

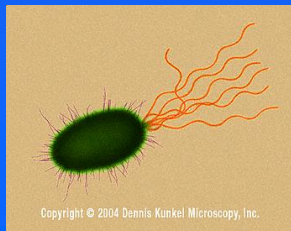
# Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

### Μικροβιολογικά Θρεπτικά Υποστρώματα

### 1<sup>ο</sup> Εργαστήριο

Όλγα Παπαδοπούλου - Πασχαλίτσα Τρυφίνοπούλου - Αναστάσιος Σταματίου



# ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται όταν οι συνθήκες που επικρατούν γύρω από το μικροπεριβάλλον τους (υπόστρωμα) είναι ιδανικές για τον πολλαπλασιασμό τους

Η απομόνωση, διατήρηση και πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται σε θρεπτικά υποστρώματα τα οποία ονομάζουμε αλλιώς σαν θρεπτικό υλικό - υλικά (medium - media)

Τα θρεπτικά υλικά μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά

Ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζει ή καθορίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών είναι και τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος



Το υπόστρωμα που θα αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά τα οποία τους είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό τους και δεν μπορούν τα ίδια να συνθέσουν

# Μικροβιολογικά Θρεπτικά υποστρώματα - Ορισμός

Κάθε υγρό ή στερεό μέσο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καλείται θρεπτικό υπόστρωμα

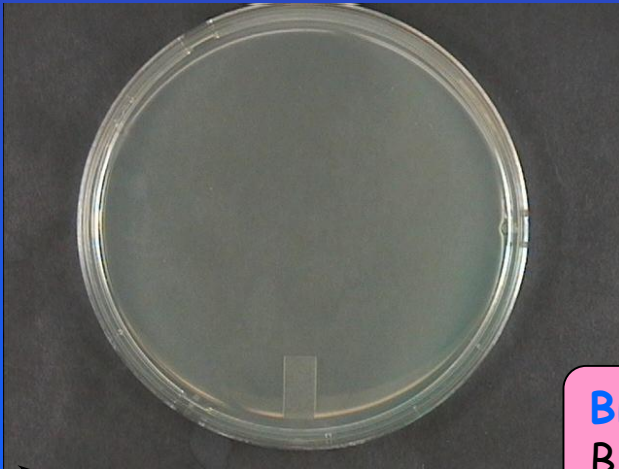
**Πηγή άνθρακα:** Κυρίως μονο- και δι-σακχαρίτες και σπανιότερα ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

**Πηγή αζώτου:** Μπορεί να είναι ανόργανη (αμμωνιακά άλατα), ή οργανική (πεπτόνη, τρυπτόνη)

**Βιταμίνες:** Ως δομικά συστατικά διαφόρων ενζύμων, π.χ. Βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη.

**Ιχνοστοιχεία:** Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Co, κλπ

**Ανόργανα άλατα:** π.χ. άλατα νατρίου, καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου. Επίσης φωσφορικά άλατα.



# Κατηγορίες Θρεπτικών υποστρωμάτων - Ι

Υγρά υποστρώματα

Broth media

Στερεά υποστρώματα

Solid media

Για την παρασκευή των στερεών υποστρωμάτων θα πρέπει να προστεθεί ένας πηκτικός παράγοντας που ονομάζεται άγαρ

Το άγαρ παρουσιάζει τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Είναι ουδέτερο συστατικό και δεν επιδρά στη φυσιολογία του μικροοργανισμού
2. Δεν υδρολύεται από τους μικροοργανισμούς
3. Χρησιμοποιείται σε περιεκτικότητα 1,2-1,5%. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα παρεμποδίζει την ανάπτυξη λόγω μείωσης της τιμής της ενεργότητας ύδατος
4. Ρευστοποιείται σε βραστό νερό, ενώ σε θερμοκρασία 40°C ή χαμηλότερα στερεοποιείται
5. Παραμένει ρευστό σε θερμοκρασία >40-45°C.
6. Όταν χρησιμοποιείται για εμβολιασμό θα πρέπει να έχει θερμοκρασία 45-47°C για να μην θανατωθούν οι μικροοργανισμοί

# Κατηγορίες Θρεπτικών υποστρωμάτων

Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηκτικός παράγοντας η ζελατίνη, η οποία όμως παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα σε σχέση με το άγαρ:

1. Προστίθεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα (12-15%)
2. Επηρεάζεται από το χαμηλό pH και συχνά υδρολύεται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα των μικροοργανισμών.
3. Ρευστοποιείται σε θερμοκρασία > 25°C. Συνεπώς συνδυασμός χαμηλού pH και υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση

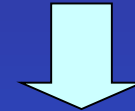
# Κατηγορίες Θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙ

## Φυσικά υποστρώματα



Τα συστατικά αυτών των υλικών βρίσκονται σε ακατέργαστη μορφή, δλδ. δεν γνωρίζουμε ακριβώς τη σύνθεση, λαμβάνονται από τη φύση, χυμός τομάτας, εκχυλίσματα φρούτων, κλπ

## Συνθετικά υποστρώματα



Παρασκευάζονται στο εργαστήριο ή στη βιομηχανία και γνωρίζουμε πλήρως τη σύνθεση, π.χ. MacConkey Agar

# Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙΙ

## Γενικά υποστρώματα

Τα γενικά ή μη επιλεκτικά υποστρώματα περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη όλων σχεδόν των μικροοργανισμών. Τυπικό παράδειγμα είναι το Nutrient agar ή broth που αποτελείται από εκχύλισμα κρέατος και πεπτόνη.



