

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης- Αντιμικροβιακοί παράγοντες

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Είναι γνωστό ότι οι φυσικοχημικοί παράγοντες του περιβάλλοντος επηρεάζουν την αύξηση των μικροοργανισμών. Μελετώντας την αύξηση ενός μικροοργανισμού προσδιορίζουμε και αριστοποιούμε τις συνθήκες περιβάλλοντος με σκοπό την προώθηση της αύξησης του μικροβίου, η οποία πιθανά θα καλύψει στόχους όπως π.χ. απόδοση σε βιομάζα, απόδοση σε κάποιο προϊόν με υψηλή εμπορική αξία ή θα προσφέρει στη βασική έρευνα των φυσιολογικών λειτουργιών των οργανισμών.

Αντίθετα, ο περιορισμός της μικροβιακής αύξησης στην παραγωγή και διατήρηση των τροφίμων καθώς και στον έλεγχο ζωικών μολύνσεων έχει μεγάλη οικονομική και κλινική σημασία. Ο αποτελεσματικός έλεγχος της μικροβιακής αύξησης προϋποθέτει την κατανόηση του μικροβιακού μεταβολισμού και συγκεκριμένα των μηχανισμών που αφορούν στην παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων και στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά.

Ο περιορισμός της μικροβιακής αύξησης είναι δυνατό να γίνει με την αναστολή της αύξησης ή την πλήρη καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου. Η δράση των διαφόρων φυσικοχημικών αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αύξησης των μικροοργανισμών εξαρτάται από:

- α) το είδος του μικροοργανισμού,
- β) τη φυσιολογική κατάσταση του μικροοργανισμού,
- γ) το περιεχόμενο οργανικό υλικό του περιβάλλοντος,
- δ) άλλους παράγοντες όπως pH και θερμοκρασία.

Αντιβιοτικά

Ο ανταγωνισμός των μικροβιακών ειδών στο φυσικό περιβάλλον, συχνά επιβάλλει, την αναστολή της αύξησης του ενός από τον άλλο μικροβιακό πληθυσμό. Ένας πληθυσμός ενός μικροοργανισμού μπορεί να παράγει κάποια προϊόντα μεταβολισμού των υδρογονανθράκων όπως π.χ. αλκοόλες και οξέα τα οποία ελαχιστοποιούν την αύξηση άλλου είδους μικροβιακού πληθυσμού. Το ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται από άλλες μικροβιακές ομάδες όπως οι Στρεπτομύκητες οι οποίοι παράγουν περισσότερο πολύπλοκες βιοενεργές ενώσεις όπως είναι τα αντιβιοτικά.

Πολλά αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς λόγους είναι ιδιαίτερης σημασίας και έχουν απομονωθεί από ευρέως διαδεδομένα εδαφικά βακτήρια της οικογένειας των Ακτινοβακτηρίων. Έτσι, τα αντιβιοτικά ως φυσικά προϊόντα παράγονται από τις φαρμακοβιομηχανίες μέσω

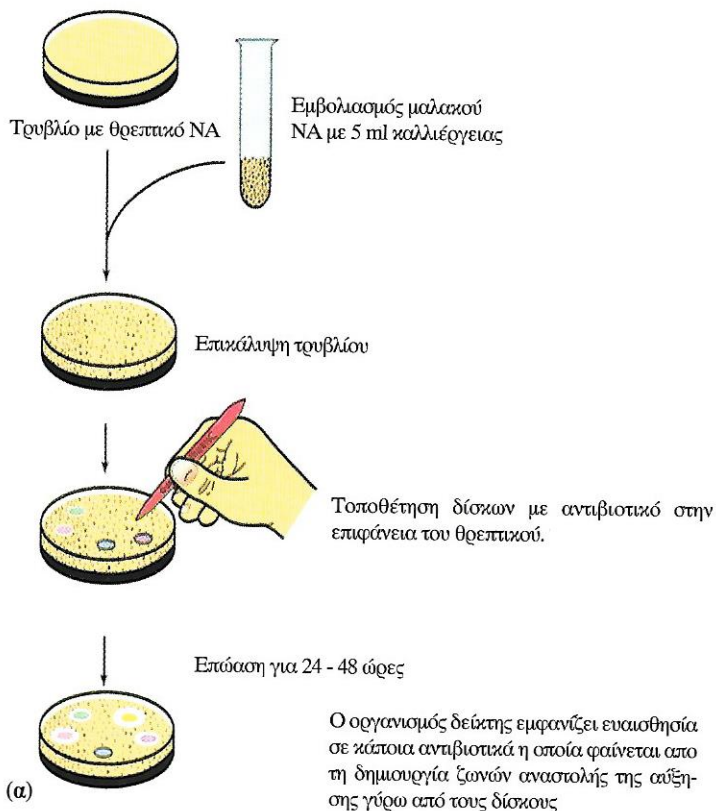
μικροβιακών διαδικασιών. Όταν υποστούν κάποια χημική τροποποίηση λέγονται **ημισυνθετικά αντιβιοτικά**. Ταξινομούνται με βάση τη χημική δομή τους, στις παρακάτω κατηγορίες: β-λακτάμες, μακρολίδες, τετρακυκλίνες, πολυπεπίδια, πολυαίνα και αμινογλυκοσίδια. Δρουν με τρεις βασικούς τρόπους: α) την αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, β) την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και γ) παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση και τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων.

