

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Η οριστική διάγνωση μιας λοίμωξης, εξαρτάται από την ανίχνευση, την απομόνωση και την ταυτοποίηση του ίδιου του παθογόνου μικροοργανισμού που την προκάλεσε, καθώς και από την ανίχνευση αντιγόνων και αντισωμάτων που παράγονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Οι ειδικές μέθοδοι καλλιέργειας, χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και ταυτοποίηση μιας μεγάλης ποικιλίας παθογόνων μικροοργανισμών. Στις παραδοσιακές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβάνονται η μικροσκοπική εξέταση, ο έλεγχος των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των καλλιεργειών και των μεταβολικών αλλαγών, που οφείλονται στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα θρεπτικά υποστρώματα. Σε πολλά θρεπτικά υποστρώματα, κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, παράγονται χρώματα διαφορετικά από το αρχικό. Παράδειγμα αποτελούν οι χρυσίζουσες αποικίες του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*, που δημιουργούνται στο κόκκινο αιματούχο άγαρ ή οι πράσινες αποικίες του βακτηριδίου *Pseudomonas aeruginosa*, που δημιουργούνται στο θρεπτικό άγαρ. Η καλλιέργεια των παθογόνων μικροοργανισμών είναι μία αξιόπιστη και αρκετά έγκυρη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για την αρχική αναγνώριση του υπεύθυνου παθογόνου μικροοργανισμού που προκάλεσε μία λοίμωξη. Η καλλιέργεια από μόνη της όμως δεν μπορεί να ταυτοποιήσει τον υπεύθυνο παθογόνο μικροοργανισμό. Για το λόγο αυτό, απαιτούνται επιπρόσθετες βιοχημικές και ορολογικές εξετάσεις, οι οποίες διενεργούνται ταυτόχρονα ή αμέσως μετά από την καλλιέργεια του εξεταζόμενου παθολογικού υλικού.

Πολλές βιοχημικές, ορολογικές και μοριακές δοκιμασίες, είναι πλέον διαθέσιμες για την οριστική ταυτοποίηση των βακτηρίων που προκαλούν παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο. Η ακρίβεια, η αξιοπιστία και η ταχύτητα με την οποία

δίνεται το αποτέλεσμα, είναι σημαντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την επιλογή της κατάλληλης δοκιμασίας για κάθε μικροοργανισμό. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από την ανάγκη για την προκαταρκτική ή οριστική ταυτοποίηση του μικροοργανισμού (γένος και είδος) και βασίζεται στην παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών, καθώς και σε διάφορα άλλα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών.

Η ταυτοποίηση των παθογόνων μυκήτων και παρασίτων, βασίζεται κυρίως στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών αυτών, δηλαδή στην μικροσκοπική τους εξέταση. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιούνται ορισμένες βιοχημικές δοκιμασίες, καθώς και η καλλιέργεια των παραπάνω μικροοργανισμών, σε περιορισμένο όμως βαθμό σε σχέση με τα βακτήρια. Για την καλλιέργεια των μυκήτων και των παρασίτων έχουν αναπτυχθεί διάφορα θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία αναλύονται στα κεφάλαια 5 και 6 του βιβλίου αυτού.

### **ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

Πολλές εργαστηριακές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τη συλλογή, την απομόνωση και την ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών από διαφορετικές ανατομικές περιοχές του ανθρώπινου σώματος (αίμα, ιστοί, υγρά, εκκρίματα κτλ.). Για κάθε μικροοργανισμό χρησιμοποιείται συνήθως διαφορετική δοκιμασία. Οι εργαστηριακές τεχνικές, αποσκοπούν στην ανεύρεση του υπεύθυνου παθογόνου μικροοργανισμού, ο οποίος ευθύνεται για την πρόκληση συγκεκριμένης νόσου. Σε περίπτωση όμως που η κλινική εικόνα του ασθενούς συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης ενός σπάνιου μικροοργανισμού, τότε απαιτούνται επιπρόσθετες εξετάσεις, πέραν της καλλιέργειας, με σκοπό την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού αυτού.

Τα εργαστήρια Κλινικής Μικροβιολογίας, εισέρχονται σταδιακά στην εποχή της μοριακής διάγνωσης, δηλαδή στην ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών με εξετάσεις που βασίζονται στην ανίχνευση του γενετικού υλικού τους. Πάντοτε όμως, οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας θα συνεχίσουν να παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στις προσπάθειες των επιστημόνων για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μοριακές δοκιμασίες έχουν απαγορευτικό κόστος για πολλά μικροβιολογικά εργαστήρια, δεν διαθέτουν ικανοποιητική ευαισθησία ή/και ειδικότητα και δεν είναι ιδιαίτερα πρακτικές στην εφαρμογή τους. Μέχρι να επιλυθούν αυτά τα προβλήματα, το προσωπικό του μικροβιολογικού εργαστηρίου θα συνεχίσει να στηρίζεται στην καλλιέργεια των παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς και στις βιοχημικές και ορολογικές δοκιμασίες, με σκοπό την ταυτοποίησή τους. Τα παραπάνω ισχύουν επίσης για τους μύκητες και τους ιούς. Δεν υπάρχουν αρκετές εργαστηριακές τεχνικές ταυτοποίησης των μικροοργανισμών αυτών, οπότε απαιτείται σε πολλές περιπτώσεις η καλλιέργειά τους πριν από την ταυτοποίησή

τους. Με την καλλιέργεια αναγνωρίζονται βασικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης στα θρεπτικά υποστρώματα ή κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις που προκαλούνται στις κυτταροκαλλιέργειες των ιών και στη συνέχεια διενεργούνται διάφορες δοκιμασίες ταυτοποίησης των μικροοργανισμών αυτών, όπως ορολογικές εξετάσεις, ανοσοφθορισμός, χρήση ανιχνευτών DNA κτλ.