500 g

N14100-500.0

Research Products International Corp.

### NUTRIENT AGAR

#### Formula:

Meat Extract 3.0 g  
Pancreatic Digest of Casein 5.0 g  
Agar 15.0 g

Caution: Irritant, Avoid Breathing Dust and Contact with Skin and Eyes.

FOR RESEARCH USE ONLY

# Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙΙ

## Εξειδικευμένα υποστρώματα

Τα **εξειδικευμένα υποστρώματα** χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και απαρίθμηση ορισμένων κατηγοριών μικροοργανισμών. ΔΗΛΑΔΗ η σύνθεσή τους δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των άλλων μικροοργανισμών. Αυτό επιτυγχάνεται με:

- τη διόρθωση του pH στο υπόστρωμα
- την προσθήκη αντιβιοτικών που αναστέλλουν τη δράση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών
- την προσθήκη ουσιών που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση διαφορετικών αποικιών μεταξύ τους





# Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων - ΙΙΙ

Εξειδικευμένα  
υποστρώματα

**Επιλεκτικά (elective):** τα οποία ικανοποιούν τις απαιτήσεις μίας ή περισσότερων ομάδων βακτηρίων χωρίς να παρεμποδίζουν όμως τελείως άλλες ομάδες

**Εκλεκτικά (selective):** τα οποία περιέχουν έναν ή περισσότερους παρεμποδιστικούς παράγοντες, οι οποίοι επιτρέπουν την ανάπτυξη της ομάδας που θέλουμε να απομονώσουμε

# Παράδειγμα επιλεκτικού υποστρώματος

MRS agar

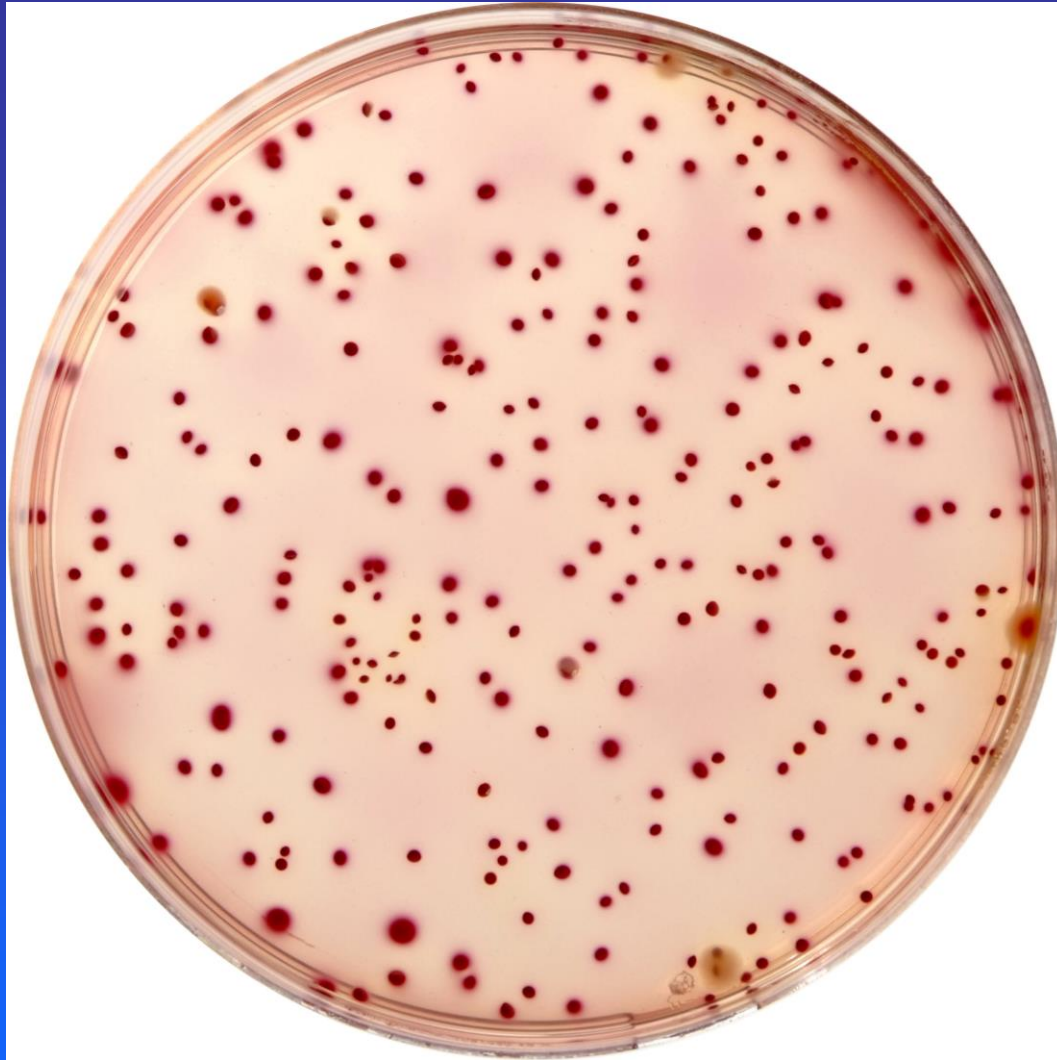
| ρΗ Διορθωμένο | Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται |
|---------------|-----------------------------------|
| 8             | <i>Carnobacterium</i> spp.        |
| 7             | Στρεπτόκοκκοι                     |
| <5.7          | Οξυανθεκτικά γαλακτικά βακτήρια   |
| <5.7          | Ζύμες                             |

