

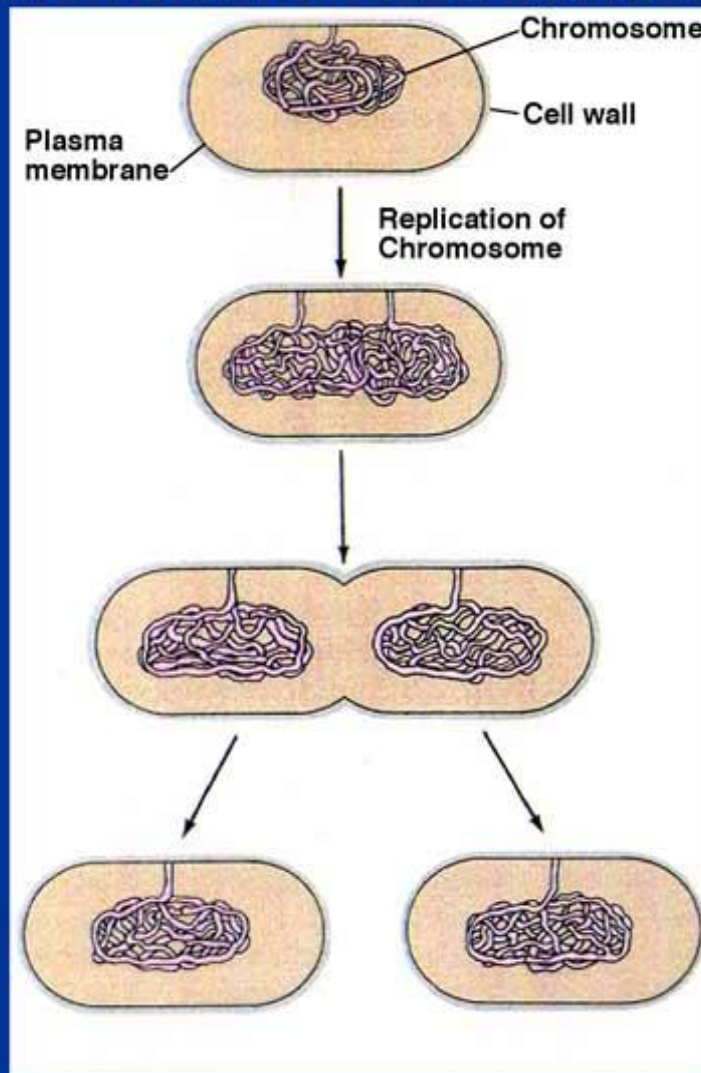
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ Η ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ

ΓΕΝΙΚΑ

- Κύρια λειτουργία κάθε μικροβιακού κυττάρου είναι η **ανάπτυξη**. Ανάπτυξη είναι η ΤΑΚΤΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗ μάζας ή αριθμού όλων των συστατικών του κυττάρου.
- Συνηθισμένη αλλά όχι μοναδική συνέπεια της ανάπτυξης είναι ο πολλαπλασιασμός (υπάρχουν περιπτώσεις που δημιουργούνται «κοινοκύτταρα» μετά από συνεχείς πυρηνικές διαιρέσεις)

BACTERIAL CELL DIVISION



ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΑΙ ΑΡΧΕΣ

Καλλιέργεια είναι η διεργασία της ανάπτυξης των οργανισμών με την παροχή των κατάλληλων συνθηκών (θρεπτικά συστατικά, pH, θερμοκρασία και αερισμός)



ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΑΙ ΑΡΧΕΣ

- Ανάπτυξη-αύξηση είναι η μεγέθυνση της μάζας μέρους ή όλου του ζωντανού οργανισμού μέσω της σύνθεσης μακρομορίων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι συνέπεια της ανάπτυξης.
- Μεταβολισμός είναι το σύνολο των χημικών αντιδράσεων που γίνονται μέσα στο κύτταρο και σχηματικά διαιρούνται σε αναβολικές και καταβολικές

ΑΥΞΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΑΝΩΤΕΡΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

- Προϋποθέτει τη διαφοροποίηση, δηλαδή **ελεγχόμενη, κατευθυνόμενη** αύξηση της ύλης μετά από συσσώρευση υλικών.

ΑΥΞΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

- Για τους μικροοργανισμούς η σύνθεση και η δομή επηρεάζονται από το περιβάλλον (π.χ. συγκέντρωση των υποστρωμάτων)
- Η εκθετική αύξηση γενικά βρίσκει εφαρμογή σε όλους τους μονοκύτταρους μικροοργανισμούς
- Θα μελετήσουμε δύο διαφορετικά συστήματα αύξησης: τα **κλειστά** και τα **ανοικτά ή συνεχή**
- Τα συστήματα προσπαθούν να προσομοιάσουν τις συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος, ωστόσο οι αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών καθώς και οι σχέσεις πληθυσμών δεν μπορούν να εκτιμηθούν.

ΑΥΞΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

- Βιομάζα (μικροβιακή μάζα)
- Ρυθμός αύξησης (περιέχει την έννοια του χρόνου)
- Χρόνος γενιάς: χρονικό διάστημα για την παραγωγή δύο κυττάρων από ένα

ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (BATCH)

- Βρισκόμαστε σε περιβάλλον το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά.
- Ο οργανισμός θα τα χρησιμοποιήσει για να αυξηθεί σε βιομάζα, στη συνέχεια σε μέγεθος και τέλος θα διπλασιασθεί δίνοντας δύο άτομα.
- Αυτό επαναλαμβάνεται με τους δύο νέους οργανισμούς που δίνουν τέσσερις κ.ο.κ.
- Κάνουμε κάποιες παραδοχές (τα θρεπτικά σε ποσότητες μη περιοριστικές ή περιοριστικές, σταθερές οι συνθήκες του περιβάλλοντος ή μεταβαλλόμενες κλπ)

ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (BATCH) – ΜΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

- 1η προσέγγιση: ξεκινάμε από έναν πληθυσμό χ ατόμων, τα οποία εμβολιάζουμε στο κλειστό περιβάλλον με **προσχηματισμένα** πρόδρομα των βιομορίων.

Μετά από χρονική περίοδο ίσης με το χρόνο γενιάς ο αριθμός των οργανισμών που απαρτίζουν τον υπό μελέτη πληθυσμό διπλασιάζεται.

Ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστεί το μέγεθος του πληθυσμού ονομάζεται χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας

ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (BATCH) – ΜΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

- Η μαθηματική σχέση που εκφράζει αυτή την προσέγγιση είναι:

$$x_t = x_0 \cdot 2^{t/t_d}$$

x_t = μέγεθος πληθυσμού μετά χρόνο t

x_0 = μέγεθος αρχικού πληθυσμού

T_d = χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας

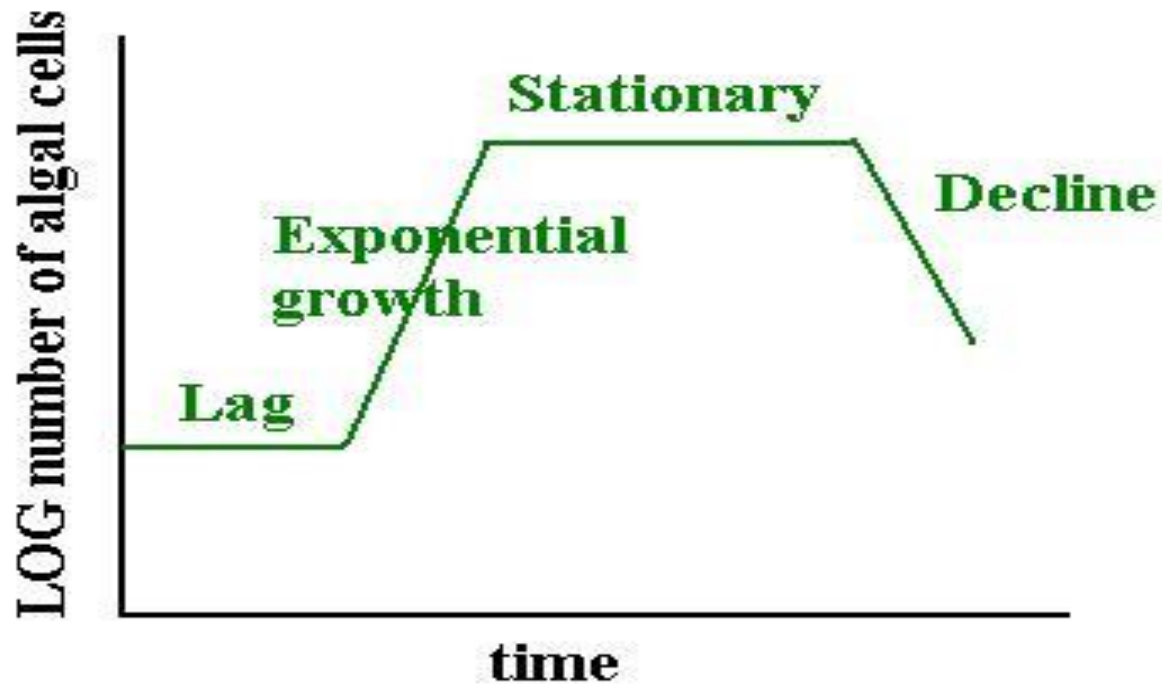
ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (BATCH) – ΜΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

- 2η προσέγγιση: ξεκινάμε από έναν πληθυσμό χ ατόμων, τα οποία εμβολιάζουμε στο κλειστό περιβάλλον. Θεωρούμε ότι όλα τα κύτταρα είναι στο ίδιο στάδιο του κυτταρικού κύκλου.
(ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΕΝΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
Πρόκειται για σπάνιο (τεχνητό) φαινόμενο στη φύση

ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (BATCH) – ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

- Στη φύση ή στο εργαστήριο η καλλιέργεια είναι μια **αυτοπεριοριζόμενη διαδικασία**, λόγω κυρίως της εξάντλησης των θρεπτικών υλικών.
- Στη φύση ή στο εργαστήριο οι κλειστές καλλιέργειες ακολουθούν το γνωστό κλειστό κύκλο αύξησης.
- Θεωρούμε ότι πολλές από τις συνθήκες παραμένουν σταθερές (θερμοκρασία, ταχύτητα ανάδευσης, αερισμός κλπ)

ΚΛΕΙΣΤΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ



ΚΛΕΙΣΤΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

- Λανθάνουσα φάση: ο πληθυσμός προσαρμόζεται στις νέες συνθήκες αύξησης, συνθέτει ειδικά ένζυμα για να αξιοποιήσει (καταβολίσει) την πηγή άνθρακα και ενέργειας
- Φάση επιτάχυνσης: Σηματοδοτεί την αρχή ανάπτυξης του οργανισμού. Σταδιακά αυξάνεται ο ειδικός ρυθμός αύξησης μέχρι τη μέγιστη τιμή οπότε πλέον εισερχόμαστε στην εκθετική φάση.
- Κατά την εκθετική φάση ισχύουν οι βασικές εξισώσεις αύξησης που περιγράφηκαν προηγούμενα. Η φάση αυτή δεν μπορεί να διατηρηθεί επ'άπειρον λόγω των περιορισμών που αναπτύχθηκαν.

ΚΛΕΙΣΤΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

- Η εκθετική φάση ακολουθείται από τη φάση επιβράδυνσης, κατά την οποία ο ειδικός ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας ελαττώνεται μέχρι μηδενισμού. Συνήθως είναι μεγάλης διάρκειας φάση. Αποτελεί μεγάλο τμήμα του κύκλου
- Στη φάση που ο πληθυσμός είναι μέγιστος έχουμε τη φάση στασιμότητας όπου ο πληθυσμός είναι μεταβολικά ενεργός αλλά δεν υπάρχουν πλέον ευνοϊκές συνθήκες άρα και αύξηση.

ΚΛΕΙΣΤΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

- Τα αποταμιευθέντα υλικά χρησιμοποιούνται και εξαντλούνται, οπότε οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στη φάση θανάτου
- Τα κύτταρα σταδιακά θανατώνονται και λύονται, ωστόσο η ακριβής κινητική αυτής της φάσης είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

- **Καλλιέργεια** = υπόστρωμα με μικροοργανισμό και δοχείο καλλιέργειας
- Το δοχείο μπορεί να είναι τρυβλίο Petri, γυάλινη κωνική, ένας δοκιμαστικός σωλήνας κλπ

- Απαραίτητη η **αξενική ή καθαρή** καλλιέργεια, προκειμένου να μελετήσουμε ένα είδος μικροοργανισμού.
- Από τη στιγμή που ένας μικροοργανισμός βρεθεί σε ένα αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο, θα αναπτύξει μια χαρακτηριστική **αποικία**

Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Επεξήγηση βασικών χειρισμών

- **Εμβολιασμός (Inoculation)**: μεταφορά αποικίας βακτηρίου από ένα στερεό θρεπτικό μέσο σε υγρό, με τη βοήθεια κρίκου.
- **Streaking plate technique**: άπλωμα ποσότητας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας πάνω σε στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο.
- **Pour plate technique**: μεταφορά ποσότητας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας σε τρυβλίο Petri και ανακάτεμα με υγροποιημένο θρεπτικό μέσο με άγαρ.

3. εμβολιασμός (καλλιέργεια) του εναιωρήματος

3α. εμβολιασμός (καλλιέργεια) σε υγρό θρεπτικό υλικό



αραιώνεται το πάμα ή το βαμβάκι από το σωληνάριο με το θρεπτικό υλικό



το στόμιο του σωληναρίου καίγεται ελαφρά στη φλόγα



βυθίζεται ο κρίκος στο υγρό και "ξεπλένεται" στο υλικό



το στόμιο του σωληναρίου καίγεται ελαφρά στη φλόγα



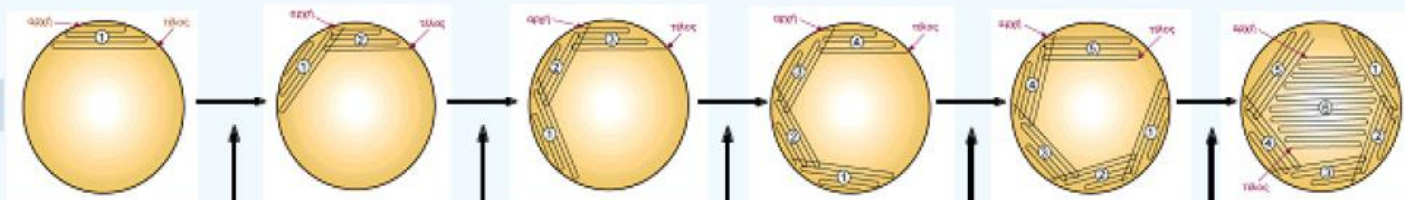
επαναποκαθίσταται το πάμα ή το βαμβάκι



αποστερώνεται ο κρίκος

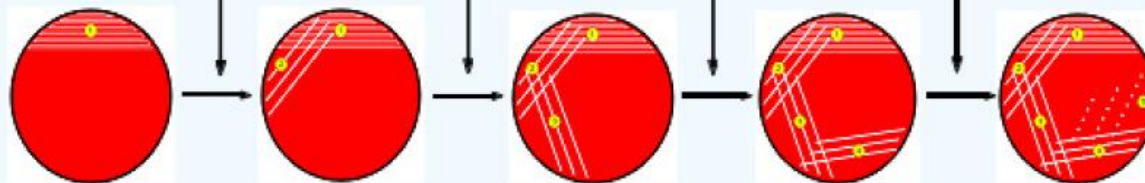
3β. εμβολιασμός (καλλιέργεια) σε στερεό θρεπτικό υλικό

Α' ΤΡΟΠΟΣ



αποστείρωση κρίκου

Β' ΤΡΟΠΟΣ



Η ΕΠΩΑΣΗ

1. Αερόβια καλλιέργεια

ΕΠΩΑΣΤΙΚΟΣ ΚΛΙΒΑΝΟΣ

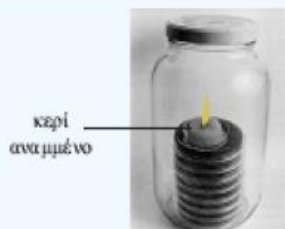


37° C

18 h



2. Καλλιέργεια σε ατμόσφαιρα CO₂

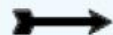


37° C

18 h



3. Αναερόβια καλλιέργεια



37° C

18 h



ή



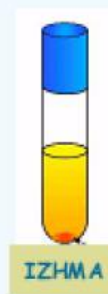
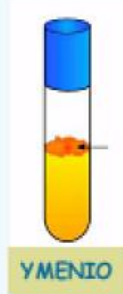
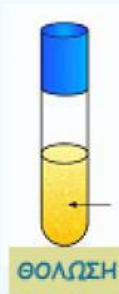
ειδικό δοχείο αναερόβιας καλλιέργειας και φάκελλοι GasPak που περιέχουν παλλάδιο (καταλύει την αντίδραση $O_2 + H_2 \rightarrow H_2O$ και έτσι απομακρύνει το ατμοσφαιρικό οξυγόνο)

το δοχείο έχει κλείσει ερμητικά και ο φάκελλος GasPak έχει ανοίξει. Μέσα στο δοχείο υπάρχουν αναερόβιας συνθήκης

ειδικός θάλαμος καλλιέργειας αναερόβων βακτηρίων. Στο εσωτερικό η ατμόσφαιρα απαρτίζεται από 85% N₂, 10% H₂ και 5% CO₂. Όλοι οι χειρισμοί καθώς και η επώαση των τρυβλίων γίνονται μέσα στο θάλαμο).

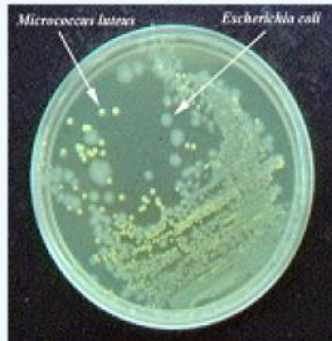
ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. υγρό θρεπτικό υλικό



Θύλαση του θρεπτικού ζωμού που οφείλεται σε ανάπτυξη βακτηρίων

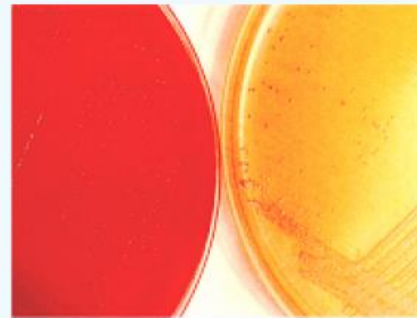
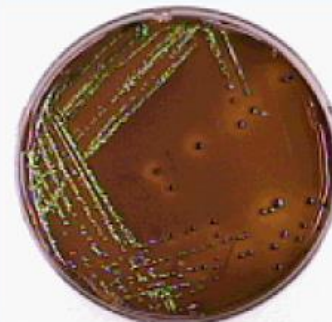
2. στερεά θρεπτικά υλικά



ΜΙΚΤΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ



3 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΟ ΙΔΙΟ ΤΡΥΒΛΙΟ



ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Εξαρτάται από το στερεό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Με το γυμνό μάτι ή με μεγεθυντικό φακό χεριού, εξετάζεται η μακροσκοπική εικόνα των βακτηριακών αποικιών πάνω στο υλικό. Παρατηρούνται και περιγράφονται :

ΕΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

α. το μέγεθος =>

πολύ μικρή
μικρή
μεγάλη

β. το σχήμα =>

κυκλική
ακτινοειδής
ριζοειδής

γ. το ύψος =>

χαμηλή
επηρμένη
φουσκωτή
ομφαλωτή
με κοίλανση

δ. το χρώμα =>

άσπρη
γκρι
κίτρινη
ιριδίζουσα

ε. η περιφέρεια =>

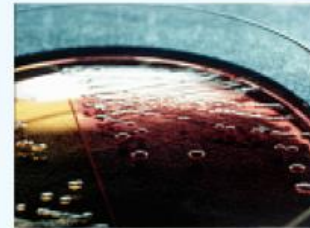
περιγεγραμμένη
κυματοειδής
ερπύζουσα
λοβώδης
δαντελωτή

