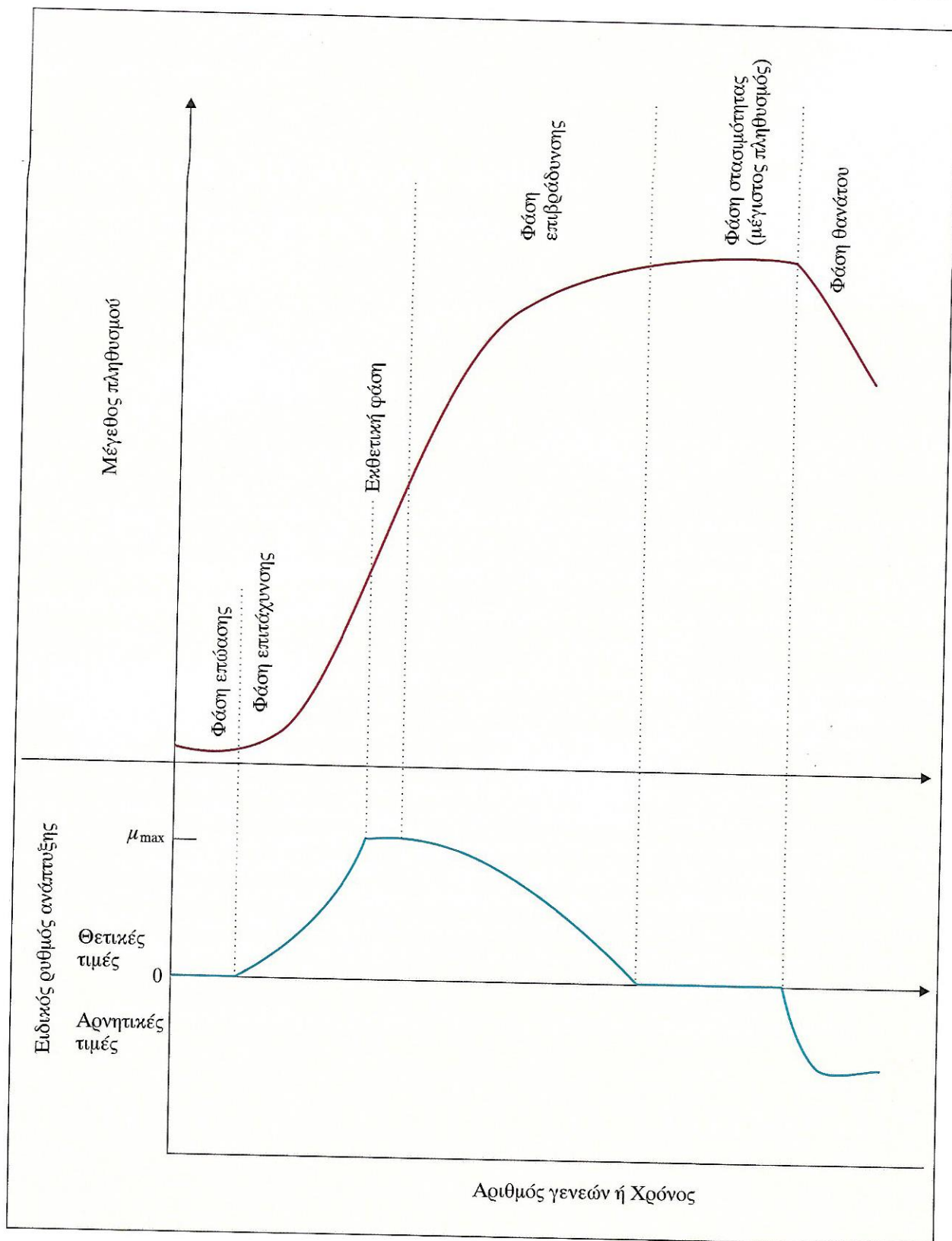
Στη φάση **επώασης**, τα μικροβιακά κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος, ενώ συγχρόνως οι βιοσυνθετικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται και προσαρμόζονται έτσι, ώστε να εξασφαλιστούν οι προϋποθέσεις για να ακολουθήσει μια άριστη αύξηση, κατά τη διάρκεια της οποίας ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα. Η φάση αυτή ονομάζεται **εκθετική ή λογαριθμική**. Η αύξηση μεγιστοποιείται και παραμένει σταθερή για όσο χρονικό διάστημα οι φυσικοχημικές συνθήκες του περιβάλλοντος το επιτρέπουν, δηλαδή δεν είναι περιοριστικές γι’ αυτήν. Εξαιτίας όμως της μικροβιακής αύξησης, εξαντλούνται τα βασικά συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος, ενώ συγχρόνως συσσωρεύονται τοξικές ουσίες του δευτερογενούς μεταβολισμού, με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση του ρυθμού αύξησης (φάση **επιβράδυνσης**) μέχρις ότου ο αριθμός των κυττάρων παύσει να αυξάνει, οπότε παραμένει μέγιστος και σταθερός για κάποιο χρονικό διάστημα (φάση **στασιμότητας**). Ακολουθεί η φάση **θανάτου** κατά την οποία ο μικροβιακός πληθυσμός αρχίζει να μειώνεται λόγω έλλειψης βασικών θρεπτικών υλικών.