Διόρθωση του ρΗ έχει σαν αποτέλεσμα την απομόνωση συγκεκριμένων ομάδων και ειδών

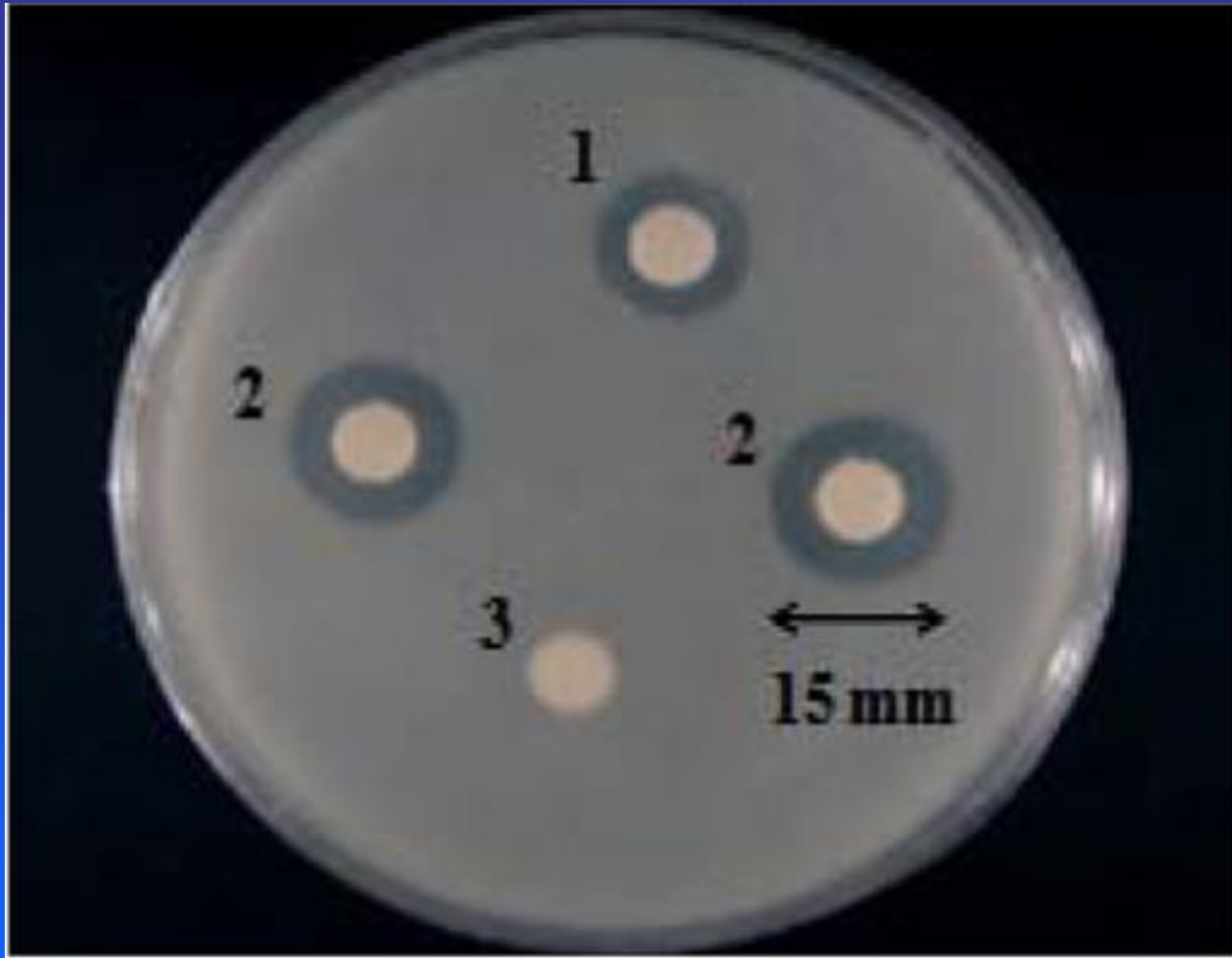
# Παράδειγμα εξειδικευμένων υποστρωμάτων - Επιλεκτικά

| Υλικό                        | Ουσία                        | Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται  | Μορφολογία αποικιών   |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---|
| Baird-Parker Agar Base       | Egg-yolk emulsion            | <i>S. Aureus</i><br><br>Micrococci | Μαύρες αποικίες με δακτύλιο<br><br>Μαύρες αποικίες χωρίς δακτύλιο |
| Violet Red Bile Glucose Agar | Crystal violet<br>Bile salts | Enterobacteriaceae                 | Μώβ αποικίες με δακτύλιο  |
| Tributyryn Agar Base         | Glycerol tributyrate         | Λιπολυτικοί                        | Αποικίες με δακτύλιο  |