Σε αυτή την άσκηση θα εξετάσετε την παραγωγή και ανασταλτική δράση κάποιων βιοενεργών ενώσεων, που παράγονται από στελέχη στρεπτομυκήτων, *in vitro*, έναντι μικροβιακών δεικτών. Οι μικροοργανισμοί δείκτες είναι συγκεκριμένα μικροβιακά στελέχη από την τράπεζα στελεχών American Type Culture τα οποία είναι ελεγμένα ως προς την ανθεκτικότητά τους σε διάφορα αντιβιοτικά, ώστε η διαδικασία ελέγχου παραγωγής βιοενεργού ένωσης να δίνει αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Βιοδοκιμή ελέγχου της ευαισθησίας των παθογόνων μικροοργανισμών έναντι των αντιβιοτικών

Πολλοί παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι ευαίσθητοι σε διάφορα αντιβιοτικά. Όπως αναφέρθηκε στα βακτήρια, στόχοι δράσης των αντιβιοτικών είναι το κυτταρικό τοίχωμα, η κυτοπλασματική μεμβράνη, οι διαδικασίες βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Τα αντιβιοτικά παρουσιάζουν επίσης εκλεκτική δράση ως προς το είδος των βακτηρίων και γι' αυτό διακρίνονται σε ευρέως φάσματος (εκείνα που δρουν έναντι των G^- και G^+ βακτηρίων) και περιορισμένου φάσματος (εκείνα που δρουν έναντι μόνο μίας ομάδας βακτηρίων).

Πριν τη χορήγηση (στις κλινικές περιπτώσεις) ενός αντιβιοτικού πρέπει να γίνεται έλεγχος της ισχύος (δράσης) του έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού. Για το λόγο αυτό συνήθως προσδιορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (ΕΣΑ) του αντιβιοτικού πάνω στην καλλιέργεια του εν λόγω παθογόνου μικροοργανισμού. Η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι γρήγορη, ακριβής και φθηνή. Μ' αυτή τη μέθοδο επιλέγεται το αντιβιοτικό που πρέπει να χορηγηθεί στον ασθενή από τον οποίο έγινε η μικροβιακή καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού. Επιπλέον είναι γνωστό ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας μεταφέρονται μέσω πλασμιδίων από στέλεχος σε στέλεχος (σύζευξη) με αποτέλεσμα την αυξανόμενη ανθεκτικότητα ως προς τα διάφορα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στις συνήθεις λοιμώξεις.