ζ. η σύσταση =>

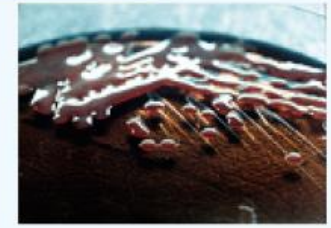
βλενώδης
ξώδης
αυτοσυγκολλούμενη

η. η όψη της
επιφάνειας =>

ομαλή
πτυχωτή
γυαλιστερή
θαμπή



Αποικίες *E. coli*



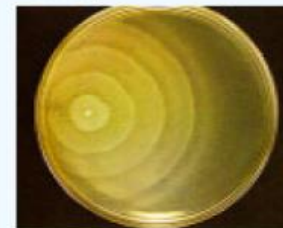
Αποικίες *Klebsiella*



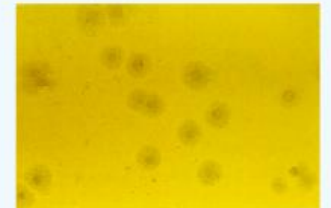
Αποικίες *Salmonella*



Αποικίες *Shigella*



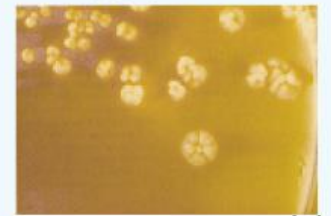
Αποικίες *Proteus*



Αποικίες *Mycoplasma hominis*



Αποικίες *Nocardia asteroides*



Αποικίες *Mycobacterium fortuitum*

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

α. αιμόλυση

β- αιμόλυση
ή
πλήρης



α- αιμόλυση
ή
στελής



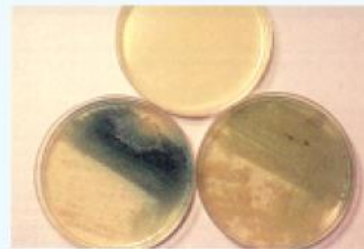
γ- αιμόλυση



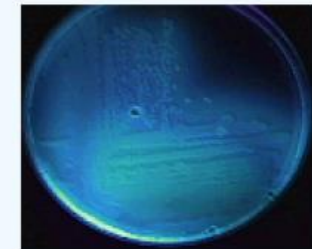
β. παραγωγή χρωστικής



Καλλιέργημα *Pseudomonas aeruginosa*
=> παραγωγή πράσινης πικτοκυανίνης

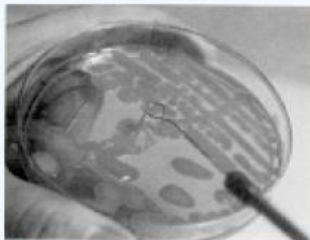


Κάτω : καλλιέργημα *Pseudomonas aeruginosa*
που παράγουν δυο διαφορετικές χρωστικές
Πάνω : Τρυβλίο μάρτυρας



Καλλιέργημα *Pseudomonas aeruginosa*
=> παραγωγή φθοροσκοπικής

γ. παραγωγή βλέννης

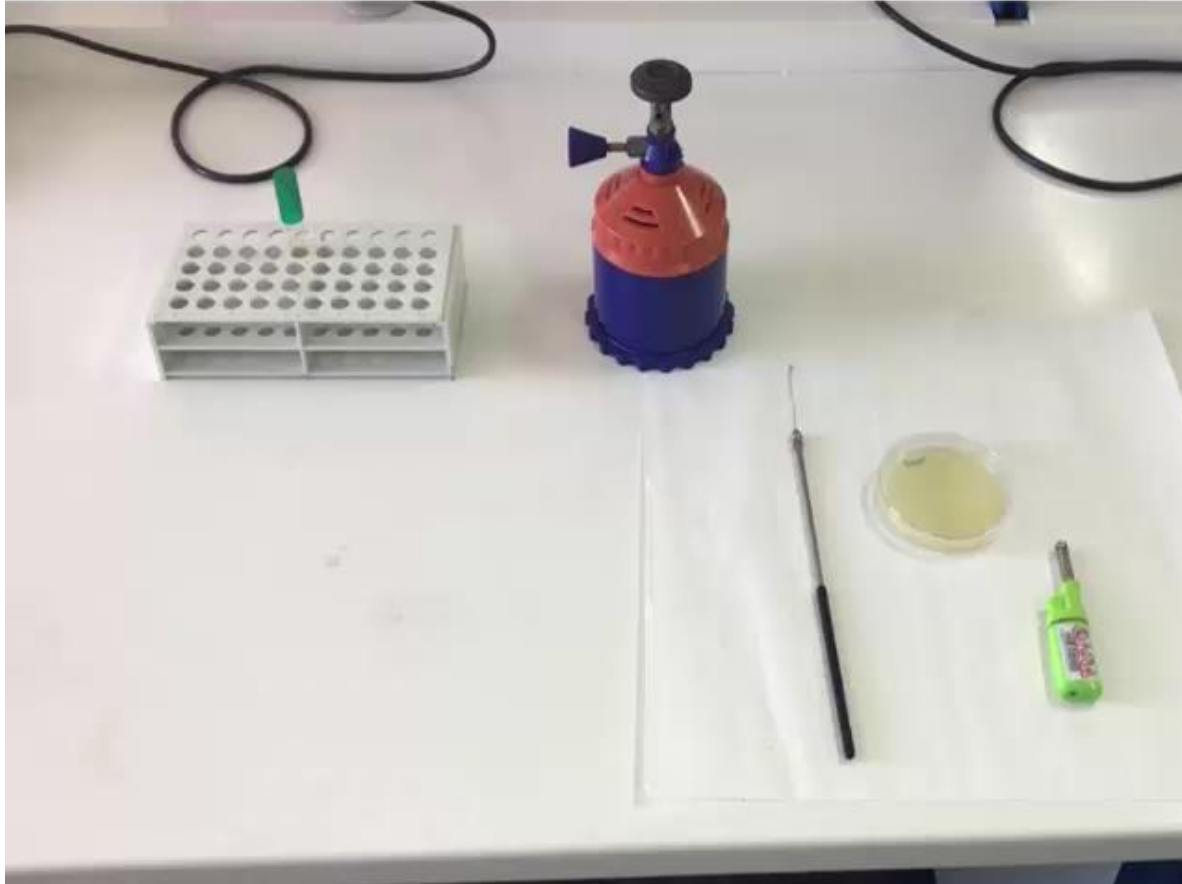


άφθονη παραγωγή βλεννώδους υλικού από στέλεχος
Pseudomonas aeruginosa που απομονώθηκε από ασθενή
με κυστική ίνωση του παγκρέατος

δ. παραγωγή μυρωδιάς

τα καλλιεργήματα ορισμένων βακτηρίων, π.χ. **σιγκέλλες, ψευδομονάδες**, έχουν χαρακτηριστική μυρωδιά

Streaking plate



ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΚΤΗΣΗΣ ΚΑΘΑΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

- **Διαδοχικές αραιώσεις** = Πραγματοποιούνται συνεχείς αραιώσεις κατά 10 ή 100 φορές ώσπου να φτάσουμε σε αραιά δείγματα που όταν απλωθούν σε τρυβλία θα δώσουν λίγες αποικίες
- **Μέθοδος παράλληλων γραμμών** = Αφορά στερεό και μόνο θρεπτικό μέσο, στο οποίο χρησιμοποιείται κρίκος εμβολιασμού

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΚΤΗΣΗΣ ΚΑΘΑΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

- **Διασπορά των μικροοργανισμών** = Εναιώρημα κυττάρων που πρέπει να περιέχει 100-200 κύτταρα απλώνεται πάνω στην επιφάνεια θρεπτικού υλικού, με τη βοήθεια γυάλινου διανομέα
- **Αραίωση με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο** = Μικρός όγκος δείγματος μπαίνει σε άδειο απωστειρωμένο τρυβλίο και ακολούθως προστίθεται υλικό θερμοκρασίας 45°C. Το μίγμα ανακινείται ελαφρά και επωάζεται.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1.3. Άμεση μέτρηση της μάζας των μικροοργανισμών

Κατά την ανάπτυξη των μικροβιακών καλλιεργειών ο αριθμός των κυττάρων καθώς και η μάζα τους αυξάνει.

Ως εκ τούτου, τεχνικές άμεσης μέτρησης της μάζας των κυττάρων χρησιμοποιούνται στην παρακολούθηση της μικροβιακής ανάπτυξης, όπως για παράδειγμα φυγοκέντρηση του υγρού δείγματος, έκπλυση του στερεού ιζήματος, ξήρανση και ζύγιση.

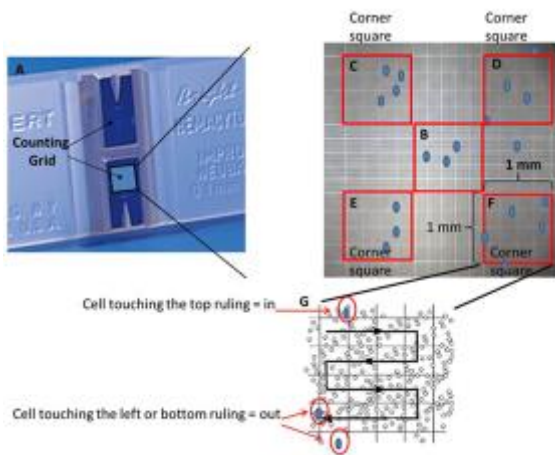
Δεν είναι ακριβής μέθοδος, διότι προσμετρούνται όλα τα κύτταρα (ζωντανά και νεκρά).

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1. Άμεση μέτρηση του αριθμού των κυττάρων

1.1. Άμεση μέτρηση του συνολικού αριθμού των

βακτηριακών κυττάρων με την χρήση αιματοκυτόμετρου



Το αιματοκυτόμετρο είναι ένα γυάλινο πλακίδιο με χαραγές που σχηματίζουν τετράγωνα γνωστού εμβαδού. Το δείγμα με τους μικροοργανισμούς τοποθετείται στην επιφάνεια του πλακιδίου το οποίο καλύπτεται από μια γυάλινη καλυπτρίδα. Η διάταξη παρατηρείται σε μικροσκόπιο και μετράται ο αριθμός των κυττάρων σε διαφορετικά τετράγωνα από τα οποία λαμβάνουμε τον μέσο όρο. Το δείγμα καταλαμβάνει γνωστό όγκο από τον οποίο υπολογίζουμε τον συνολικό αριθμό των κυττάρων ανά mL.