Προσθήκη ουσιών που επιτρέπουν την διαφοροποίηση διαφορετικών αποικιών μεταξύ τους

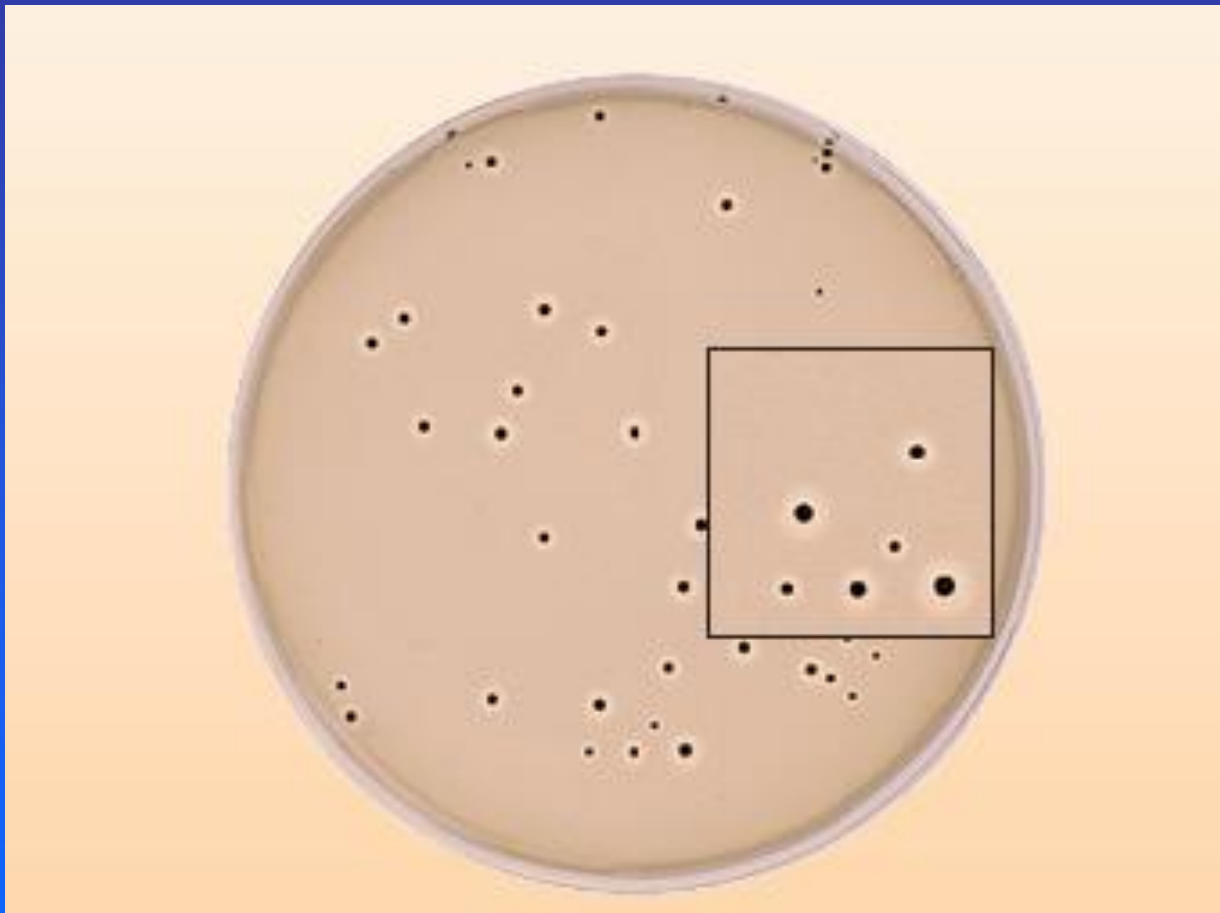


VRBG Agar: Επιλεκτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*



Tributyryn Agar Base: 1, 2: θετικά δείγματα, 3: Αρνητικό (control)