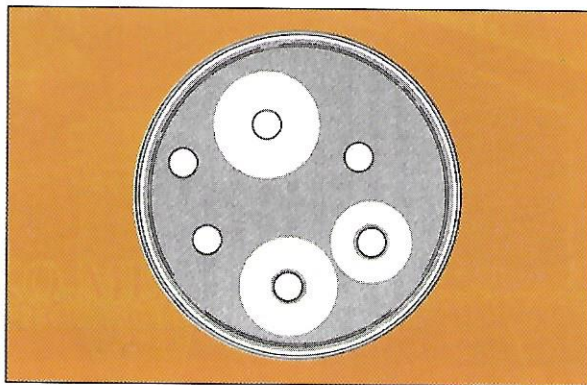


Το αντιβιογράμμα είναι ένα χρήσιμο εργαστηριακό εργαλείο προσδιορισμού της ευαισθησίας ενός κλινικού στελέχους ως προς τα διάφορα αντιβιοτικά. Η διαδικασία της μεθόδου έχει ως εξής: δίσκοι διηθητικού χαρτιού μικρής διαμέτρου (περίπου 6 mm) εμποτισμένοι με συγκεκριμένη συγκέντρωση κάποιου ή κάποιων αντιβιοτικού/ών τοποθετούνται πάνω σε καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού (Εικόνα 1).

Το αντιβιογράμμα είναι ένα χρήσιμο εργαστηριακό εργαλείο προσδιορισμού της ευαισθησίας ενός κλινικού στελέχους ως προς τα διάφορα αντιβιοτικά. Η διαδικασία της μεθόδου έχει ως εξής: δίσκοι διηθητικού χαρτιού μικρής διαμέτρου (περίπου 6 mm) εμποτισμένοι με συγκεκριμένη συγκέντρωση κάποιου ή κάποιων αντιβιοτικού/ών τοποθετούνται πάνω σε καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού (Εικόνα 1).

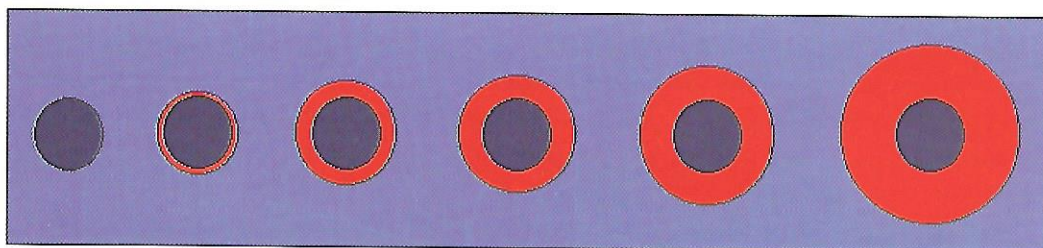
Εικόνα 1. (α) Εναπόθεση δίσκων αντιβιοτικών με αποστειρωμένη λαβίδα. (β) Σύστημα διανομής πολυδίσκων

Ο μικροοργανισμός επωάζεται κάτω από άριστες συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της αύξησής του, γύρω από τους δίσκους οι οποίοι περιέχουν ο καθένας και ένα διαφορετικό αντιβιοτικό, αναστέλλεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και γι' αυτό δημιουργούνται κυκλικές διαυγείς ζώνες (Εικόνα 2). Το μέγεθος των ζωνών αναστολής επηρεάζεται από το μέγεθος του εμβολίου, το χρόνο επώασης, τη θερμοκρασία, τη σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος, το pH, την αέριο φάση (ατμόσφαιρα), τη σταθερότητα του κάθε αντιβιοτικού κ.α. Απαιτείται λοιπόν να χρησιμοποιούνται προσεκτικά καθορισμένες συνθήκες για τη μείωση της επίδρασης των διαφόρων παραμέτρων.



Εικόνα 2. Ζώνες αναστολής της αύξησης λόγω της δράσης αντιβιοτικών με τα οποία είναι εμποτισμένοι οι δίσκοι διηθητικού χαρτιού.

Εφ' όσον βρεθεί το αντιβιοτικό στο οποίο είναι ευαίσθητος ο παθογόνος μικροοργανισμός, στη συνέχεια πρέπει να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (ΕΣΑ). Σ' αυτή την περίπτωση πάνω στην καλλιέργεια τοποθετούνται δίσκοι εμποτισμένοι σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου αντιβιοτικού (Εικόνα 3).