Petroff Hausser

Μειονεκτήματα μεθόδου:

- Δυσκολία στη μέτρηση δειγμάτων με υψηλό αριθμό μικροβίων, ενώ δεν δίνει πληροφορίες για δείγματα με χαμηλό αριθμό μικροοργανισμών.
- Μετρά και τα νεκρά και τα ζωντανά κύτταρα.
- Εξετάζει μόνο μικρή ποσότητα δείγματος και συνεπώς περιορίζεται έτσι η ακρίβεια της μεθόδου.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

Αν μετρήσαμε 28 κύτταρα ανά τετράγωνο κατά μέσο όρο σε 25 τετράγωνα της πλάκας συνολικού εμβαδού 1mm^2 , στα οποία το υπερκείμενο πάχος του υγρού δείγματος είναι 0.02 mm, τότε μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των κυττάρων ως:

Συγκέντρωση κυττάρων = Αριθμός κυττάρων/τετράγωνο × αριθμό τετραγώνων που μετρήθηκαν / συνολικό όγκο τετραγώνων που μετρήθηκαν

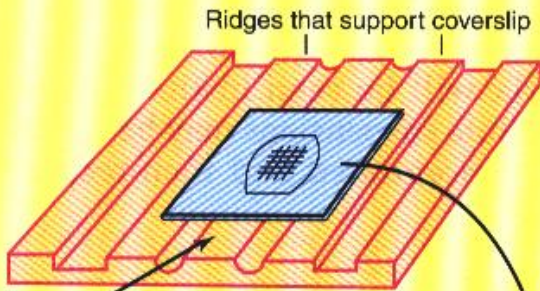
Άρα,

$(28 \text{ κύτταρα} / \text{τετράγωνο}) \times 25 \text{ τετράγωνα} / (1\text{mm}^2 \times 0,02 \text{ mm}) = 3,5 \times 10^4 \text{ κύτταρα} / \text{mm}^3 \text{ ή } 3,5 \times 10^7 \text{ κύτταρα} / \text{mL}$

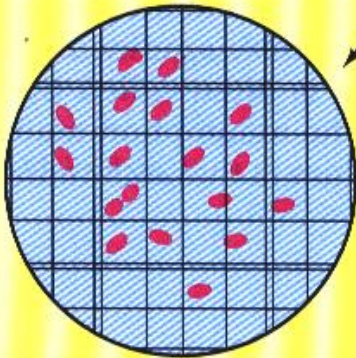
1 ml =
1000 cubic
millimeters

Μικροοργανισμοί περιβάλλοντος

Άμεση μέτρηση μικροοργανισμών

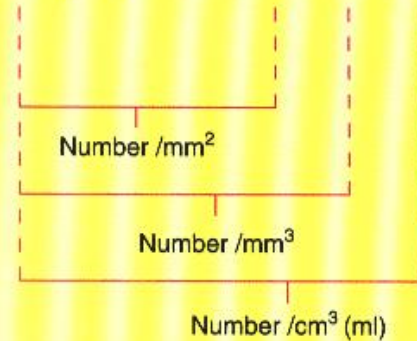


Sample added here; care must be taken not to allow overflow; space between coverslip and slide is 0.02 mm ($\frac{1}{50}$ mm). Whole grid has 25 large squares, a total area of 1 mm² and a total volume of 0.02 mm³.



Microscopic observation; all cells are counted in large square: 12 cells (in practice, several squares are counted and the numbers averaged)

To calculate number per milliliter of sample:
12 cells x 25 squares x 50 x 10³
= 1.5 x 10⁷



Μειονεκτήματα μεθόδου:

- Δυσκολία στη μέτρηση δειγμάτων με υψηλό αριθμό μικροβίων, ενώ δεν δίνει πληροφορίες για δείγματα με χαμηλό αριθμό μικροοργανισμών.
- Μετρά και τα νεκρά και τα ζωντανά κύτταρα.
- Εξετάζει μόνο μικρή ποσότητα δείγματος και συνεπώς περιορίζεται έτσι η ακρίβεια της μεθόδου.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2.2. Μέτρηση με τη μέθοδο της απορρόφησης ακτινοβολίας

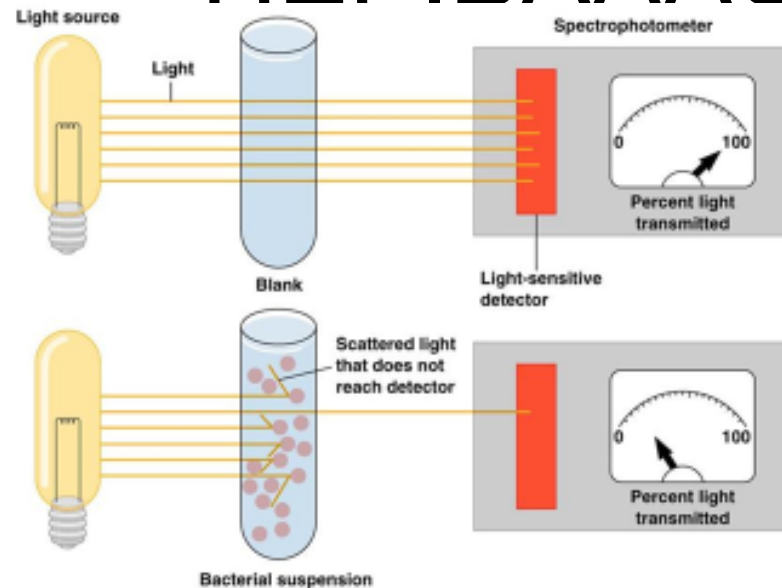
Ένας απλός και συνηθισμένος τρόπος είναι ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας (OD) του υγρού καλλιέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης.

Επειδή το μέγεθος των κυττάρων είναι περίπου σταθερό το ποσό της ακτινοβολίας που σκεδάζεται είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των κυττάρων στο δείγμα.

Όταν η συγκέντρωση των κυττάρων είναι περίπου 10 εκατομμύρια κύτταρα ανά mL (10^7 /mL) τότε το δείγμα δείχνει νεφελώδες ή θολό ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις κυττάρων κάνουν το δείγμα περισσότερο αδιαπέραστο από το φως.

Ο βαθμός σκέδασης της ακτινοβολίας μπορεί να μετρηθεί από φωτόμετρα, και σχετίζεται γραμμικά με την συγκέντρωση των βακτηρίων σε χαμηλές τιμές απορρόφησης.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ



Η οπτική πυκνότητα, λόγω του σκεδασμού της οπτικής δέσμης από τα κυτταρικά σωματίδια, χρησιμεύει ως μέτρο του αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας.

Η μονάδα οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600nm ($OD_{600} = 1,0$) αντιστοιχεί σε 10^9 βακτηριακά κύτταρα ανά mL θρεπτικού υλικού (10^9 κύτταρα/mL).

Μικροοργανισμοί περιβάλλοντος

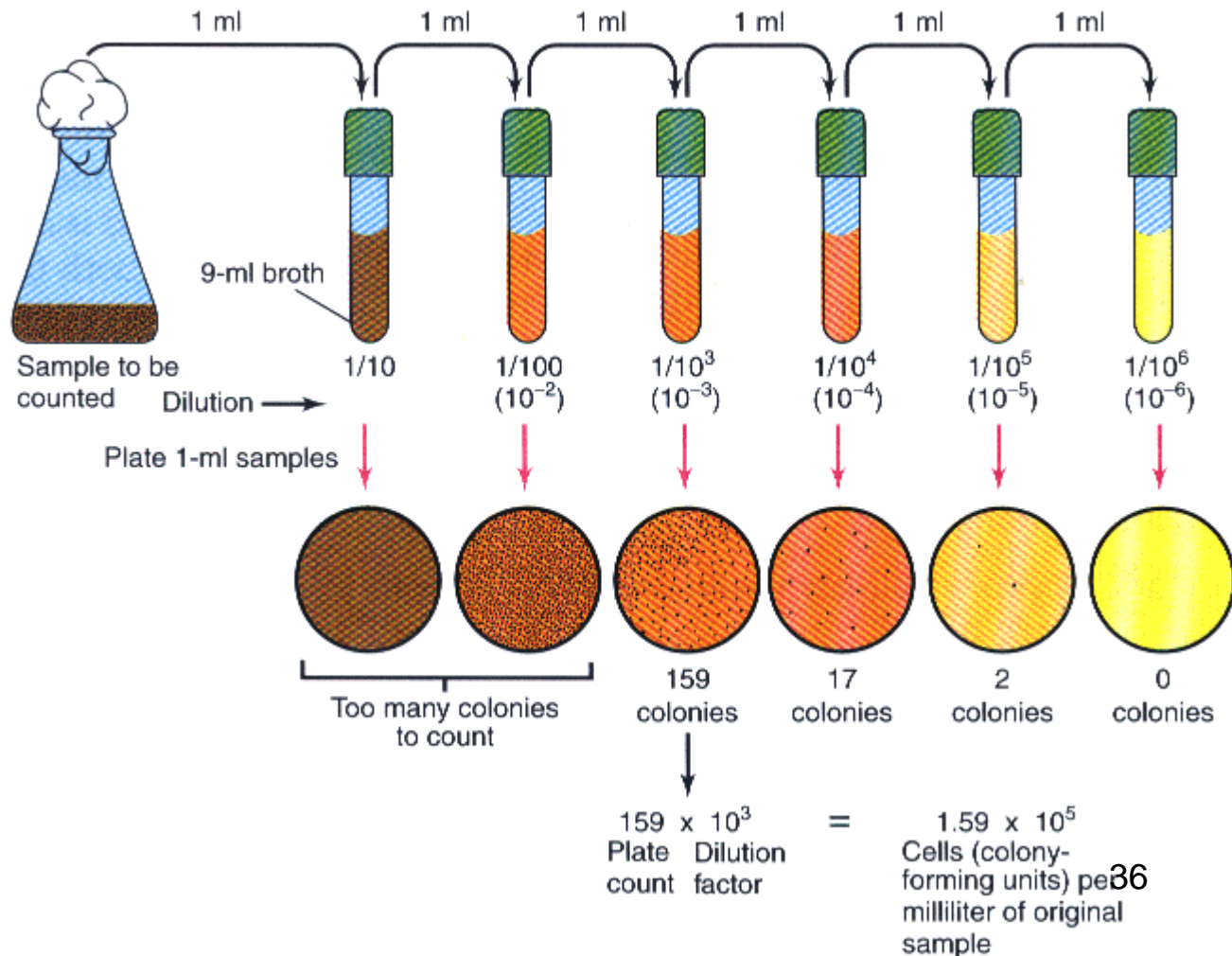
Μέτρηση μικροοργανισμών – Μικροοργανισμοί εδάφους