# Παράδειγμα εξειδικευμένων υποστρωμάτων Baird Parker

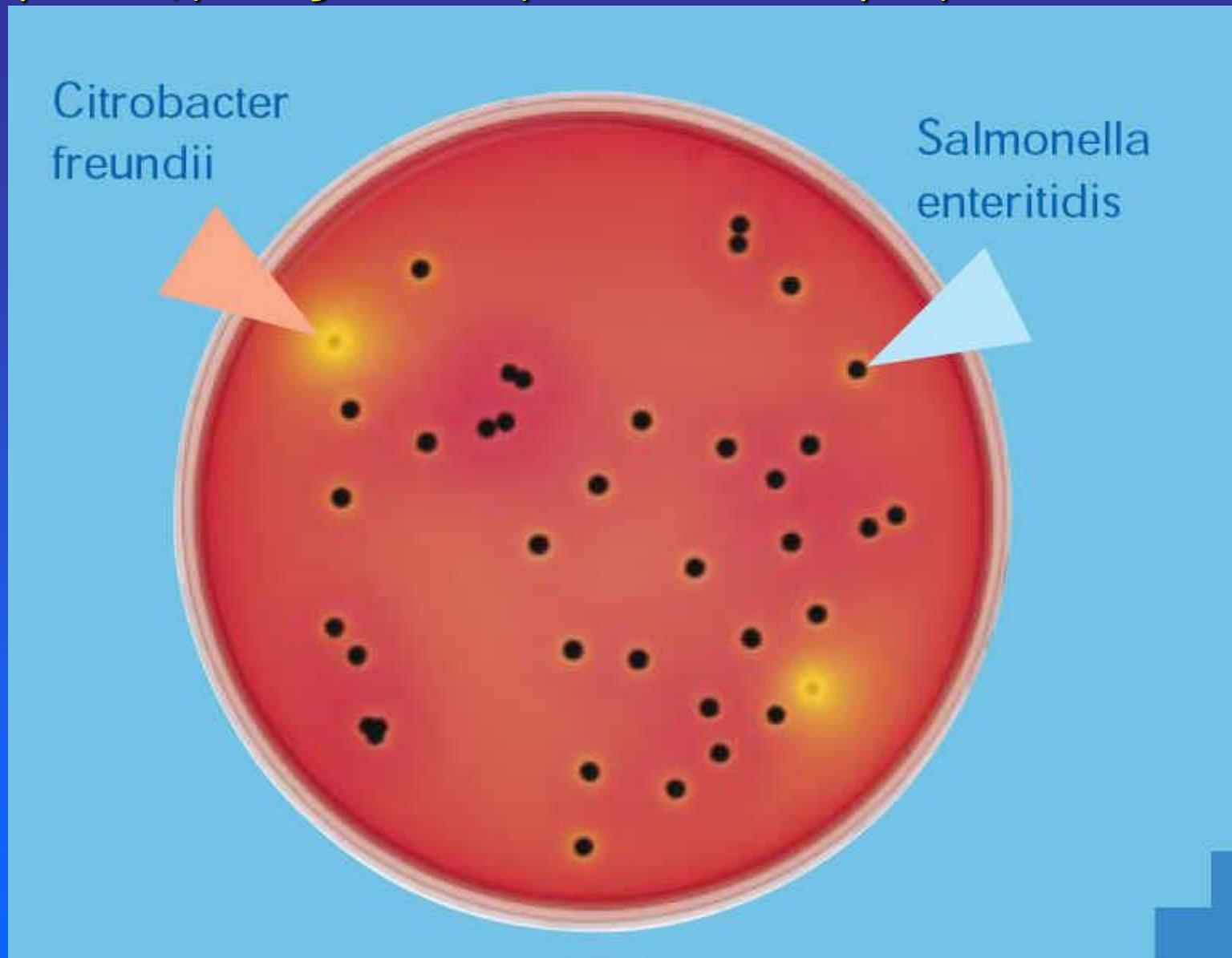


# Παράδειγμα εξειδικευμένων υποστρωμάτων - Εκλεκτικά

| Υλικό                 | Αντιβιοτικό   | Μικρ/σμοί που αναπτύσσονται      |
|-----------------------|---|----------------------------------|
| Pseudomonas agar base | Cetrimide<br>Fusidin<br>Cephaloridine                     | Ψευδομονάδες                     |
| STAA agar base        | Streptomycin sulphate<br>Thallos acetate<br>Cycloheximide | <i>Brochothrix thermosphacta</i> |
| Rose Bengal agar base | Chloramphenicol   | Ζύμες/Μύκητες                    |