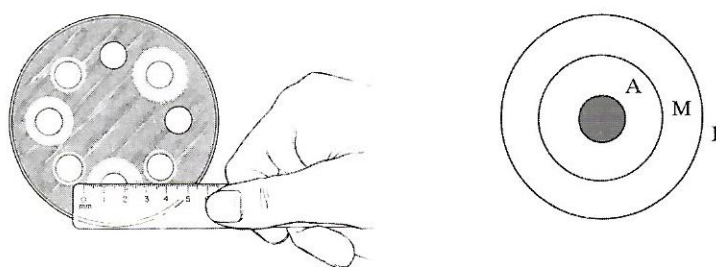
Εικόνα 3. Μορφή αντιβιογράμματος όταν οι ποσότητες του αντιβιοτικού στους δίσκους αυξάνονται από αριστερά προς τα δεξιά.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και ο βαθμός ευαισθησίας του μικροοργανισμού στα διάφορα αντιβιοτικά γίνεται είτε με σύγκριση της ζώνης αναστολής, με τη ζώνη αναστολής που παράγεται από ένα πρότυπο μικροβιακό δείκτη, είτε βάση ενός πίνακα (Πίνακας 1) στον οποίο αναφέρονται οι διαμέτροι της ζώνης αναστολής σε αυστηρά καθορισμένες συνθήκες σύμφωνα με το σχήμα της Εικόνας 4.

Σ' αυτή την άσκηση θα εξετάσετε τη διαφορετική ευαισθησία G^+ και G^- βακτηρίων ως προς κάποια αντιβιοτικά καθώς και τη διαφορετική ευαισθησία κλινικών, εδαφικών και εργαστηριακών στελεχών ως προς τα ίδια αντιβιοτικά.

Πίνακας 1. Εμφάνιση ζωνών αναστολής σε καλλιέργειες μικροβιακών δεικτών.

	Συνομογραφία	Ανθεκτικό (Α) (mm ή λιγότερο)	Ενδιάμεσο (Μ) (mm)	Ευαίσθητο (Ε) (mm ή περισσότερα)
Τετρακυκλίνη	TE	14	15 - 18	19
Πενικιλίνη	P	20	21 - 28	29
Νεομυκίνη	N	13	14 - 17	18



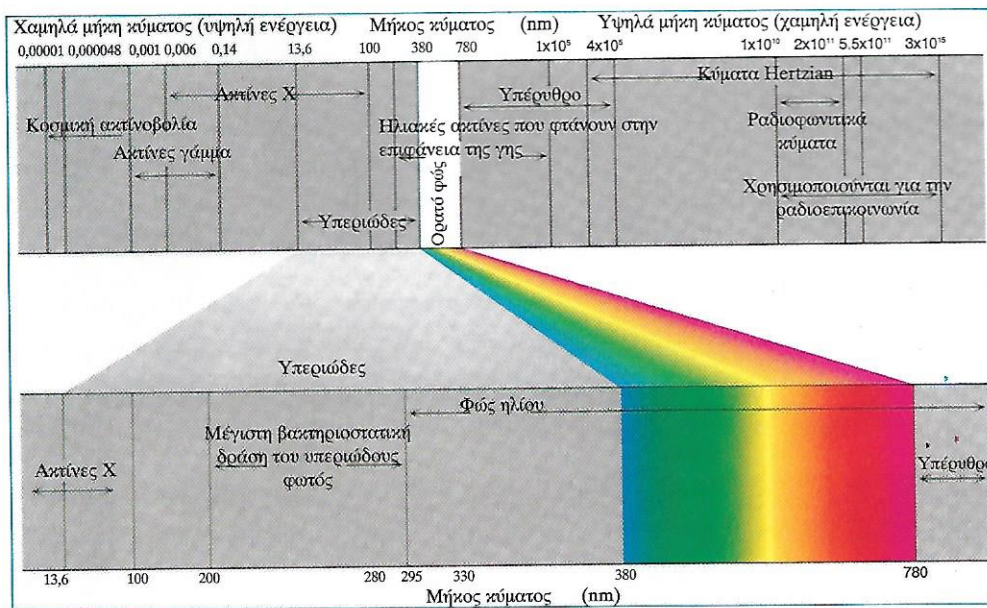
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση των ζωνών αναστολής. Α= Ανθεκτικό, ζώνη αναστολής με διάμετρο ίση ή μικρότερη του δίσκου. Μ= Ενδιάμεσο, ζώνη αναστολής με διάμετρο μεγαλύτερη του εσωτερικού αλλά μικρότερη του εξωτερικού κύκλου. Ε=Ευαίσθητο, ζώνη αναστολής με διάμετρο μεγαλύτερη του εξωτερικού κύκλου.