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ/ g ΕΔΑΦΟΥΣ

Βάθος (cm)	Βακτήρια	Μύκητες	Φύκη
3-8	12.000.000	120.000	25.000
20-25	2.500.000	50.000	5.000
35-40	600.000	15.000	500
65-75	10.000	5.000	100
135-145	1.500	2.500	0

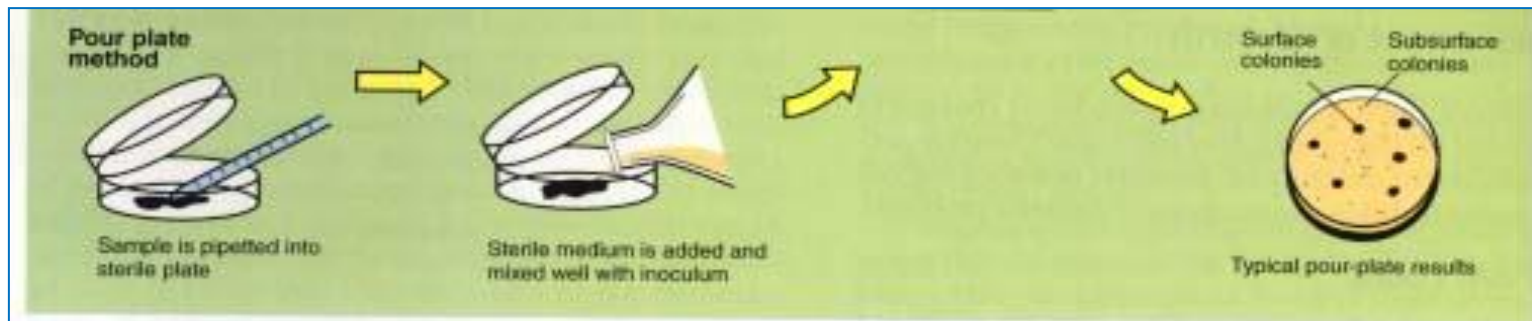
Μικροοργανισμοί περιβάλλοντος

Μικροοργανισμοί εδάφους- Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων



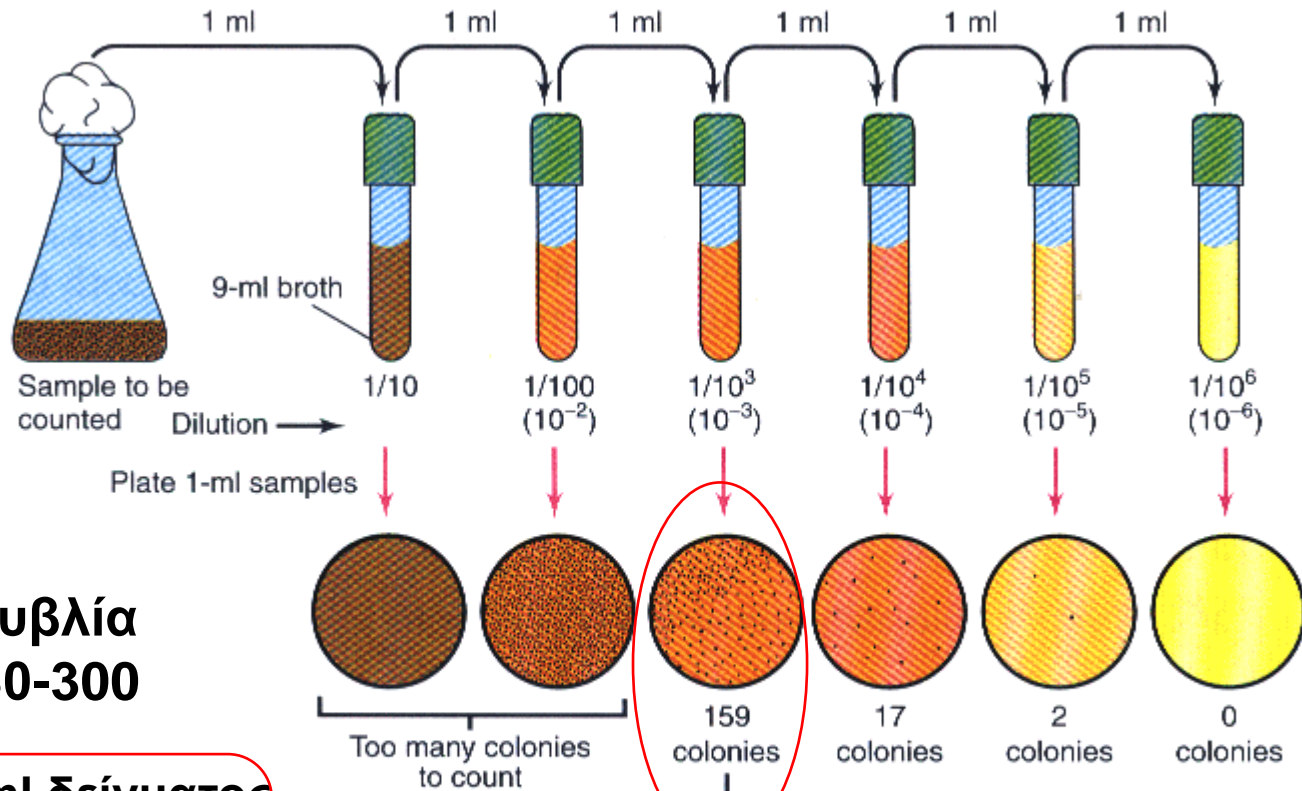
Μικροοργανισμοί εδάφους- Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Τα αραιωμένα δείγματα τοποθετούνται σε ένα άδειο τρυβλίο Petri στο οποίο προστίθεται στη συνέχεια ρευστοποιημένο θρεπτικό μέσο με άγαρ (μέθοδος **pour plate**). Μετά την επώαση, κάθε βιώσιμο κύτταρο παράγει μια αποικία στο στερεοποιημένο άγαρ. Ακολουθεί η καταμέτρηση των αποικιών.



Μικροοργανισμοί περιβάλλοντος

Μικροοργανισμοί εδάφους- Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων



!! Μέτρηση από τα τρυβλία με αριθμό αποικιών 30-300

N (Μικροοργανισμοί) / ml δείγματος = αριθμός αποικιών / (όγκος δείγματος στο τρυβλίο Petri X αραιώση)

159×10^3 Plate Dilution count factor = 1.59×10^5 Cells (colony-forming units) per 38 milliliter of original sample

Μικροοργανισμοί εδάφους- Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

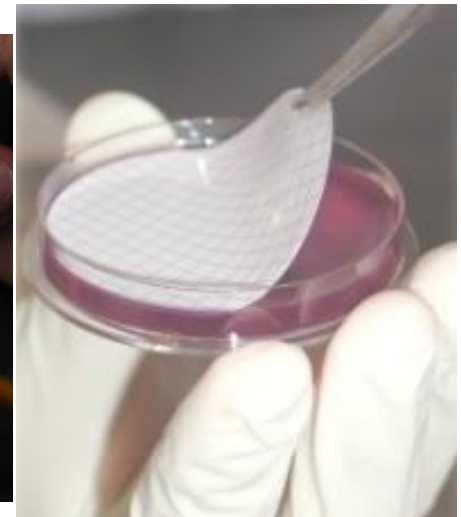
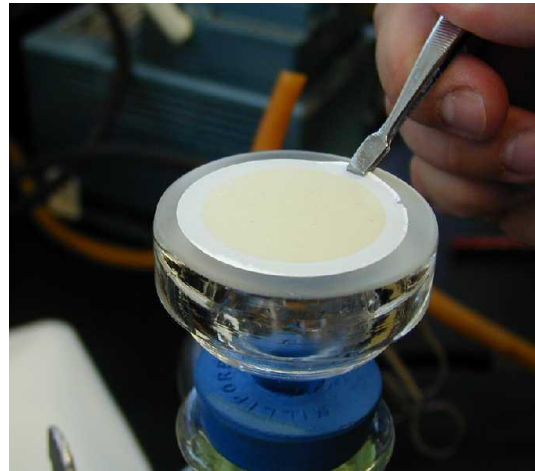
Υπάρχουν δύο κύρια πλεονεκτήματα της
μεθόδου plate count

1. Προσμετρώνται μόνο βιώσιμοι οργανισμοί.
2. Δίδεται η ικανότητα μέτρησης δειγμάτων χαμηλής περιεκτικότητας σε μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμοί περιβάλλοντος

Μέτρηση μικροοργανισμών – Μικροοργανισμοί νερών

- Συνήθως πολύ μικρός αριθμός μικροοργανισμών - Μικροί όγκοι δεν είναι αντιπροσωπευτικοί για ανάλυση



$$N \text{ (Μικροοργανισμοί) } / 100 \text{ ml νερού } =$$

$$100X \text{ αριθμός αποικιών / όγκο δείγματος που}$$

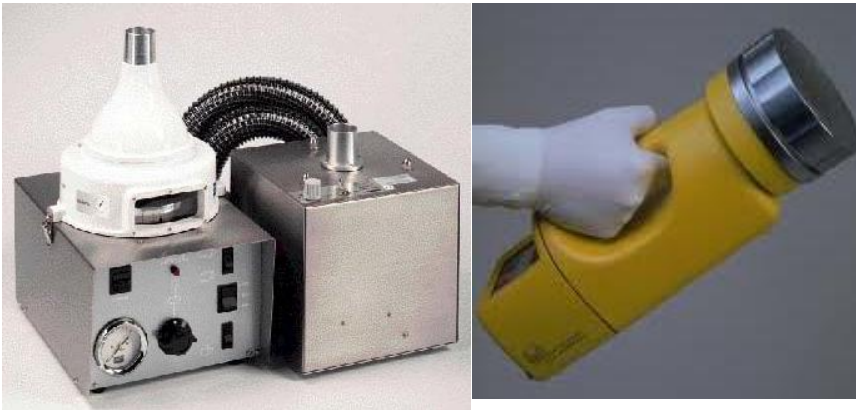
$$\text{διηθήθηκε.}$$

Κάθε ορατή αποικία = ~ περίπου 10^9 κύτταρα

Μικροοργανισμοί περιβάλλοντος

Μέτρηση μικροοργανισμών – Μικροοργανισμοί άερα

Δειγματολήπτες άερα



Ο δειγματολήπτης λειτουργεί με την άντληση αέρα πάνω από ένα τρυβλίο Petri που περιέχει το θρεπτικό υλικό. Καθώς ο αέρας εισέρχεται, σε κάποιες συσκευές το τρυβλίο περιστρέφεται κατά 360°, ώστε οι μικροοργανισμοί να εναποτίθενται ομοιόμορφα.