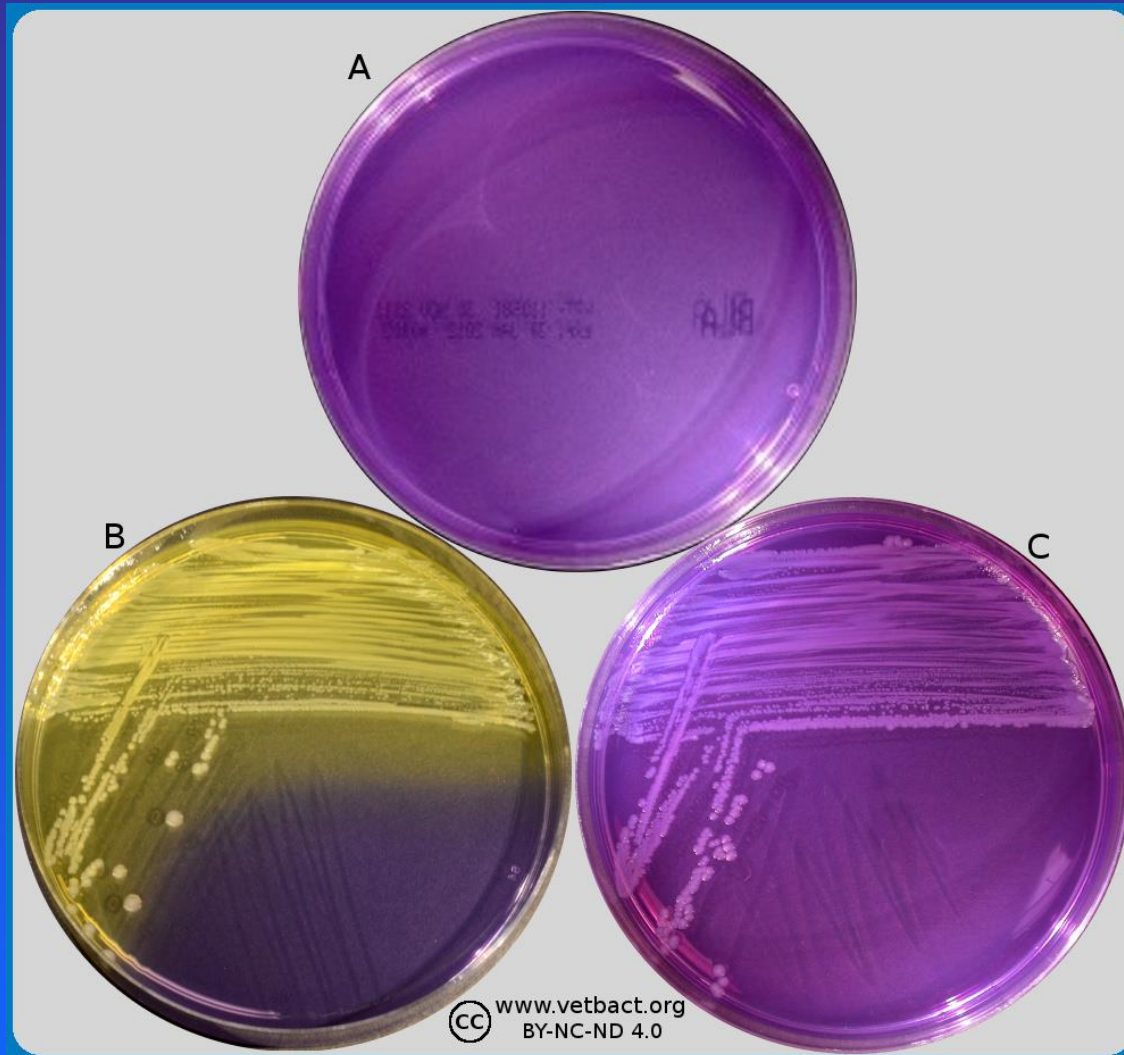
Προσθήκη αντιβιοτικών, που αναστέλλουν την δράση των μη επιθυμητών μικροοργανισμών