Η λογαριθμική φάση περιγράφεται από τις βασικές εξισώσεις μικροβιακής αύξησης (1) και (2):

$$\mu_{\max} = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

$$\mu_{\max} = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0,693}{t_d} \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

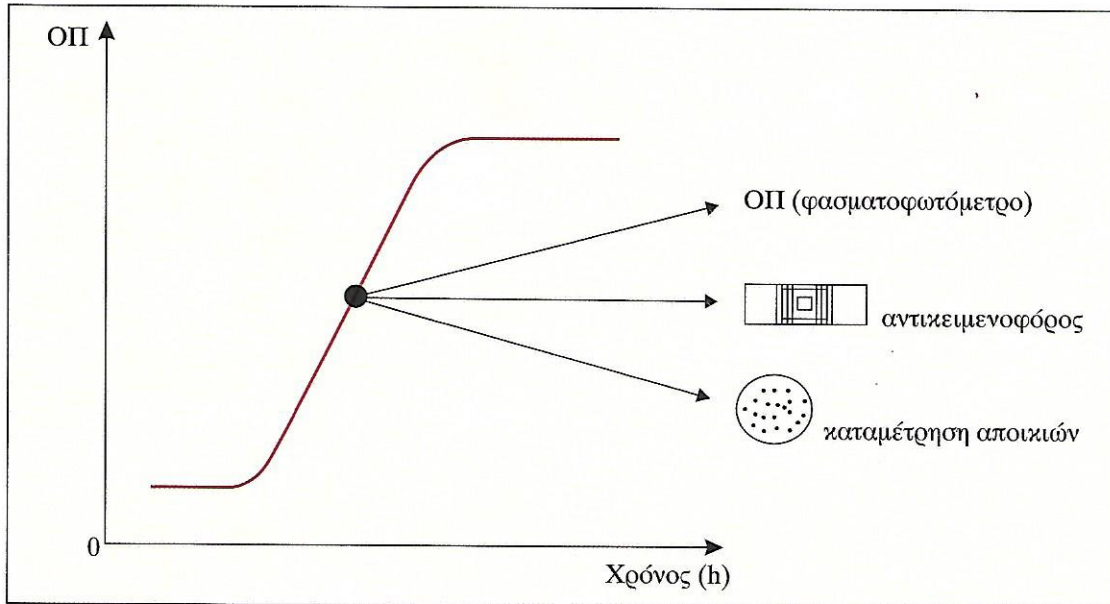
όπου: μ_{\max} = μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης, x_1, x_2 = βιομάζα (ολικός αριθμός κυττάρων ή οπτική πυκνότητα καλλιέργειας ή ξηρό βάρος ή αριθμός βιώσιμων μονάδων) σε χρόνους t_1 και t_2 αντίστοιχα, t_d = χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας (h).



Εικόνα 1. Οι φάσεις της μικροβιακής αύξησης σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας. Οι μεταβολές της τιμής του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της άσκησης αυτής είναι ο προσδιορισμός των διαφόρων φάσεων αύξησης του βακτηρίου *E. coli* σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας. Θα γίνει η εκτίμηση των δύο βασικών παραμέτρων αύξησης (μ_{max} και t_d) με τη βοήθεια των παραμέτρων προσδιορισμού της βιομάζας (ΟΠ, ΑΚ και ΑΒΜ = cfu).