Η ποσότητα (I) του αέρα που εισέρχεται στη συσκευή υπολογίζεται ανάλογα με τα τεχνικά της χαρακτηριστικά, π.χ.
 $X I \text{ \acute{a}\epsilon\rho\alpha/\text{min} \times Y \text{ \chi\rho}\acute{o}\nu\omicron \text{ (min)}$
λειτουργίας

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2. Έμμεση μέτρηση του αριθμού των κυττάρων

2.1. Έμμεση μέτρηση μέσω προσδιορισμού ενός μεταβολίτη

Η ποσότητα των πρωτεϊνών ή άλλων σημαντικών βιολογικών μορίων στα κύτταρα (π.χ. ATP, χλωροφύλλη κλπ) είναι περίπου σταθερή ανά κύτταρο και αυξάνει σε μια καλλιέργεια ανάλογα με την αύξηση της μάζας και του αριθμού των κυττάρων. Έτσι, η μέτρηση του πρωτεϊνικού αζώτου ή της χλωροφύλλης είναι έμμεση ένδειξη της ποσότητας των κυττάρων ή των φωτοσυνθετικών φυκών αντίστοιχα που υπάρχουν σε ένα υγρό δείγμα.

Μετρητές Coulter

Υπολογίζουν τον ολικό αριθμό κυττάρων μιας καλλιέργειας

Βασίζεται στη μεταβολή που προκαλεί η διέλευση των κυττάρων στην αγωγιμότητα/αντίσταση μιας οπής που βρίσκεται εντός ηλεκτρικού πεδίου

ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ (Κεφάλαιο 6^ο)

Απαραίτητος ο έλεγχος της αύξησης (αν και η αύξηση είναι αυτοπεριοριζόμενη)

Ιδιαίτερα σημαντικός ο έλεγχος για τα τρόφιμα

Ο περιορισμός της αύξησης μπορεί να γίνει είτε με αναστολή ή με πλήρη καταστροφή (=αποστείρωση)

Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Βασική αρχή η διατήρηση άσηπτων συνθηκών για τα διαλύματα και τα θρεπτικά μέσα που θα χρησιμοποιηθούν

Αποστείρωση: Ολική απαλλαγή από μικροοργανισμούς και σπόρια (χημικές ουσίες, θέρμανση, ακτινοβολία).

Απολύμανση: Καταστροφή ή μη αντιστρέψιμη αδρανοποίηση των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων, αλλά όχι απαραίτητα και των σπορίων

Αντισηψία: Χημικά μικροβιοκτόνα για εφαρμογή σε ζωντανούς ιστούς

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

- **Φυσικές μέθοδοι**= θερμότητα, χαμηλές θερμοκρασίες, ξήρανση, οσμωτική πίεση, διήθηση, ακτινοβολία
- **Χημικές μέθοδοι** = Ομάδες χημικών ενώσεων που καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς ή μειώνουν την αύξησή τους

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

- Η δράση των διαφόρων παραγόντων εξαρτάται από:

Το είδος των μικροοργανισμών

Τη φυσική κατάστασή τους

Το περιεχόμενο του περιβάλλοντός τους (πχ αν περιβάλλονται από λιπαρά συστατικά)

Το pH

A. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

A. ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ = η θερμοκρασία στην οποία επιβιώνουν οι μικροοργανισμοί ποικίλει και εκφράζεται με το **Θερμικό σημείο θανάτου**

- **Θερμικό σημείο θανάτου**= η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία όλοι οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε ένα εναιώρημα, θανατώνονται εντός 10 λεπτών
- **Θερμικός χρόνος θανάτου**= ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για να θανατωθούν όλα τα βακτήρια υγρής καλλιέργειας δεδομένης θερμοκρασίας. Ακολουθεί εκθετικό ρυθμό και κάθε λεπτό περίπου το 90% των κυττάρων νεκρώνεται

Α. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Α. ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ

- **Δεκαδική μείωση του χρόνου**= σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων και εκφράζει το χρόνο κατά τον οποίο νεκρώνεται το 90% των βακτηρίων σε μια δεδομένη θερμοκρασία

Είναι εύλογο ότι η επιτυχής νέκρωση απαιτεί συνδυασμό θερμοκρασίας και χρόνου. Επίσης εξαρτάται και από τη φύση της θερμότητας (υγρή ή ξηρή)

Α. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Α. ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ

- Υγρή θερμότητα: προκαλεί κροκίδωση πρωτεϊνών (δίνει ίζημα, χαλά την τριτοταγή δομή)
 - α. Βράσιμο (νεκρώνει εντός 10 λεπτών βακτήρια, ιούς, μύκητες). Αφήνει όμως τα σπόρια και μερικούς ιούς
 - β. Χρήση ατμού κάτω από πίεση (αυτόκαυστο)
Γενικά χρησιμοποιείται για θρεπτικά υλικά, νοσοκομειακά υλικά,

Α. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Α. ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ

- **Παστερίωση**: Αρχικά κατεργασία του υλικού (γάλα κυρίως) στους 63 βαθμούς για μισή ώρα. Σήμερα στους 72 για 15 δευτερόλεπτα (παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας για σύντομο χρόνο)
- Όταν επιθυμούμε το γάλα να μη διατηρηθεί στο ψυγείο μετά την κατεργασία, εφαρμόζουμε συμπληρωματικές μεθόδους (π.χ. Υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία για 1-3 δευτερόλεπτα)

Α. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Α. ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ

- **Με ξηρή θερμότητα**, αποστειρώνονται αντικείμενα που αντέχουν σε υψηλή θερμοκρασία και απότομες θερμοκρασιακές μεταβολές. Επιδρά καταστρεπτικά στο κυτταρόπλασμα των μικροβίων, οξειδώνοντας τα συστατικά.

Παραδείγματα:

Φλόγα Bunsen: Χρησιμοποιείται για να αποστειρώσουμε κρίκους εμβολιασμού, βελόνες, στόμια δοκιμαστικών σωλήνων και γυάλινων φιαλών.

Με θερμό αέρα στον ξηροκλίβανο (θερμοκρασία 170°): Χρησιμοποιείται για τρυβλία, σωλήνες, φιάλες, μεταλλικά αντικείμενα κ.λ.π. τα οποία θερμαίνονται επί δύο ώρες

A. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

B. ΔΙΗΘΗΣΗ

- Το δείγμα διέρχεται μέσω πορώδους ηθμού υπό κενό ώστε να αποτραπεί η διέλευση των μικροβίων

Οι πόροι είναι συνήθως 0.22 – 0.45 μm

Το ίδιο γίνεται και με τον αέρα, ο οποίος στους θαλάμους νηματικής ροής διέρχεται από ειδικά φίλτρα που τον καθαρίζουν προστατεύοντας το πείραμα από μολύνσεις.

Α. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Γ. ΨΥΞΗ - ΑΦΥΔΑΤΩΣΗ

- Πρόκειται για βακτηριοστατικούς παράγοντες που επιτρέπουν στα βακτήρια να ξεκινήσουν την ανάπτυξή τους όταν βρεθούν σε ιδανικές συνθήκες

Α. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Δ. ΟΣΜΩΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ

Δημιουργία υπέρτονου διαλύματος στο περιβάλλον, με σκοπό την απομάκρυνση του νερού και την τελική αφυδάτωση του κυτάρου

Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Αποστείρωση

Αποστείρωση: Χρησιμοποιείται για την θανάτωση όλων των μικροοργανισμών (βακτήρια, ιοί, μύκητες, ιοειδή) καθώς και των σπορίων, επιτυγχάνεται μέσω:

- Υγρή θέρμανση ή με ατμό υπό πίεση (αυτόκαυστο) \longrightarrow 121°C, 1h, 15 psi.
- Ξηρή θέρμανση \longrightarrow 171°C, 1h / 160°C, 2h / 121°C, 16h.
- Διαλύματα \longrightarrow γλουταραλδεΐδη, υπεροξείδιο του υδρογόνου (3% έως 30%), φορμαλδεΐδη (6% έως 8%), διοξείδιο του χλωρίου.



Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Απολύμανση

Απολύμανση: Χρησιμοποιείται για τη καταστροφή ή τη μη αντιστρέψιμη αδρανοποίηση των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων, αλλά όχι απαραίτητα και των σπορίων, επιτυγχάνεται μέσω:

- ✓ Υγρή θέρμανση \longrightarrow 75°C έως 100°C.
- ✓ Διαλύματα: γλουταραλδεϋδη (η εισπνοή της μπορεί να επιδεινώσει το άσθμα), υπεροξειδίο του υδρογόνου (3% έως 6%), φορμαλδεϋδη (1% έως 8%), ενώσεις χλωρίου, 70% ισοπροπυλική αλκοόλη.
- ✓ Οικιακά υγρά απολυμαντικά (υποχλωριώδες νάτριο) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως απολυμαντικά ενδιάμεσης δράσης και έχουν βακτηριοκτόνο, μυκητοκτόνο, ιοκτόνο και φυματοκτόνο δράση.
- ✓ Οι ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου όπως το χλωριούχο βενζαλκόνιο είναι αποτελεσματικές ως απολυμαντικά ήπιας δράσης όταν βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση. Τα νεότερα σκευάσματα είναι πολύ αποτελεσματικά απολυμαντικά με γρήγορη δράση ενάντια σε βακτήρια, ιούς, μύκητες και μυκοβακτηρίδια.

Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

Αντισηψία

Αντισηψία: Χημικά μικροβιοκτόνα για το δέρμα και τους ιστούς που δεν αντικαθιστούν, όμως τα απολυμαντικά.

- ✓ Αλκοόλες: 70% αιθυλική ή ισοπροπυλική αλκοόλη. Παρουσιάζουν ταχεία δράση ευρέος φάσματος κατά των μικροοργανισμών, αλλά όχι ενάντια στα σπόρια.
- ✓ Ιωδιοφόρα: ιώδιο σε συνδυασμό με ένα οργανικό μόριο-φορέα (povidone-iodine, poloxamer-iodine, τόσο σε αντισηπτικά όσο και σε απολυμαντικά).
- ✓ Hexachlorophene: βακτηριοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης αλλά μπορεί να είναι τοξικό.



Β. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες, διαλύουν τις μεμβράνες (τα λίπη τους)

Όσο αυξάνει το μήκος τους αυξάνει και η βακτηριοστατική τους δράση

Συχνότερες η αιθανόλη και η ισοπροπανόλη

Χρησιμοποιούμε διάλυμα αιθανόλης (συχνότερα 70%, γιατί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών απαιτεί και νερό)

Β. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες, διαλύουν τις μεμβράνες (τα λίπη τους)

Όσο αυξάνει το μήκος τους αυξάνει και η βακτηριοστατική τους δράση

Συχνότερες η αιθανόλη και η ισοπροπανόλη

Χρησιμοποιούμε διάλυμα αιθανόλης (συχνότερα 70%, γιατί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών απαιτεί και νερό)

Β. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Χημικές ουσίες που παράγουν μικροοργανισμοί και που δρουν καταστροφικά ή ανασταλτικά έναντι άλλων. Αποτελούν κλάδο χημειοθεραπευτικών με κύριο γνώρισμά τους τη φυσική τους προέλευση

Από όσα έχουν ανιχνευθεί, μόνο το 1% έχει Ιατρική αξία

Όταν γίνονται αποτελεσματικά ή αποτελεσματικότερα μετά από κάποια χημική μετατροπή, καλούνται ημισυνθετικά.

Υπάρχουν τα ευρέος φάσματος (έναντι θετικών και αρνητικών GRAM, και τα περιορισμένου φάσματος.

Β. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ

Χημικές ουσίες που παράγουν ζωικά κύτταρα σε απόκριση μόλυνσης από ιούς.

Είναι μικρού μοριακού βάρους (περίπου 17000) και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες (IFN-α, IFN-β, IFN-γ)

Εμπλέκονται στο φαινόμενο της παρεμπόδισης (κατά το οποίο όταν κύτταρο μολυνθεί από ιό δεν μπορεί να μολυνθεί από άλλο ιό)

Τρόποι αποστείρωσης

Μέθοδος	Διαδικασία	Χρήση	Μηχανισμός δράσης	Μειονεκτήματα
Ξηρή καύση	170° C για 1 ώρα σε κλίβανο	Υαλικά, μεταλλικά αντικείμενα	Οξειδώνει τα συστατικά των βακτηρίων	όχι για αποστείρωση θρεπτικών υλικών
Υγρή καύση	121° C υπό πίεση 28 psi επί 20-30 λεπτά σε αυτόκαυστο	Υαλικά, θρεπτικά υλικά, υγρά, στερεά	Συσσωματώνει τις πρωτεΐνες των μικρ/σμών	όχι θρεπτικά συστατικά (π.χ. λακτόζη) που δεν είναι σταθερά σε αυτές τις συνθήκες
Φιλτράρισμα	Μικροβιοκρατής ηθμός, αντλία κενού	Υγρά, θρεπτικά υλικά	Τα βακτήρια δεν διαπερνούν τους πόρους	Τα υαλικά πρέπει να έχουν αποστειρωθεί με άλλη μέθοδο
Τοξικά αέρια	Οξείδιο του αιθυλενίου υπό χαμηλή πίεση	Μεγάλες επιφάνειες, δωμάτια νοσοκομείων	Καταστρέφει κάθε μορφή ζωής (θανατηφόρος ατμόσφαιρα)	Εύφλεκτο, απομακρύνεται δύσκολα
Ακτινοβολία	Υπέριυθη (UV) ή ιονισμένη (ακτίνες γ και Χ)	Θρεπτικά υλικά, υγρά, στερεά	Προκαλεί μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό των μικρ/σμών	Δεν διαπερνά εύκολα το γυαλί

Βασικοί μικροβιολογικοί χειρισμοί

- Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται αμέσως μετά την ετοιμασία τους.
- Τα θρεπτικά υλικά ελέγχονται για μολύνσεις πριν τη χρήση.
- Δοχεία με θρεπτικό υλικό ή τρυβλία ανοίγονται πάντα κάτω από τη φλόγα λύχνου και δεν αφήνονται σε επαφή με τον αέρα.
- Στα πειράματα χρησιμοποιούνται αποστειρωμένες πιπέτες και η αποστειρωμένη συσκευασία δεν ανοίγεται πριν το πείραμα.

- **Βακτηριοκτόνο**= παράγοντας που νεκρώνει ή καταστρέφει τα βακτήρια
- **Βακτηριοστατικό**= παράγοντας που αναστέλλει τη γρήγορη αύξηση των βακτηρίων

Επίδραση αντιβιοτικών σε οργανισμούς

Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση του αντιβιοτικού Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *in vitro*

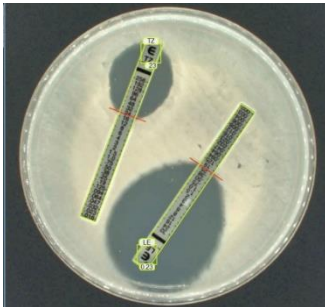
- Χορήγηση ελάχιστης ποσότητας για την αποφυγή τοξικότητας και γενικά παρενεργειών
- Σους ιστούς η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που προσλαμβάνεται είναι χαμηλότερη από αυτή που κυκλοφορεί στον ορό → $C_{\text{αντιβιοτικού στον ορό}} = 2-8 \times \text{MIC}$
- MIC_{50} , MIC_{90}

Επίδραση αντιβιοτικών σε οργανισμούς

Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση του αντιβιοτικού Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Η ελάχιστη συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού που απαιτείται για τη θανάτωση ενός τύπου μικροοργανισμού

- Βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό $MBC/MIC=4$
- Βακτηριοστατικό αντιβιοτικό $MBC/MIC>4$



Etest

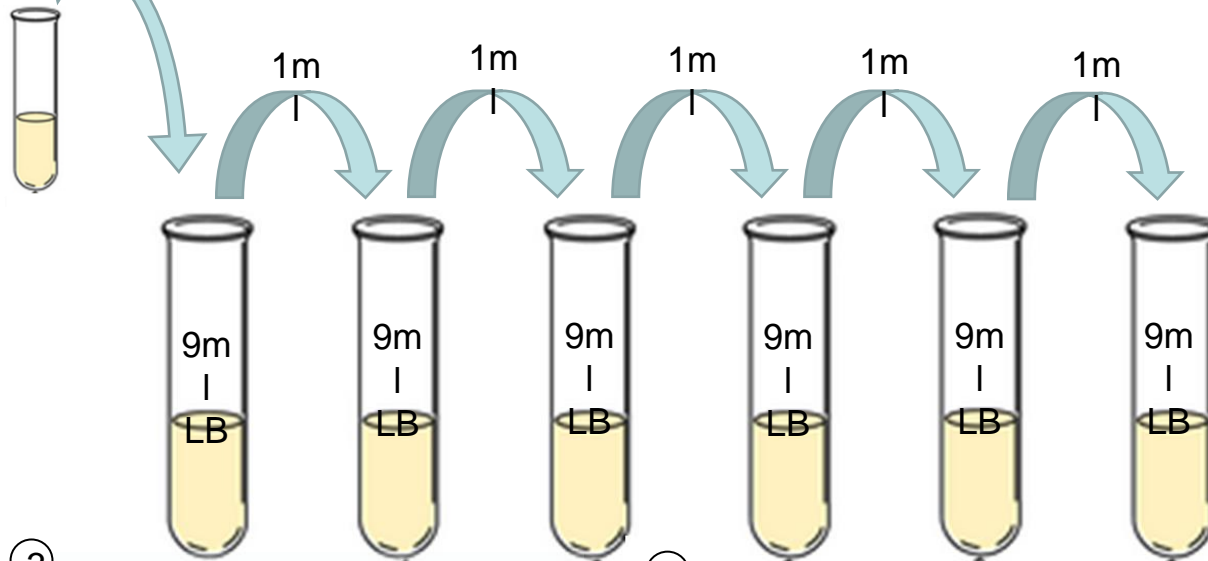
Μέθοδος κλιμακωτής (gradient) διάχυσης για εύρεση MIC

Επίδραση αντιβιοτικών σε οργανισμούς

Υπολογισμός MIC και MBC

① Προσθέτουμε 1ml αντιβιοτικού γνωστής συγκέντρωσης

② Μεταφέρουμε 1ml από το 1^ο σωληνάκι στο 2^ο από το 2^ο στο 3^ο κ.ο.κ (6 αραιώσεις).