## **ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

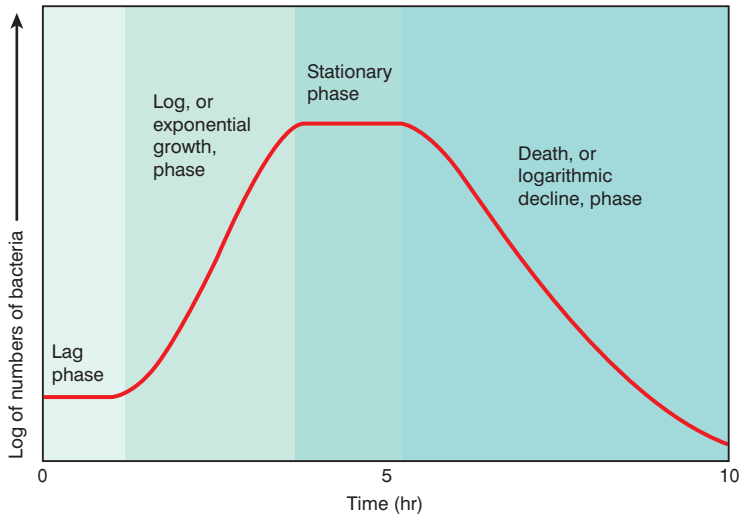
Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, απαιτείται η πρόσβασή τους σε πηγές ενέργειας και σε ενώσεις απαραίτητες για τη σύνθεση των κυτταρικών τους δομών. Πηγές ενέργειας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποτελούν ο άνθρακας, το υδρογόνο, το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, ο φωσφόρος, καθώς και μεταλλικά ιχνοστοιχεία. Οι μικροοργανισμοί, λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά διαμέσου των μεμβρανών τους και με διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις που διενεργούνται στο κυτταρόπλασμά τους, μετατρέπουν τα συστατικά αυτά σε προϊόντα χρήσιμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών οδηγεί σε αύξηση του αριθμού τους. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος και διαιρούνται σε δύο θυγατρικά κύτταρα, περίπου ίσου μεγέθους. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω ισχύουν για τα βακτήρια, τους μύκητες και τα περισσότερα πρωτόζωα. Τα μετάζωα και οι ιοί, έχουν διαφορετικό τρόπο πολλαπλασιασμού και δύσκολα καλλιεργούνται σε συμβατικά θρεπτικά υποστρώματα, απαιτώντας συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας για την ανάπτυξή τους.

## **Η ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών γίνεται μέσω της καμπύλης ανάπτυξης κατά την καλλιέργεια. Όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, συνήθως σε κλειστά συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας (batch cultures), το θρεπτικό υπόστρωμα δεν ανανεώνεται. Για τον λόγο αυτό, η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών ελαττώνεται, ενώ η συγκέντρωση των προϊόντων του μεταβολισμού των μικροοργανισμών, αυξάνεται. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που πολλαπλασιάζονται με κυτταρική διαίρεση, μπορεί να παρασταθεί ως ο λογάριθμος του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με το χρόνο. Η μορφή της καμπύλης που προκύπτει, έχει τέσσερις διακριτές περιοχές (Εικ. 1.1).

### **1. Φάση προσαρμογής (Lag phase)**

Όταν οι μικροοργανισμοί προστίθενται στο θρεπτικό υπόστρωμα, συνήθως δεν πολλαπλασιάζονται για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται φάση προσαρμογής. Τα κύτταρα στη φάση αυτή δεν διαιρούνται και δεν υπάρχει καθαρή



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Εικ. 1.1.** Καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών στην καλλιέργεια.

αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, όμως συνθέτουν τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για διάφορους λόγους, όπως η προσαρμογή των μικροοργανισμών στο περιβάλλον του θρεπτικού υποστρώματος και η ανάγκη σύνθεσης ενζύμων που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, εξαρτάται από τη μεταβολική κατάσταση στην οποία βρίσκονται οι μικροοργανισμοί, τη φύση και τη θερμοκρασία του θρεπτικού υποστρώματος, την ποσότητα των βακτηρίων που εμβολιάζονται κτλ. Η φάση προσαρμογής διαρκεί αρκετό χρόνο, όταν τα βακτήρια που εμβολιάζονται είναι γηρασμένα ή όταν το θρεπτικό υπόστρωμα αποτελείται μόνο από καθαρές χημικές ενώσεις.

Αντίθετα, όταν τα βακτήρια που θα εμβολιασθούν προέρχονται από καλλιέργεια που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος είναι όμοια με τη σύνθεση του υποστρώματος από το οποίο προήλθαν, τότε η φάση προσαρμογής διαρκεί λιγότερο.

## 2. Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Log or Exponential phase)

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με ένα μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Επειδή κάθε κύτταρο διαιρείται σε διαφορετική χρονική στιγμή, η μορφή της καμπύλης ανάπτυξης είναι ομαλή, χωρίς να παρατηρείται απότομη αύξηση.

### 3. Φάση στασιμότητας (Stationary phase)

Μετά το πέρας της δεύτερης φάσης, η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά και η καμπύλη ανάπτυξης γίνεται οριζόντια. Στη φάση αυτή, ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων παραμένει σταθερός, οπότε εξισορροπείται ο ρυθμός ανάπτυξης και ο ρυθμός θανάτου των μικροοργανισμών. Η φάση στασιμότητας παρατηρείται στα βακτήρια, όταν ο πληθυσμός των κύτταρων είναι περίπου  $10^9$ /mL, ενώ στα πρωτόζωα και τους μύκητες, η τιμή αυτή φθάνει περίπου στα  $10^6$  κύτταρα/mL. Ο βακτηριακός πληθυσμός εισέρχεται στη φάση στασιμότητας, για διαφόρους λόγους. Ένας προφανής λόγος, είναι η ελάττωση ενός ή περισσότερων θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος. Στις περιπτώσεις αερόβιας καλλιέργειας, το οξυγόνο είναι ο περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης, διότι έχει χαμηλή διαλυτότητα στο διάλυμα του υποστρώματος και δεν επαρκεί για να διατηρήσει τη βακτηριακή καλλιέργεια σε ρυθμό εκθετικής ανάπτυξης. Η ανάπτυξη των κυττάρων, μπορεί επίσης να ελαττωθεί, λόγω της συσσώρευσης τοξικών μεταβολικών προϊόντων στο θρεπτικό υπόστρωμα. Για παράδειγμα, οι στρεπτόκοκκοι παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται το pH του υποστρώματος και να σταματά η περαιτέρω ανάπτυξή τους.

### 4. Φάση θανάτου (Logarithmic decline or Death phase)

Η μείωση των θρεπτικών συστατικών και η αύξηση των τοξικών προϊόντων στο θρεπτικό υπόστρωμα, οδηγούν την καλλιέργεια στη φάση θανάτου. Ο θάνατος των κυττάρων, όπως και η ανάπτυξή τους, είναι συνήθως λογαριθμική, δηλαδή κάθε ώρα νεκρώνεται σταθερό ποσοστό κυττάρων. Αυτή η σχέση, ισχύει ακόμη και όταν ο συνολικός αριθμός των κυττάρων παραμένει σταθερός, εξαιτίας καθυστέρησης στη λύση των νεκρών κυττάρων.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η καμπύλη ανάπτυξης, ισχύει για την πλειοψηφία των βακτηρίων, ενώ δεν ισχύει απόλυτα για τους μύκητες και τα παράσιτα.

## ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, κάθε κύτταρο διαιρείται σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Άρα, ο πληθυσμός των κυττάρων διπλασιάζεται σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο ονομάζεται χρόνος διπλασιασμού. Για παράδειγμα, αν εμβολιάσουμε μια καλλιέργεια με ένα κύτταρο, το οποίο διαιρείται κάθε 20 λεπτά, θα έχουμε 2 κύτταρα σε 20 λεπτά, 4 κύτταρα σε 40 λεπτά κ.ο.κ. Επειδή ο πληθυσμός των κυττάρων διπλασιάζεται σε κάθε γενιά, τότε σε  $n$  γενιές θα έχουμε  $2^n$  κύτταρα στην καλλιέργεια.