Αντικείμενα	Θρεπτικά Υποστρώματα	Μικροοργανισμοί	Όργανοι
Κωνικές φιάλες (250 ml)	Θρεπτικός ζωμός σε υγρή [Nutrient Broth (NB)] και στερεά μορφή	<i>E. coli</i> (5 ml εμβολίου)	Φασματοφωτόμετρο
Δοκιμαστικοί σωλήνες	[Nutrient Agar (NA)] (τυπικό ή γενικού τύπου θρεπτικό βακτηριολογικό υπόστρωμα		Επωαστικός κλίβανος των 37°C
Σιφώνια 1ml, 5ml, 10ml			Μικροσκόπιο
Γυάλινη ράβδος εμβολιασμού			
Αντικειμενοφόρος Neubauer			
Καλυπτρίδες			
Τρυβλία Petri			

Λιαδικασία εκτέλεσης της Άσκησης

- Στο χρόνο $t=0$ εμβολιάζεται το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (NB) με το εμβόλιο του εναιωρήματος των κυττάρων της *E. coli* που σας δίδεται.
- Παρακολουθήστε φωτομετρικά τις μεταβολές της οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) της καλλιέργειας κάθε 10 - 15 λεπτά της ώρας.
- Κρατείστε δείγματα για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους (ΞΒ) και τον αριθμό βιώσιμων μονάδων (ΑΒΜ) σύμφωνα με τις υποδείξεις του υπεύθυνου.
- Καταγράψτε τις μετρήσεις σας (Πίνακας 1)
- Παραστήσατε τα αποτελέσματα σε ορθογώνιο σύστημα αξόνων (σε ημιλογαριθμικό χαρτί). Στον κάθετο άξονα βάλτε στη λογαριθμική κλίμακα τις τιμές της οπτικής πυκνότητας που βρήκατε. Στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχίστε τα 10 λεπτά της ώρας ανά 1 cm, άρα κάθε 1 ώρα πειράματος αντιστοιχεί σε 6 cm του οριζόντιου άξονα.
- Στο τέλος του πειράματος φτιάξτε την καμπύλη προσπαθώντας να προσδιορίσετε τις φάσεις του κύκλου αύξησης.
- Πάνω στην ευθεία της εκθετικής φάσης πάρτε δυο τυχαία σημεία. Απο αυτά βρείτε τις τιμές των x_1 , x_2 , t_1 και t_2 .
- Βάσει των μαθηματικών εξισώσεων (1) και (2) προσδιορίστε την τιμή του μ_{\max} και t_d
- Υπολογίστε τη χρονική διάρκεια κάθε φάσης.

Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Η σωστή δημιουργία της καμπύλης αύξησης (κλειστού συστήματος) έχει σε ημιλογαριθμική κλίμακα αξόνων ιδιαίτερη σημασία διότι δίνει τη δυνατότητα σημαντικής πληροφορίας για τη φυσιολογία του μικροοργανισμού που μελετάται.

Η αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων συνίσταται στην περιγραφή των αποτελεσμάτων, σε σχόλια που αφορούν τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα και στην εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την αύξηση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

Έτσι απαιτείται από το φοιτητή η σωστή εκτίμηση της κλίμακας των δεδομένων τιμών βιομάζας και χρόνου. Οι τιμές των x_1 , x_2 , t_1 και t_2 να μπουν πάνω στους άξονες, να ανήκουν στην εκθετική φάση και να είναι σαφής ο τρόπος προσδιορισμού της τιμής μ_{\max} και του t_d .

Επίσης πάνω στην καμπύλη να οριστούν με ενδεικτικά τόξα τα χρονικά όρια κάθε φάσης και να σημειωθούν οι χρόνοι διάρκειας.

Να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς τις τιμές μ_{\max} και t_d .

Πίνακας 1. Οπτική πυκνότητα, ολικός αριθμός κυττάρων και αριθμός βιώσιμων μονάδων ανά ml καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli*.

Χρόνος Καλλιέργειας (ώρες)	Οπτική Πυκνότητα (ΟΠ ₆₀₀) Καλλιέργειας	Αριθμός Ολικών Κυττάρων (AK/ml καλλιέργειας)	Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων (ABM ή cfu/ml καλλιέργειας)
t = 0			