# Παράδειγμα εξειδικευμένων υποστρωμάτων - ΧLT4

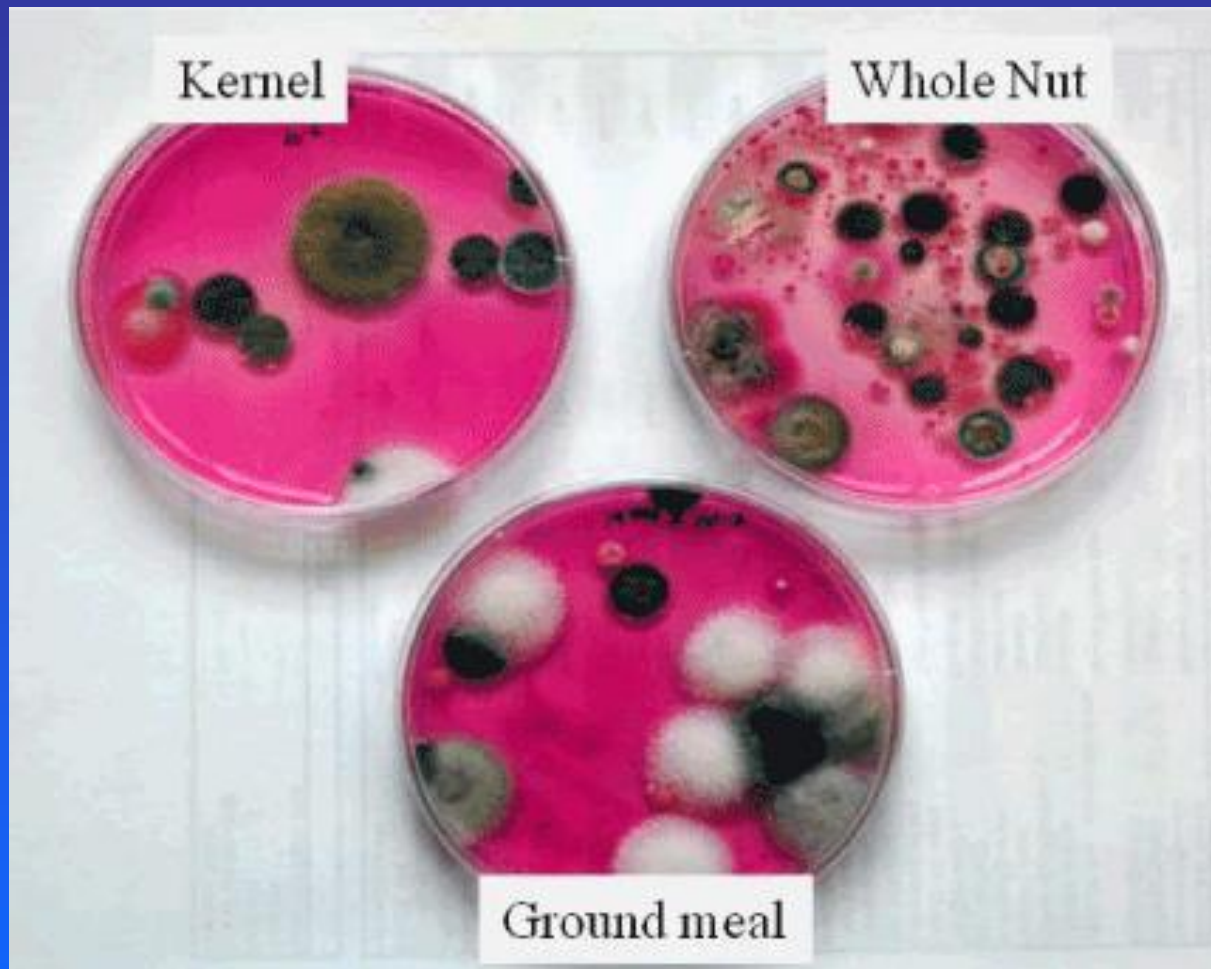


Εκλεκτικό υπόστρωμα για την αρίθμηση non typhi Salmonella





STAA base Agar: B: *Brochothrix thermosphacta*  
C: other



RBC Agar: Εκλεκτικό υπόστρωμα για  
απαρίθμηση ζυμών και μυκήτων

# Αποστείρωση

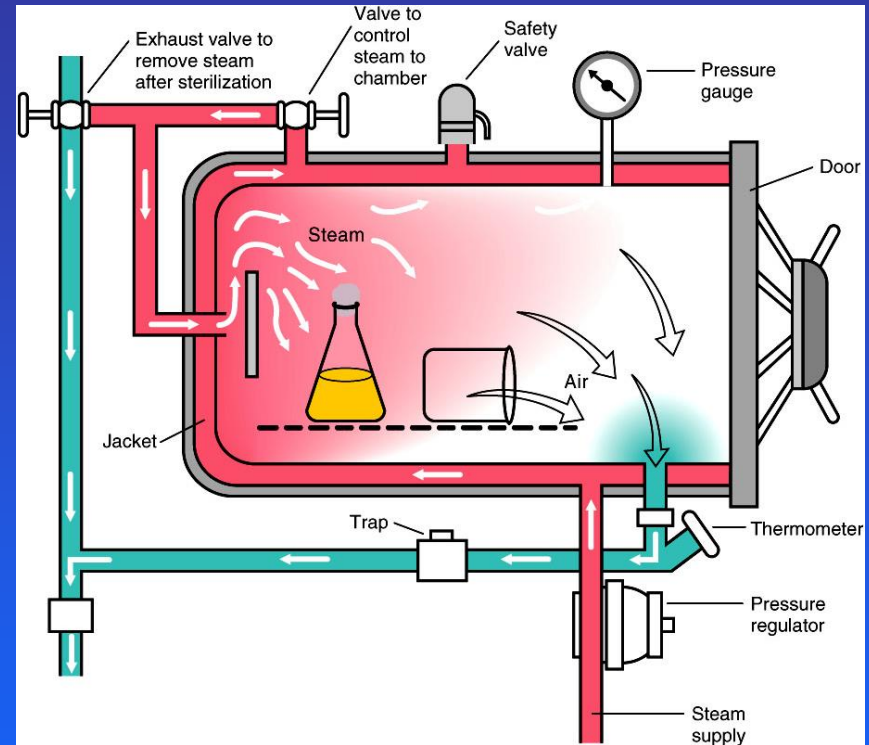
Αποστείρωση είναι η διαδικασία καταστροφής όλων των μορφών μικροβιακής ζωής σε ένα υλικό ή αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών μορφών (ενδοσπόρια)



# Μέθοδος υγρής αποστείρωσης - Αυτόκαυστο

- Το αυτόκαυστο χρησιμοποιεί ατμό υπό πίεση
- Η αποστείρωση επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 15 psi σε 15 min

| Pressure (psi in excess of atmospheric pressure) | Temperature (°C) |
|--|------------------|
| 0 psi  | 100              |
| 5 psi  | 110              |
| 10 psi   | 116              |
| 15 psi   | 121              |
| 20 psi   | 126              |
| 30 psi   | 135              |



