

Άσκηση 1: Αποστείρωση, Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Αποστείρωση ονομάζεται η θανάτωση ή η απομάκρυνση όλων των οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των ιών αλλά και κάποιων σπορίων.

Μέθοδοι για αποστείρωση

1. Θέρμανση: ο πιο διαδεδομένος τρόπος αποστείρωσης, όταν δεν υπάρχει πρόβλημα καταστροφής του υλικού από τις υψηλές θερμοκρασίες
2. χημική αποστείρωση με αέρια: θερμοευαίσθητα υλικά
3. διήθηση από φίλτρα: για θερμοευαίσθητα υγρά
4. ακτινοβολία: συνήθως χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (βιομηχανική κλίμακα → σύριγγες, tips κ.α.)

Σε αυτή την άσκηση θα χρησιμοποιηθεί αποστείρωση με θερμότητα. Η θερμότητα είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την αύξηση και την βιωσιμότητα των μικροοργανισμών.

A. Αποστείρωση με υγρή θερμότητα

Η υγρή θερμότητα νεκρώνει του μικροοργανισμούς κυρίως λόγω της κροκίδωσης των πρωτεϊνών που προκαλείται από τη γεφύρωση των δεσμών υδρογόνου. Το πιο γνωστό είδος αποστείρωσης με υγρή θερμότητα είναι το βράσιμο (100 °C, στην επιφάνεια της θάλασσας) το οποίο νεκρώνει τις περισσότερες (αλλά όχι όλες) βλαστητικές μορφές των βακτηρίων, πολλούς ιούς, μύκητες και τα σπόριά τους σε 10 λεπτά.

Μία αποδοτική αποστείρωση με υγρή θερμότητα απαιτεί $T > 100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Για να επιτευχθούν αυτές οι θερμοκρασίες χρησιμοποιείται ατμός υπό πίεση μέσα σε αυτόκαυστο.

Οι συνθήκες που απαιτούνται για πλήρη αποστείρωση είναι 1) 121 °C για 15 min ή 2) 116 °C για 20 min. Οι συνθήκες αυτές αντιστοιχούν σε 1) 15 lb/in² και σε 2) 10 lb/in² αντίστοιχα.

Ο χρόνος αποστείρωσης αρχίζει να μετράται από την στιγμή σταθεροποίησης της θερμοκρασίας.

B. Αποστείρωση με ξηρή θερμότητα

Η ξηρή θερμότητα επιδρά με την διαδικασία της οξείδωσης. Η πιο απλή μέθοδος είναι η χρήση λύχνου Bunsen (για κρίκους εμβολιασμού, γυάλινες πιπέτες κ.α.). Σημάδι για την επιτυχή αποστείρωση είναι η ερυθροπύρωση.

Άλλη μέθοδος είναι η χρήση κλίβανου στους 170 °C για περίπου 2 ώρες.

Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Καλλιέργεια μικροοργανισμών ονομάζεται η ελεγχόμενη ανάπτυξη τους σε τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα. Θρεπτικό υπόστρωμα είναι το υλικό που παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών με τη μορφή τροφής. Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να περιέχουν: νερό, **πηγή άνθρακα, αζώτου και μακροτροφικά στοιχεία (P, S, K, Na, Mg) αλλά και μικροτροφικές ουσίες όπως ιχνοστοιχεία.**

Τα υγρά θρεπτικά μπορούν να μετατραπούν σε στερεά με την προσθήκη άγαρ σε ποσοστό 1%-2%. Το άγαρ διαλύεται στο θρεπτικό μέσο με θέρμανση μέχρι το σημείο βρασμού. Το άγαρ είναι ένας σύνθετος πολυσακχαρίτης που προέρχεται από θαλάσσια Φύκη, κυρίως Ροδοφύκη (*Gracilaria*, *Gelidiaceae*). Ρευστοποιείται στους 90-98 °C αλλά περιμένει υγρό όσο ψύχεται μέχρι να φτάσει στους 40 °C. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει την ανάμειξη με μικροοργανισμούς χωρίς να τους καταστρέφει.

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά

Θρεπτικό υπόστρωμα σε σκόνη (Yeast extract)

Κωνική φιάλη 250 ml

Απεσταγμένο νερό

Έτοιμο τρυβλίο με Yeast extract

1. Ζυγίστε την απαραίτητη ποσότητα θρεπτικού υλικού (σύμφωνα με τις οδηγίες στη συσκευασία) για την Παρασκευή 100 ml θρεπτικού υλικού.
2. Ογκομετρήστε 100 ml απεσταγμένου νερού και μεταφέρετε μικρή ποσότητα στην κωνική σας. Στη συνέχεια μεταφέρετε και τη σκόνη που ζυγίσατε στην κωνική και συμπληρώστε με το υπόλοιπο απεσταγμένο
3. Προσθέστε μαγνητικό αναδευτήρα και πωματίστε
4. Θερμάνετε σε θερμαντική εστία μέχρι να διαυγάσει και απομακρύνετε για να κρυώσει
5. Διαμοιράστε σε τρυβλία petri στα οποία έχετε γράψει από πριν το είδος του θρεπτικού την ημερομηνία και το όνομα σας.
6. Αφού κρυώσει το θρεπτικό (πήξει), γυρίστε το τρυβλίο ανάποδα και χωρίστε το με μαρκαδόρο στα δύο. Σημάνετε τα κομμάτια που προέκυψαν με Κ (καθαρό) και Β (Βρώμικο)
7. Ακουμπήστε απαλά το δάχτυλο σας στο κομμάτι Β σχηματίζοντας ένα S. Επαναλάβετε τη διαδικασία αφού έχετε πλύνει τα χέρια σας.
8. Επωάστε τα τρυβλία για 48 h στους 37 °C
9. Σε ποιο κομμάτι αναπτύχθηκαν περισσότερες αποικίες; Γιατί πιστεύετε ότι συνέβη αυτό;