Αν λοιπόν:

$N_0$  είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων

$N_t$  είναι ο αριθμός των κυττάρων τη χρονική στιγμή  $t$

και  $n$  είναι ο αριθμός των γενεών στο χρόνο  $t$ , τότε ισχύει η σχέση:

$$N_t = N_0 2^n$$

Λύνοντας ως προς  $n$ , έχουμε:

$$n = (\log N_t - \log N_0) / \log 2 = (\log N_t - \log N_0) / 0,301$$

Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης  $k$ , που είναι ο αριθμός των γενεών ανά μονάδα χρόνου, (συνήθως ανά ώρα) υπολογίζεται ως εξής:

$$k = n / t = (\log N_t - \log N_0) / 0,301 t$$

*Παράδειγμα υπολογισμού:*

Αρχικός πληθυσμός κυττάρων, πολλαπλασιάζεται από  $10^3$  σε  $10^9$  κύτταρα, εντός 10 ωρών.

Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης είναι:

$$k = (\log N_t - \log N_0) / 0,301 t = (\log 10^9 - \log 10^3) / 0,301 \times 10 \text{ hr} = (9-3) / 3,01 \text{ hr} = 2,0 \text{ γενιές / hr}$$

Ο μέσος χρόνος ανά γενιά είναι:

$$1 / (2,0 \text{ γενιές / hr}) = 0,5 \text{ hr / γενιά} = 30 \text{ λεπτά / γενιά}$$

Ο αριθμός των γενεών στην διάρκεια των 10 ωρών είναι:

$$10 \text{ ώρες / } 0,5 \text{ hr / γενιά} = 20 \text{ γενιές κυττάρων.}$$

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥΣ

Τα θρεπτικά υποστρώματα είναι τα υλικά εκείνα που περιέχουν οργανικές και ανόργανες ουσίες, οι οποίες χρησιμεύουν για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των διαφόρων μικροοργανισμών. Είναι λοιπόν απαραίτητα υλικά για την καλλιέργεια και την προκαταρκτική ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Τα θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να περιέχουν αμινοξέα, νουκλεοτίδια, πηγές άνθρακα και αζώτου, παράγοντες αύξησης, καθώς και ανόργανα ιόντα. Οι παραπάνω ουσίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων. Για την ανάπτυξη των βακτηρίων, απαιτούνται επίσης οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και pH μέσα στο περιβάλλον του θρεπτικού υποστρώματος. Τα περισ-

σότερα βακτήρια, αναπτύσσονται στη θερμοκρασία των 36-37°C, δηλαδή στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η χρήση του επωαστικού κλιβάνου, ο οποίος λειτουργεί συνεχώς στη συγκεκριμένη θερμοκρασία και μέσα στον οποίο τοποθετούνται τα εμβολιασμένα με το βακτήριο θρεπτικά υποστρώματα. Ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων στις καλλιέργειες, κυμαίνεται από 24-48 ώρες. Χαρακτηριστική εξαίρεση αποτελεί η καλλιέργεια του βακτηριδίου *Mycobacterium tuberculosis*, το οποίο αναπτύσσεται συνήθως μετά από 18-40 ημέρες. Η υγρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα ανάπτυξης για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Η θερμοκρασία του κλιβάνου, η οποία δρα στα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος, δημιουργεί την υγρασία που χρειάζονται οι διάφοροι μικροοργανισμοί για την ανάπτυξή τους. Το pH ενός θρεπτικού υποστρώματος, δηλαδή ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου, κυμαίνεται στα περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα από 7-7,6. Σε χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές pH, τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν. Και στην περίπτωση αυτή όμως, υπάρχουν εξαιρέσεις, όπως για παράδειγμα το *Vibrio cholerae* (Δονάκιο της χολέρας), το οποίο είναι ένα αλκαλόφιλο βακτήριο και χρειάζεται pH 8,5-9,5 για την ανάπτυξή του. **Πρέπει να σημειωθεί, ότι κατά την επώαση ενός υποστρώματος και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, το pH του μπορεί να αυξάνεται ή να ελαττώνεται, ανάλογα με τις βιοχημικές αντιδράσεις που διενεργούνται από τους μικροοργανισμούς. Κατά την παρασκευή και τη συντήρηση του υποστρώματος όμως, το pH θα πρέπει να διατηρείται σταθερό, με τη βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία προστίθενται ως συστατικά.**

Οι 3 βασικές ιδιότητες που πρέπει να διαθέτει ένα θρεπτικό υπόστρωμα είναι οι εξής:

- 1. Να περιέχει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά**
- 2. Να διαθέτει το κατάλληλο pH**
- 3. Να είναι αποστειρωμένο**

Κάθε θρεπτικό υπόστρωμα προορίζεται για την ανάπτυξη ενός ή περισσότερων μικροοργανισμών, άρα τα θρεπτικά συστατικά που περιέχει, πρέπει να είναι αυτά που χρειάζονται οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί. Για παράδειγμα, το υλικό Lowenstein-Jensen, το οποίο χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του βακτηριδίου *Mycobacterium tuberculosis*, πρέπει να περιέχει το αμινοξύ ασπαράγινη. Η ουσία αυτή είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου. Ως εκ τούτου η έλλειψή της από το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα, θα είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία καλλιέργειας του μικροοργανισμού αυτού.

Το pH αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα περισσότερα υποστρώματα, διαθέτουν pH μεταξύ

των τιμών 7-7,6. Στο συγκεκριμένο pH, αναπτύσσονται οι περισσότεροι μικροοργανισμοί. Υπάρχουν όμως οξεόφιλα βακτήρια, τα οποία απαιτούν pH <6, όπως και αλκαλόφιλα βακτήρια, τα οποία απαιτούν pH >8. Ο προσδιορισμός του pH ενός θρεπτικού υποστρώματος γίνεται με διάφορες μεθόδους. Μερικές από αυτές είναι:

1. Η σύγκριση του χρώματος του θρεπτικού υποστρώματος, με το χρώμα ενός διαλύματος γνωστού pH
2. Η χρησιμοποίηση pH-μετρικών ταινιών (sticks)
3. Η χρησιμοποίηση ηλεκτρικού pH-μέτρου

Η ρύθμιση του pH γίνεται πάντοτε πριν από την αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος, διότι διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσής του. Σε περίπτωση που το pH είναι χαμηλότερο από αυτό που πρέπει, τότε προστίθεται διάλυμα NaOH κανονικότητας N/10 στο θρεπτικό υπόστρωμα, μέχρις ότου αυτό ανέλθει στην επιθυμητή τιμή. Αντίστοιχα, εάν το pH είναι υψηλότερο από αυτό που πρέπει, τότε προστίθεται διάλυμα HCl κανονικότητας N/10, μέχρις ότου αυτό κατέλθει στην επιθυμητή τιμή. Φυσικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα διαλύματα οξέων ή βάσεων, για τη ρύθμιση του pH.