# Μέθοδος ξηρής αποστείρωσης

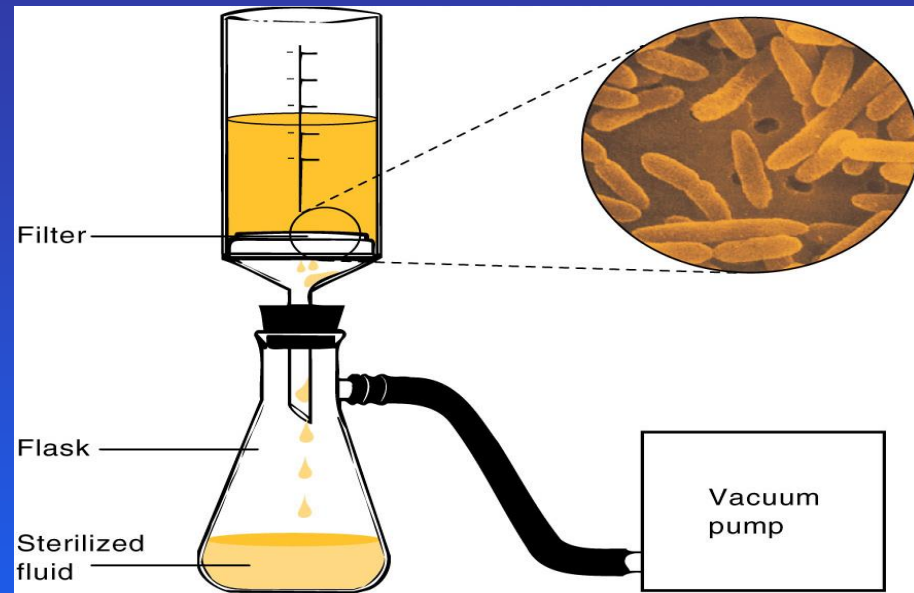
- Στη μέθοδο αυτή τα αντικείμενα τοποθετούνται σε φούρνο όπου διοχετεύεται θερμός και ξηρός αέρας.
- Η επεξεργασία γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία 160-170°C για 2-4 ώρες.



# Αποστείρωση με διήθηση

- Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση υγρών θρεπτικών υλικών που περιέχουν συστατικά ευαίσθητα στην θερμότητα (βιταμίνες, αντιβιοτικά, κλπ)

- Το υγρό θρεπτικό υλικό περνάει μέσα από ηθμό με μέγεθος πόρων  $0,45 \mu\text{m}$  με τη βοήθεια κενού και συλλέγεται σε αποστειρωμένη φιάλη

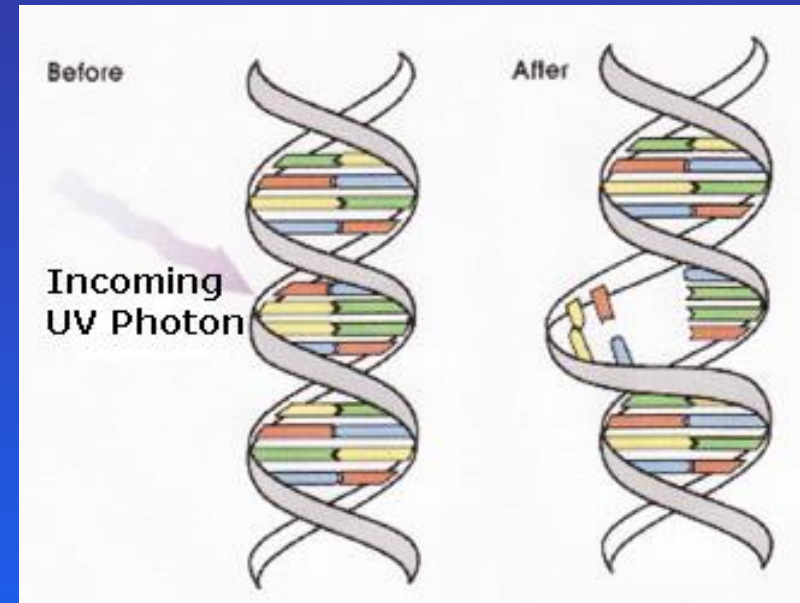


# Αποστείρωση με ακτινοβολία

- Χρησιμοποιείται υπεριώδης ακτινοβολία (μη ιονίζουσα ακτινοβολία) με μήκος κύματος 260 nm. Επιδρούν στο DNA των βακτηρίων.

- Χρησιμοποιείται επίσης και ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες Χ, ακτίνες γ και καθοδικές ακτίνες).

- Παρουσιάζουν μικρή διεισδυτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση εργαστηριακών υλικών όπως τρυβλία, σύριγγες, μικροβιολογικοί κρίκοι.



# Πειραματική διαδικασία





# Πειραματική διαδικασία

Παρασκευή θρεπτικών υλικών:

Plate Count Agar για καταμέτρηση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας

*Pseudomonas Agar Base + CFC selective supplement* για καταμέτρηση *Pseudomonas spp.*

*Streptomycin Thallous Acetate Actidione Agar + STAA selective supplement* για καταμέτρηση *Brochothrix thermosphacta*

*Rose Bengal Chloramphenicol Agar + chloramphenicol* για καταμέτρηση Ζυμών και Μυκήτων



To be continued..