③ Προσθέτουμε 300μl από την καλλιέργεια *E. coli* σε κάθε σωληνάριο

④ Επωάζουμε 12h υπό ανάδευση στους 37°C

Επίδραση αντιβιοτικών σε οργανισμούς

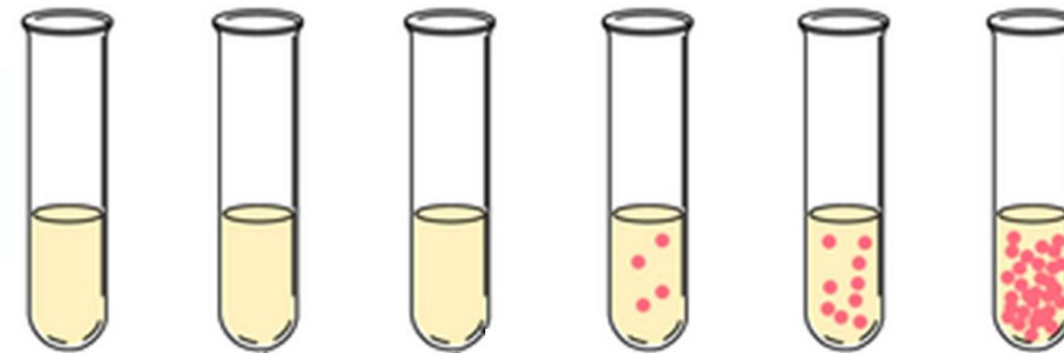
Υπολογισμός MIC και MBC

- ① Εξετάζουμε την θολερότητα των δειγμάτων και βρίσκουμε την MIC

MIC

- ② Από τα διαυγή δείγματα παίρνουμε 1ml και το στρώνουμε σε petri +LB άγαρ

- ③ Επώαση
12h
στους
37°C



Αποικίες

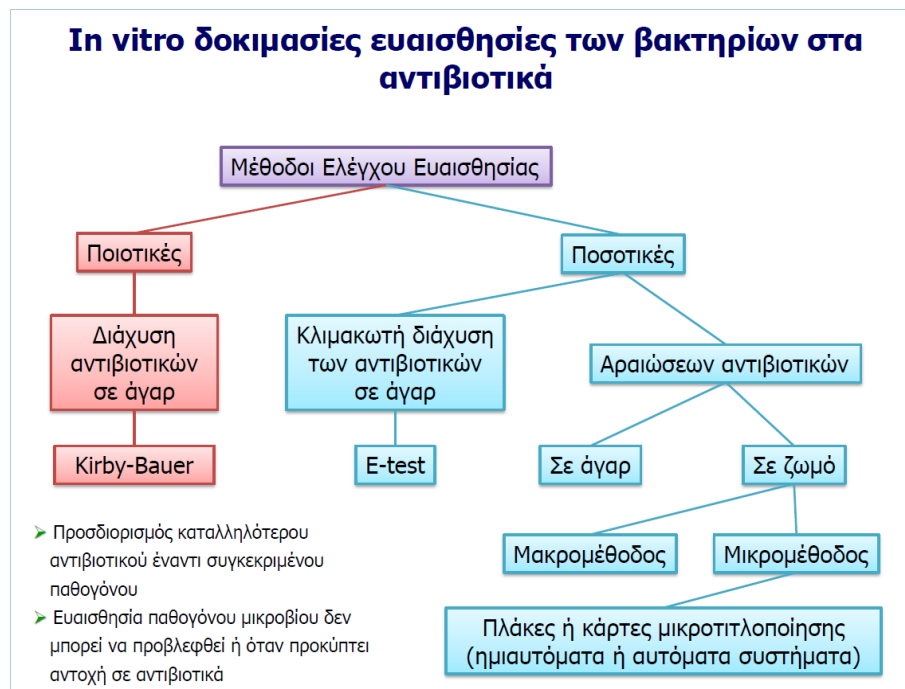
MBC

- ④ Εξέταση για αποικίες και εύρεση της MBC

Pour plate

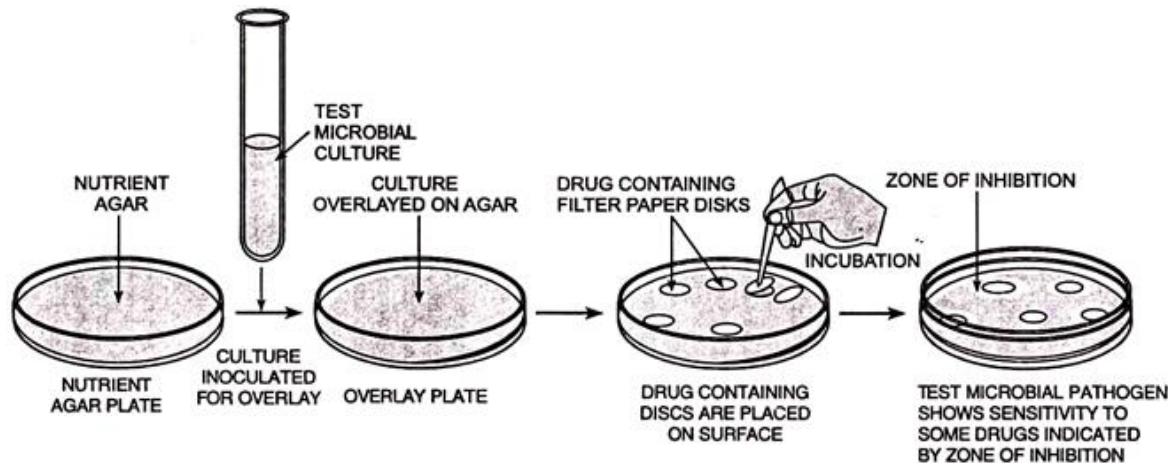


ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ



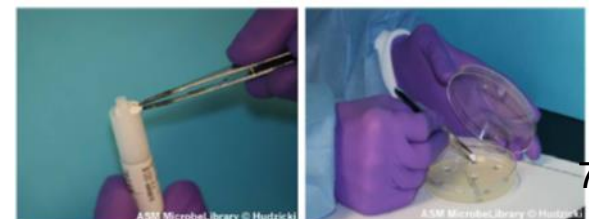
Επίδραση αντιβιοτικών σε οργανισμούς

Πειραματική διαδικασία – Μέθοδος παρεμπόδισης



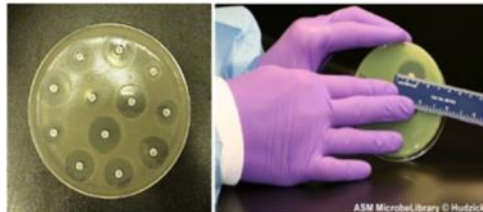
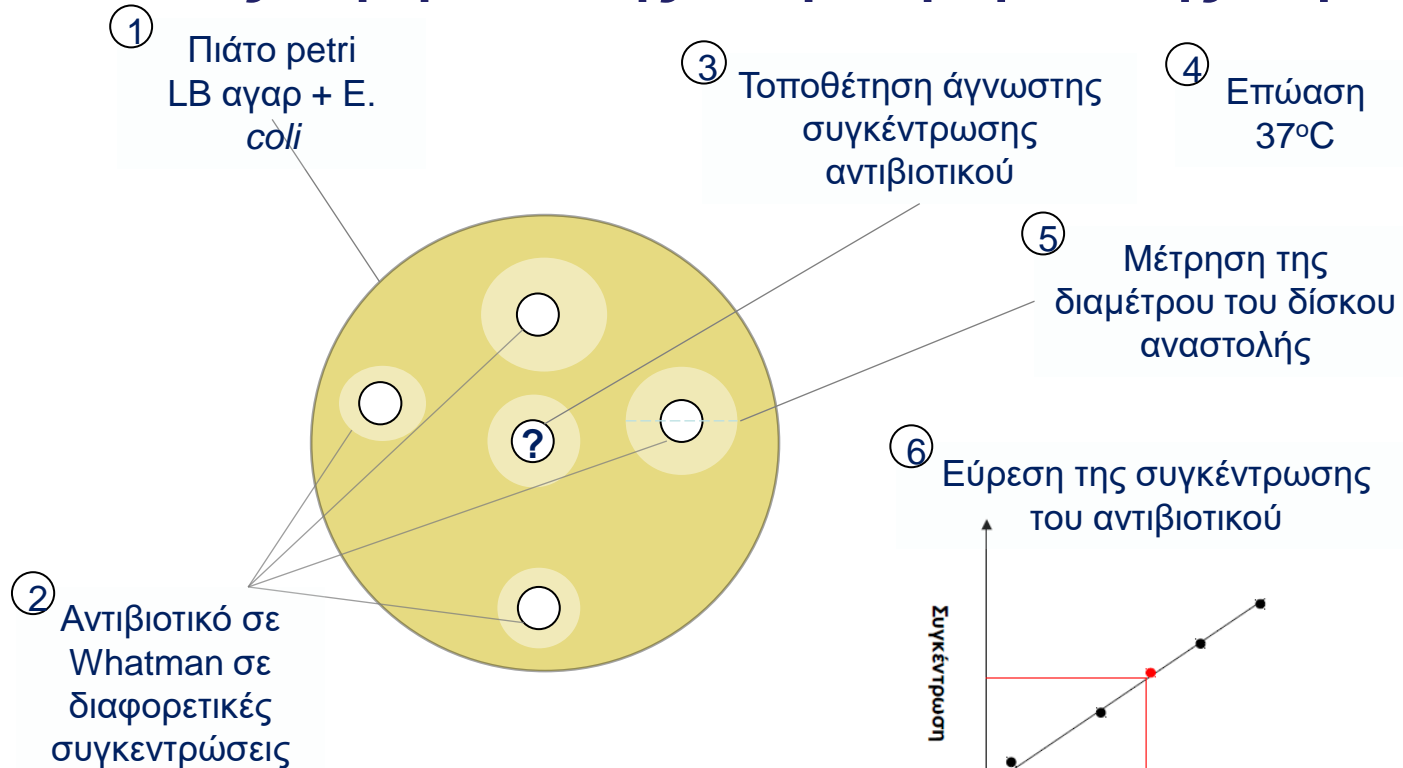
Μεγαλύτερη διάμετρος ζώνης αναστολής δεν σημαίνει και μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι του μικροοργανισμού καθώς η διάχυση του αντιβιοτικού εξαρτάται από:

- Συγκέντρωση αντιβιοτικού
- Μοριακό βάρος δραστικής ουσίας
- Ph & Υδατοδιαλυτότητα



Επίδραση αντιβιοτικών σε οργανισμούς

Μέθοδος παρεμπόδισης – εύρεση άγνωστης συγκέντρωσης



Επίδραση αντιβιοτικών σε οργανισμούς

Μέθοδος παρεμπόδισης

Ποια αντισηπτικά/απολυμαντικά αναστέλλουν την ανάπτυξη του *E. coli*;