Τα παραπάνω ισχύουν για την παρασκευή ενός θρεπτικού υποστρώματος από τα επιμέρους συστατικά του, μέσα στο Μικροβιολογικό εργαστήριο. Σήμερα πλέον, τα θρεπτικά υποστρώματα έχουν τη μορφή σκόνης, στην οποία περιέχονται όλα τα συστατικά τους και το pH είναι ήδη ρυθμισμένο. Το μόνο που χρειάζεται είναι η διάλυση της σκόνης στο νερό, το οποίο πρέπει να είναι συνήθως ζεστό.

Η αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της καλλιέργειας. Το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι αποστειρωμένο μετά την παρασκευή του, έτσι ώστε να καλλιεργηθεί σ' αυτό μόνο ο υπεύθυνος παθογόνος μικροοργανισμός από ένα κλινικό δείγμα. Σε περίπτωση που το υπόστρωμα δεν είναι αποστειρωμένο, αλλά έχει επιμολυνθεί κατά την παρασκευή του από βακτήρια του περιβάλλοντος, τότε κατά τη διάρκεια της επώασης, τα βακτήρια που θα αναπτυχθούν σ' αυτό θα προέρχονται και από το περιβάλλον και από το κλινικό δείγμα που εμβολιάσθηκε. Ως εκ τούτου, το αποτέλεσμα της καλλιέργειας θα είναι ψευδές, με κίνδυνο να δοθεί λάθος αντιβιοτικό στον ασθενή.

Κατά την παρασκευή ενός θρεπτικού υποστρώματος, θα πρέπει να λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα αποστείρωσης, ούτως ώστε ο κίνδυνος επιμόλυνσης από βακτήρια του περιβάλλοντος, να εκμηδενισθεί. Για το λόγο αυτό, όλα τα σκεύη και εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του, όπως ογκομετρικοί κύλινδροι, κωνικές φιάλες κτλ., θα πρέπει να είναι ήδη αποστειρωμένα πριν από τη χρήση τους. Μετά την παρασκευή του υποστρώματος, ακολουθεί η αποστείρωσή του στο αυτόκαυστο. Επειδή τα θρεπτικά υποστρώματα αποτελούνται από ευπαθή χημικά συστατικά, ο κατάλληλος τρόπος αποστείρωσής τους είναι με τη βοήθεια



ατμού υπό πίεση. Αμέσως μετά την παρασκευή τους, τοποθετούνται στο αυτόκαυστο, οπότε αποστειρώνονται στους 121°C για 20-30 min, σε πίεση 1 atm.

Στον πίνακα 1.1, αναφέρεται η σχέση θερμοκρασίας και πίεσης, κατά την αποστείρωση στο αυτόκαυστο:

**Πίνακας 1.1.** Σχέση θερμοκρασίας και πίεσης, κατά την αποστείρωση στο αυτόκαυστο. Η συνηθισμένη πίεση που αναπτύσσεται στο αυτόκαυστο είναι 1 atm (15 lbs), η οποία αντιστοιχεί σε θερμοκρασία 121,5°C.

Πίεση σε lbs	Θερμοκρασία σε °C
0	100
5	109
10	115,5
<b>15</b>	<b>121,5</b>
20	126,5
30	134,6

Πολλά θρεπτικά υποστρώματα περιέχουν υδατάνθρακες, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στη θερμότητα, όπως είναι η γλυκόζη, η λακτόζη και η σουκρόζη. Αυτά τα υποστρώματα μπορούν να αποστειρωθούν στο αυτόκαυστο. Πρέπει να ληφθεί υπόψη όμως, ότι οι πολλαπλές αποστειρώσεις μπορούν να ελαττώσουν τη συγκέντρωση του υδατάνθρακα στο υπόστρωμα, να μεταβάλουν το χρώμα του και να αλλάξουν το pH του, που σημαίνει ότι το υλικό αυτό είναι πλέον ακατάλληλο για καλλιέργεια. Άρα, η αποστείρωση στο αυτόκαυστο θα πρέπει να γίνεται μόνο μία φορά. Σε περίπτωση που δεν γίνει σωστή αποστείρωση, θα πρέπει το υπόστρωμα να παρασκευασθεί ξανά και το παλιό να απορριφθεί.

Υπάρχουν υδατάνθρακες, οι οποίοι είναι ευπαθείς στη θερμοκρασία του αυτόκαυστου, όπως για παράδειγμα η ξυλόζη. Στην περίπτωση αυτή, αντί για το αυτόκαυστο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας άλλος τρόπος αποστείρωσης, η **διήθηση**. Κατά τη διήθηση, το διάλυμα που πρόκειται να αποστειρωθεί, διέρχεται μέσα από ένα ειδικό φίλτρο που διαθέτει πόρους, οι οποίοι έχουν αρκετά μικρό μέγεθος ώστε να συγκρατούν τα βακτήρια στην επιφάνεια του φίλτρου και ταυτόχρονα αρκετά μεγάλο μέγεθος, ώστε να επιτρέπουν στα μόρια του διαλύματος να διέλθουν από τους πόρους αυτούς. Η διήθηση χρησιμοποιείται επίσης και για την αποστείρωση άλλων ευπαθών διαλυμάτων, όπως ο ορός αίματος, το ασκιτικό υγρό, διαλύματα αντιβιοτικών κτλ. Η διήθηση, ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων που συγκρατούνται, χωρίζεται σε 3 κατηγορίες: 1. Απλή διήθηση, όταν τα σωματίδια που συγκρατούνται έχουν διάμετρο >10 μm. 2. Μικροδιήθηση, όταν τα σωματίδια που συγκρατούνται έχουν διάμετρο μεταξύ 0,02 μm και 10 μm. 3. Υπερ-

διήθηση, όταν τα σωματίδια που συγκρατούνται, έχουν διάμετρο  $<0,02 \mu\text{m}$ . Για την αποστείρωση υλικών που περιέχουν βακτήρια, το μέγεθος των πόρων πρέπει να είναι  $0,2 \mu\text{m}$ . Για την αποστείρωση υλικών που περιέχουν ιούς και μυκοπλάσματα, το μέγεθος των πόρων πρέπει να κυμαίνεται από  $0,01 \mu\text{m} - 0,1 \mu\text{m}$ . Οι ηθμοί με τη σειρά τους, ταξινομούνται σε 2 κατηγορίες: 1. Ηθμοί με μεμβράνες, οι οποίες διαθέτουν πόρους που συγκρατούν τα αντίστοιχα σωματίδια στην επιφάνειά τους. 2. Ηθμοί βάρους, οι οποίοι διαθέτουν σπογγώδη δομή. Η δομή αυτή επιτρέπει τη διέοδο των σωματιδίων μέσα στον ηθμό, ως ένα σημείο, χωρίς όμως να μπορούν να τον διαπεράσουν. Οι γνωστότεροι ηθμοί που κυκλοφορούν σήμερα, είναι οι ηθμοί Whatman. Η αποστείρωση είναι επιτυχής, όταν ο ηθμός μπορεί να συγκρατήσει το 100% των βακτηριδίων *Pseudomonas diminuta* ( $10^7$  βακτηρίδια/ $\text{cm}^2$  επιφάνειας ηθμού), τα οποία πιέζονται επάνω σ' αυτόν, με πίεση 30 psi.

Μετά την αποστείρωση ενός θρεπτικού υποστρώματος, είτε με το αυτόκαυστο, είτε με διήθηση, θα πρέπει να γίνει ο έλεγχος της αποστείρωσης, δηλαδή να εξακριβωθεί κατά πόσο αυτή ήταν επιτυχημένη. Για το σκοπό αυτό, το υπόστρωμα αμέσως μετά την αποστείρωσή του, διαμοιράζεται είτε σε σωληνάρια, είτε σε τρυβλία Petri, τα οποία τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, στους  $37^\circ\text{C}$  για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, γίνεται έλεγχος των υποστρωμάτων. Σε περίπτωση που δεν έχουν αναπτυχθεί μικροοργανισμοί, το υλικό είναι αποστειρωμένο και έτοιμο για χρήση. Η καλλιέργεια μπορεί να ξεκινήσει άμεσα, με εμβολιασμό του παθολογικού υλικού ή απώτερα, οπότε το υπόστρωμα τοποθετείται στο ψυγείο στους  $4^\circ\text{C}$ , έως ότου χρησιμοποιηθεί. Σε περίπτωση όμως που έχουν αναπτυχθεί βακτήρια στο υπόστρωμα, τότε η αποστείρωση ήταν ελλιπής. Έτσι, θα πρέπει να παρασκευασθεί νέο θρεπτικό υπόστρωμα και το παλιό να απορριφθεί, ως ακατάλληλο για καλλιέργεια. Παρακάτω περιγράφονται δύο ακόμη τρόποι ελέγχου της αποστείρωσης των θρεπτικών υποστρωμάτων:

**1. Βιολογικοί δείκτες:** Αποτελούν την πιο αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου της αποστείρωσης. Χρησιμοποιούνται σπόροι μη παθογόνων βακτηριδίων, τα οποία είναι όμως πολύ ανθεκτικά στις διάφορες μεθόδους αποστείρωσης. Για τον ξηρό κλίβανο, χρησιμοποιούνται οι σπόροι του βακτηριδίου *Bacillus subtilis* var. *niger*, για το αυτόκαυστο, οι σπόροι του βακτηριδίου *Bacillus stearothermophilus* και για τον κλίβανο οξειδίου του αιθυλενίου, οι σπόροι του βακτηριδίου *Bacillus subtilis* var. *globigii*. Οι σπόροι βρίσκονται σε ειδικό φιαλίδιο, το οποίο περιέχει θρεπτικό ζωμό, γλυκόζη και μία χρωστική ουσία που αλλάζει χρώμα, όταν αυτοί αναπτύσσονται. Το φιαλίδιο τοποθετείται μαζί με τα προς αποστείρωση υλικά, μέσα στον αντίστοιχο κλίβανο. Μετά την αποστείρωση, διενεργείται επώαση του φιαλιδίου που περιέχει τους σπόρους, στους  $60^\circ\text{C}$  για 24-48 ώρες. Σε περίπτωση που το χρώμα του υλικού παραμείνει το ίδιο, σημαίνει ότι η αποστείρωση ήταν επιτυχής, αφού δεν έχουν αναπτυχθεί οι σπόροι. Σε περίπτωση που το χρώμα του υλικού αλλάξει, σημαίνει



**Εικ. 1.2.** Βιολογικοί δείκτες αποστείρωσης. Το μωβ χρώμα, που είναι και το αρχικό, δείχνει ότι η αποστείρωση ήταν επιτυχής. Το κίτρινο χρώμα, δείχνει ότι η αποστείρωση ήταν ανεπιτυχής, αφού ο σπόρος αναπτύχθηκε μετά την επώαση του φιαλιδίου και προκάλεσε την αλλαγή του χρώματος.

ότι η αποστείρωση ήταν ανεπιτυχής, αφού οι σπόροι κατάφεραν να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν τα αντίστοιχα βακτηρίδια. Ένα δείγμα του υλικού μπορεί επίσης να αποσταλεί σε ειδικά κέντρα, στα οποία γίνεται καλλιέργεια και εξαγωγή αποτελεσμάτων. Ο έλεγχος με βιολογικούς δείκτες, πρέπει να διενεργείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα για τον κάθε κλίβανο (Εικ. 1.2).

**2. Χημικοί δείκτες:** Κυκλοφορούν με τη μορφή ταινιών, οι οποίες φέρουν ειδικές χημικές ουσίες στην επιφάνειά τους. Οι ουσίες αυτές έχουν την ικανότητα να αλλάζουν χρώμα, με τις μεταβολές της πίεσης, της θερμοκρασίας, του χρόνου, ξεχωριστά ή σε συνδυασμό. Έτσι, οι ταινίες τοποθετούνται μέσα στον κλίβανο και αποτελούν δείκτες επιτυχούς ή ανεπιτυχούς αποστείρωσης, ανάλογα με το χρώμα που θα αποκτήσουν μετά την αποστείρωση. Χρησιμοποιούνται κυρίως στο αυτόκαυστο και στους κλιβάνους οξειδίου του αιθυλενίου (Εικ. 1.3).

Τα θρεπτικά υποστρώματα, ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση χωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

- 1. Υγρά**
- 2. Στερεά**
- 3. Ημίρρευστα**

Στα υγρά θρεπτικά υποστρώματα δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σ' αυτά δημιουργώντας θόλωση του διαλύματος, το οποίο πριν από τον εμβολιασμό είναι διαυγές. Στα υποστρώματα αυτά μπορούν να μελετηθούν διάφοροι βιολογικοί και βιοχημικοί χαρακτήρες των



**Εικ. 1.3.** Χημικοί δείκτες αποστείρωσης. Μετά από επιτυχή αποστείρωση, το χρώμα που είναι εμποτισμένο στην ταινία, αλλάζει. Σε περίπτωση που παραμένει ίδιο, σημαίνει ότι η αποστείρωση ήταν ανεπιτυχής.

βακτηρίων, όπως η κίνηση, η παραγωγή ινδόλης, η διάσπαση υδατανθράκων κτλ. Οι παραπάνω δοκιμασίες καθίστανται εμφανείς, συνήθως με την αλλαγή του αρχικού χρώματος του υποστρώματος. Στα υγρά υποστρώματα, καλλιεργούνται παθολογικά υλικά, τα οποία δεν καλλιεργούνται εύκολα στα στερεά υποστρώματα, όπως αίμα, ιστοί, γάζες κτλ. Τα συγκεκριμένα παθολογικά υλικά πρέπει να καλυφθούν σε όλη τους την επιφάνεια από το υπόστρωμα, έτσι ώστε το αποτέλεσμα της καλλιέργειας να είναι όσο το δυνατόν αξιόπιστο. Αυτό δεν μπορεί να συμβεί στα στερεά υποστρώματα. Ως εκ τούτου, τα παραπάνω παθολογικά υλικά πρέπει

να τοποθετούνται ολόκληρα μέσα στα υγρά υποστρώματα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα υγρά υποστρώματα είναι εμφανής με τη θόλωσή τους, αμέσως μετά την επώαση ή με την αλλαγή του χρώματός τους, προσθέτοντας ειδικά αντιδραστήρια μετά την επώαση.

Τα υγρά υποστρώματα, διαχωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

- Φυσικά (αίμα, ορός αίματος, ασκτικό υγρό, γάλα)
- Ζωικά (ζυμός κρέατος, πεπτονούχο νερό)
- Φυτικά (εκχυλίσματα και αφεψήματα φυτών)



**Εικ. 1.4.** Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, τοποθετημένο σε δοκιμαστικό σωλήνα.

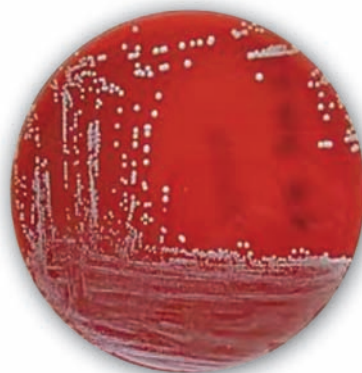
Τα υλικά αυτά, τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες μετά την αποστείρωσή τους (Εικ. 1.4).

Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποι-

ούνται για την απομόνωση των μικροοργανισμών, με σκοπό την ταυτοποίησή τους στη συνέχεια, με βιοχημικές και ορολογικές δοκιμασίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, περιέχουν **άγαρ**. Το άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος προέρχεται από εκχύλισμα κόκκινων φυκών της θάλασσας, κυρίως από τα γένη *Gelidium* και *Gracilaria*. Αποτελείται χημικά από ένα μείγμα αγαρόζης και αγαροπηκτίνης. Έχει την ιδιότητα να τήκεται στους 100°C και να στερεοποιείται στους 40-45°C. Στα υποστρώματα αυτά, οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν **αποικίες**, οι οποίες είναι ορατές με γυμνό μάτι. Κάθε αποικία προέρχεται από ένα και μόνο μικροοργανισμό και περιέχει εκατομμύρια μικροοργανισμούς. Η μορφολογία των αποικιών των διαφόρων μικροοργανισμών ποικίλλει, με αποτέλεσμα καθένας τους, να δημιουργεί αποικίες χαρακτηριστικής μορφής στα στερεά υποστρώματα. Οι αποικίες των μικροοργανισμών διακρίνονται από το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα τους. Το σχήμα τους είναι συνήθως κυκλικό, ενώ μπορεί να έχουν και ανώμαλα σχήματα, ιδίως όταν καλλιεργούνται μύκητες. Το μέγεθός τους ποικίλλει από ελάχιστα ορατό με το γυμνό μάτι (μέγεθος κεφαλής καρφίτσας), έως αρκετά μεγάλο, που καλύπτει τη μεγαλύτερη επιφάνεια του υποστρώματος (αποικίες μυκήτων). Οι αποικίες, μπορεί να είναι επίπεδες, υπερψωμένες, κυρτές ή να εμφανίζουν θηλές. Ορισμένα βακτήρια δημιουργούν αποικίες, από τις οποίες αναδύεται χαρακτηριστική οσμή (π.χ. *Pseudomonas aeruginosa* – γιασεμί, *Proteus mirabilis* – καμμένη σοκολάτα, *Streptococcus milleri* – καραμέλα, *Eikenella corrodens* – χλωρίνη). Ο αριθμός των αποικιών χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε υγρά παθολογικά υλικά (Colony forming units – cfu/mL υγρού). Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα τοποθετούνται σε τρυβλία Petri ή σε δοκιμαστικούς σωλήνες (Εικ. 1.5, 1.6).



**Εικ. 1.5.** Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανεμβολίαστο μέσα σε τρυβλίο Petri.



**Εικ. 1.6.** Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα εμβολιασμένο μέσα σε τρυβλίο Petri. Φαίνονται οι λευκές αποικίες των βακτηρίων.



**Εικ. 1.7.** Ημίρρευστο υπόστρωμα μεταφοράς Stuart.

Τα ημίρρευστα θρεπτικά υποστρώματα αποτελούν μία ενδιάμεση κατηγορία μεταξύ των υγρών και των στερεών υποστρωμάτων. Περιέχουν μικρότερη ποσότητα άγαρ σε σχέση με τα στερεά υποστρώματα. Χρησιμοποιούνται κυρίως ως υλικά συντήρησης των μικροοργανισμών, όταν χρειάζεται να μεταφερθούν σε μεγάλη απόσταση έως ότου καλλιεργηθούν. Τέτοιο υπόστρωμα αποτελεί το υλικό μεταφοράς Stuart (Εικ. 1.7).

Τα θρεπτικά υποστρώματα, ανάλογα με τις ουσίες που περιέχουν και τη χρησιμότητά τους, χωρίζονται σε 2 κατηγορίες:

- 1. Βασικά**
- 2. Ειδικά**

Τα βασικά θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται ως βάση για την παρασκευή των ειδικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Στα υποστρώματα αυτά αναπτύσσονται τα περισσότερα βακτήρια και αρκετοί μύκητες. Άρα, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, παρά μόνο για την ανάδειξη της ύπαρξής τους σε ένα παθολογικό υλικό.

Τα ειδικά θρεπτικά υποστρώματα, είναι κατά βάση στερεά, προάγουν την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων ή/και αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων που μπορεί να υπάρχουν σε ένα παθολογικό υλικό. Τα υποστρώματα αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, αφού κατά την ανάπτυξή τους, τα υλικά μπορεί να αλλάξουν χρώμα. Στα υλικά αυτά, σχηματίζονται αποικίες συγκεκριμένου χρώματος, μεγέθους και σύστασης. Χωρίζονται σε 5 κατηγορίες:

- 1. Εμπλουτισμένα**
- 2. Εκλεκτικά**
- 3. Διαφοροποιητικά**
- 4. Ανασταλτικά**
- 5. Θρεπτικά υποστρώματα συντήρησης του δείγματος**

**Εμπλουτισμένα** θρεπτικά υποστρώματα είναι αυτά, στα οποία με την προσθήκη κατάλληλων ουσιών, προάγεται η ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων. Παράδειγμα εμπλουτισμένου υποστρώματος αποτελεί το αιματούχο άγαρ, στο οποίο προστίθεται αίμα σε θρεπτικό άγαρ και έτσι, προάγεται η ανάπτυξη των Gram (+) κόκκων.

**Εκλεκτικά** θρεπτικά υποστρώματα είναι αυτά, στα οποία προάγεται η ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων ή μυκήτων. Παράδειγμα εκλεκτικού υποστρώ-

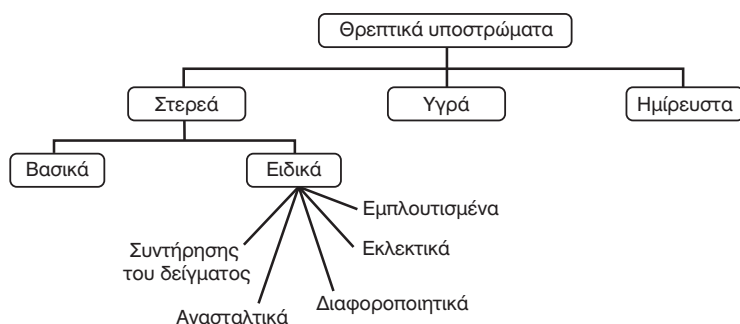
ματος αποτελεί ο πηγμένος ορός του Loeffler, για την καλλιέργεια του βακτηριδίου *Corynebacterium diphtheriae*.

**Διαφοροποιητικά** θρεπτικά υποστρώματα είναι αυτά, τα οποία περιέχουν υδατάνθρακες και δείκτες. Ο δείκτης είναι μία ουσία που προσδίδει χρώμα στο υπόστρωμα και έχει την ιδιότητα να αλλάζει το χρώμα του, ανάλογα με το pH που δημιουργείται κατά την ανάπτυξη ενός βακτηρίου. Έτσι λοιπόν, μετά την ανάπτυξη ενός βακτηρίου, το υπόστρωμα, μπορεί να έχει διαφορετικό χρώμα από το αρχικό. Η αλλαγή του pH οφείλεται κυρίως στη διάσπαση των υδατανθράκων ή των αμινοξέων του υποστρώματος από τα βακτήρια που αναπτύσσονται σ' αυτό. Παράδειγμα διαφοροποιητικού θρεπτικού υποστρώματος αποτελεί το MacConkey agar, το οποίο περιέχει τον υδατάνθρακα λακτόζη και το δείκτη ουδέτερο ερυθρό, οπότε προάγεται η ανάπτυξη των Gram (-) βακτηριδίων. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα στα θρεπτικά υποστρώματα, είναι το ερυθρό του μεθυλίου, το ερυθρό της φαινόλης, το ουδέτερο ερυθρό, το κυανό της βρωμοθυμόλης, το πορφυρό της βρωμοκρεσόλης και το πράσινο του μεθυλίου.

**Ανασταλτικά** θρεπτικά υποστρώματα είναι αυτά, τα οποία περιέχουν ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη αρκετών βακτηρίων, επιτρέποντας την ανάπτυξη ορισμένων από αυτά. Παράδειγμα ανασταλτικού υποστρώματος αποτελεί το Lowenstein-Jensen, το οποίο περιέχει το δείκτη πράσινο του μαλαχίτη. Η χρωστική αυτή αναστέλλει την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων, εκτός από το *Mycobacterium tuberculosis*, το οποίο αναπτύσσεται κανονικά.

**Θρεπτικά υποστρώματα συντήρησης του δείγματος** είναι αυτά, στα οποία τα βακτήρια διατηρούνται στη ζωή, χωρίς να πολλαπλασιάζονται, διότι δεν περιέχουν θρεπτικά συστατικά, παρά μόνο ανόργανες ουσίες και δείκτες. Χρησιμεύουν για τη μεταφορά του παθολογικού υλικού σε μεγάλη απόσταση, ώστε να μην καταστραφούν τα βακτήρια και να καλλιεργηθούν με ασφάλεια στα ανάλογα θρεπτικά υποστρώματα. Παράδειγμα τέτοιου υποστρώματος αποτελεί το υλικό μεταφοράς Stuart.

Στην εικόνα 1.8 συνοψίζονται οι διάφορες κατηγορίες των θρεπτικών υποστρωμάτων:



**Εικ. 1.8.** Οι διάφορες κατηγορίες των θρεπτικών υποστρωμάτων.

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Τα θρεπτικά υποστρώματα, παρέχονται από τις φαρμακευτικές εταιρείες και φέρονται μέσα σε ειδικά πλαστικά δοχεία, υπό μορφή σκόνης. Σήμερα, πολλές φαρμακευτικές εταιρείες παρασκευάζουν τα θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία διανέμουν έτοιμα στα μικροβιολογικά εργαστήρια, είτε μέσα σε τρυβλία Petri, είτε μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οπότε χρειάζονται μόνο συντήρηση στο ψυγείο. Και στις 2 περιπτώσεις, πρέπει να πληρούνται ορισμένες προδιαγραφές, έτσι ώστε τα υποστρώματα να είναι κατάλληλα για την καλλιέργεια των διαφόρων μικροοργανισμών. Αυτές είναι:

- Η εταιρία παραγωγής θα πρέπει να είναι πιστοποιημένη σύμφωνα με το πρότυπο ISO 9001:2000.
- Τα υποστρώματα που περιέχουν συστατικά κρέατος, θα πρέπει να συνοδεύονται κατά την παράδοσή τους από πιστοποιητικό απαλλαγής από την νόσο της σπογγιόμορφης εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (Bovine Spongiform Encephalopathy – BSE) ή ότι οι πρώτες ύλες τους προέρχονται από χώρες απαλλαγμένες από την νόσο BSE.
- Τα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα θα πρέπει να συνοδεύονται από πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου, στο οποίο να περιλαμβάνονται τα φυσικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Επίσης, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται η επίδοση του υποστρώματος, με τουλάχιστον 2 θετικά και 2 αρνητικά στελέχη μικροοργανισμών, κατά προτίμηση σε μεικτές καλλιέργειες (θετικών και αρνητικών μαρτύρων), καθώς και σε μονοκαλλιέργεια, εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό στις παρατηρήσεις της προδιαγραφής του υλικού.
- Τα έτοιμα προς χρήση υποστρώματα θα πρέπει να είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές που περιλαμβάνονται στα πρότυπα ISO / TS 11133-1 και 11133-2.

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Η παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων είναι μία διαδικασία, η οποία απαιτεί μεγάλη προσοχή σε κάθε βήμα της, έτσι ώστε το υπόστρωμα που θα δημιουργηθεί να είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών.

Τα σκεύη και τα υλικά που χρειάζονται είναι:

- Κωνική φιάλη ή ποτήρι ζέσεως
- Γυάλινος αναδευτήρας
- Η σκόνη του θρεπτικού υποστρώματος ή τα επιμέρους συστατικά του
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Απεσταγμένο νερό
- Θερμαντική πηγή



- Δοκιμαστικοί σωλήνες ή τρυβλία Petri
- Επωαστικός κλίβανος
- Αυτόκαυστο ή φίλτρα διήθησης

Όλα τα γυάλινα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του υποστρώματος, πρέπει να είναι αποστειρωμένα, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Το νερό που θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για τη σκόνη ή για τα διάφορα συστατικά του υποστρώματος, θα πρέπει να είναι πάντοτε αποστειρωμένο και απεσταγμένο. Απεσταγμένο είναι το νερό, από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα διάφορα θετικά και αρνητικά ιόντα, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την τελική σύσταση του διαλύματος. Πριν από την παρασκευή του υποστρώματος, θα πρέπει να γίνει προσεκτική ανάγνωση των οδηγιών που αναγράφονται στη συσκευασία του. Εκεί αναφέρονται, εκτός των άλλων, και οι κατάλληλες αναλογίες της σκόνης που πρέπει να διαλυθεί μέσα στο απεσταγμένο νερό. Ανάλογα με τον όγκο του διαλύματος που χρειάζεται να παρασκευασθεί, ζυγίζεται και η αντίστοιχη ποσότητα σκόνης ή επιμέρους συστατικών, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού ζυγού.

Αρχικά, τοποθετείται ο κατάλληλος όγκος απεσταγμένου νερού μέσα στο σκεύος παρασκευής (κωνική φιάλη ή ποτήρι ζέσεως), με τη βοήθεια του ογκομετρικού κυλίνδρου. Στη συνέχεια, ζυγίζονται με ακρίβεια τα διάφορα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος και τοποθετούνται μέσα στο δοχείο παρασκευής.

Ακολουθεί η θέρμανση του διαλύματος, κάτω από θερμαντική πηγή και η συνεχής ανάδεδυσή του, έτσι ώστε η σκόνη να διαλυθεί πολύ καλά μέσα στο νερό, χωρίς να υπάρχουν καθιζήματα ή κόκκοι που να επιπλέουν. Η θέρμανση διαρκεί μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές ή να αρχίσει να βράζει, οπότε απομακρύνεται από τη θερμαντική πηγή και αφήνεται να κρυώσει, εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό στις οδηγίες παρασκευής.

Εάν το θρεπτικό υπόστρωμα είναι υγρό, τοποθετείται μετά από λίγη ώρα στους δοκιμαστικούς σωλήνες, μέχρι το 1/3 ή το 1/2 του όγκου τους. Στη συνέχεια, οι σωλήνες πωματίζονται με ανυδρόφιλο βαμβάκι και τοποθετούνται στο αυτόκαυστο για αποστείρωση. Μετά την αποστείρωση, οι σωλήνες μπορούν να τοποθετηθούν στο ψυγείο για λίγες ημέρες, έτσι ώστε να συντηρηθούν, έως ότου εμβολιασθούν με παθολογικό υλικό.

Εάν το θρεπτικό υπόστρωμα είναι στερεό, δηλαδή περιέχει άγαρ, η διαδικασία είναι διαφορετική. Καθώς η σκόνη διαλύεται στο ζεστό νερό στη θερμοκρασία των 100°C, το άγαρ λιώνει. Όταν η θερμοκρασία του υποστρώματος κατέλθει στους 40-45°C, το άγαρ στερεοποιείται, οπότε το υλικό παίρνει τη μορφή πηκτής. Για το λόγο αυτό, μετά την απομάκρυνση του δοχείου από τη θερμαντική πηγή, το υπόστρωμα θα πρέπει να τοποθετηθεί στους δοκιμαστικούς σωλήνες ή στα τρυβλία Petri, όταν η θερμοκρασία του κατέλθει γύρω στους 50°C, ώστε αυτό να μην προλάβει να πήξει μέσα στο δοχείο παρασκευής. Η θερμοκρασία αυτή μετράται πρα-

κτικά, τοποθετώντας το δοχείο παρασκευής στην παλάμη, οπότε εάν η θερμότητα είναι καλά ανεκτή από το χέρι, η θερμοκρασία βρίσκεται γύρω στους 50°C. Υπάρχουν βέβαια διαφορές από άτομο σε άτομο, όσον αφορά την αίσθηση της θερμοκρασίας. Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί θερμόμετρο για τη μέτρηση της θερμοκρασίας του υποστρώματος, διότι θα επιμολύνει το διάλυμα. Επίσης, το στερεό υπόστρωμα δεν πρέπει να τοποθετείται αμέσως μετά την απομάκρυνσή του από τη θερμαντική πηγή στο τρυβλίο Petri, διότι αυτό αποτελείται από λεπτό πλαστικό υλικό, το οποίο μπορεί να λιώσει από τη μεγάλη θερμοκρασία του διαλύματος.



**Εικ. 1.9.** Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος έχει τοποθετηθεί σε κεκλιμένη θέση πριν την πήξη του υλικού, έτσι ώστε να δημιουργηθεί μεγάλη διαγώνια επιφάνεια για να εμβολιασθεί το παθολογικό υλικό.

Χρειάζεται προσοχή, διότι, εάν η θερμοκρασία κατέλθει περισσότερο, το άγαρ που περιέχεται στο δοχείο θα πήξει, και το υλικό δεν θα είναι δυνατό να τοποθετηθεί στα τρυβλία. Το υπόστρωμα θα πρέπει να γεμίσει περίπου το 1/3-1/2 του όγκου του τρυβλίου και όχι περισσότερο. Αφότου τοποθετηθεί το υπόστρωμα, το οποίο είναι ακόμη αρκετά ζεστό, το τρυβλίο αφήνεται με το καπάκι μισάνοιχτο, έτσι ώστε να μη δημιουργούνται αρκετοί υδρατμοί, οι οποίοι πέφτοντας στην επιφάνειά του, μπορεί να αλλοιώσουν τη σύστασή του (Εικ. 1.10). Αφότου το υλικό κρυώσει, τα τρυβλία κλείνονται και τοποθετούνται με το καπάκι προς τα κάτω, μέσα στο ψυγείο, έως ότου χρειασθεί να εμβολιασθούν. Χρειάζεται προσοχή κατά την τοποθέτηση

Σε περίπτωση που το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετηθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες, το στόμιό τους καλύπτεται με ανυδρόφιλο βαμβάκι και αυτοί τοποθετούνται στο αυτόκαυστο για αποστείρωση. Μετά την αποστείρωση, το υλικό είναι υγρό, λόγω της μεγάλης θερμοκρασίας. Οι σωλήνες θα πρέπει να τοποθετηθούν σε κεκλιμένη θέση, έτσι ώστε μετά την πήξη του υλικού (λόγω της καθόδου της θερμοκρασίας), να δημιουργηθεί μεγάλη διαγώνια επιφάνεια για τον εμβολιασμό του παθολογικού υλικού (Εικ. 1.9). Μετά την πήξη του υποστρώματος, οι σωλήνες μπορούν να τοποθετηθούν στο ψυγείο, μέσα σε ειδικά καλάθια ή σε στατώ, ώστε να συντηρηθούν μέχρι τον εμβολιασμό τους.

Εάν το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετηθεί σε τρυβλία Petri, αυτό θα πρέπει γίνει μετά την αποστείρωση στο αυτόκαυστο, όταν η θερμοκρασία του δοχείου παρασκευής κατέλθει γύρω στους 50°C.