Υπεριώδης Ακτινοβολία

Αρκετά μήκη κύματος του ορατού φωτός είναι ωφέλιμα για ορισμένους μικροοργανισμούς, ενώ το ηλιακό φως είναι συνήθως επιβλαβές για τα περισσότερα βακτήρια. Αυτό οφείλεται κυρίως στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV), μεταξύ 136 και 400 nm, μήκος κύματος (Εικόνα 5). Για τους περισσότερους μικροοργανισμούς η κορυφή κοντά στα 265 nm είναι τοξικότερη, γιατί η ακτινοβολία τέτοιου μήκους κύματος δημιουργεί δεσμούς ανάμεσα σε γειτονικά μόρια των πυριμιδικών βάσεων (κυρίως της θυμίνης) σε μία αλυσίδα του DNA, ή μερικές φορές και ανάμεσα στις διαφορετικές αλυσίδες. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία προβλημάτων στην αντιγραφή και τη λειτουργία των μορίων DNA, το κύτταρο δε μπορεί να αναπαραχθεί και νεκρώνεται. Η υπεριώδης ακτινοβολία του ήλιου (295 - 400 nm) έχει σχετική μικροβιοκτόνο δράση αλλά κυρίως μεταλλαξογόνο (καρκίνος του δέρματος). Οι μικροοργανισμοί προστατεύονται από αυτή τη δράση της ακτινοβολίας μέσω χρωστικών όπως ο άνθρωπος με τη μελανίνη. Η υπεριώδης ακτινοβολία δε διαπερνά τα υλικά σώματα. Χρησιμοποιείται στα διάφορα μικροβιολογικά εργαστήρια για την αποστείρωση ορών, εμβολίων, νερού, υδατικών αποβλήτων, αερίων, επιφανειών και εργαλείων των νοσοκομείων.

Η βακτηριοστατική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας μειώνεται με άμεση έκθεση της καλλιέργειας στο ορατό φως (365-400 nm). Το φαινόμενο αυτό καλείται φωτοεπανεργοποίηση (photoactivation).

Σ' αυτή την άσκηση θα παρατηρήσετε τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας στην αύξηση μικροβιακής καλλιέργειας.



Εικόνα 5. Ενεργειακό φάσμα ακτινοβολίας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

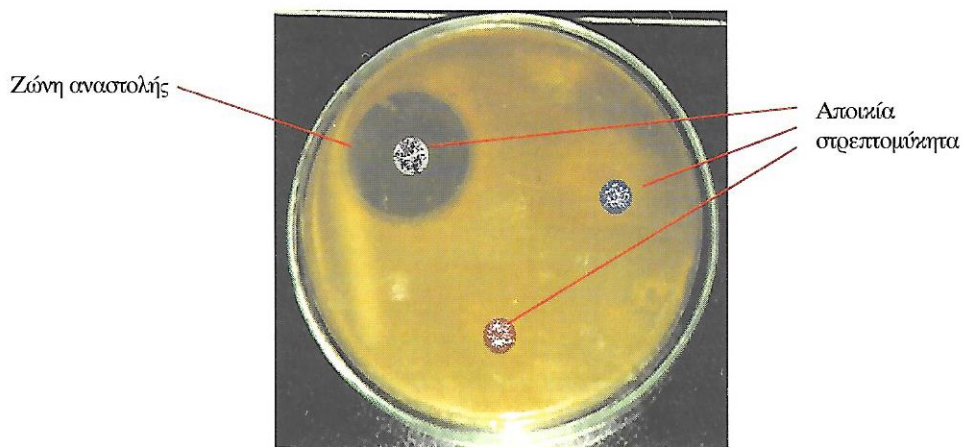
Αντιζέμενα	Θρεπτικά Υποστρώματα	Μικροοργανισμοί
Κωνικές φιάλες	Θρεπτικός ζωμός σε στερεά μορφή [Nutrient Agar (NA)]	<i>E. coli</i>
Σιφόνιο (1 ml)	Θρεπτικό Μαλακό Άγαρ (Soft Nutrient Άγαρ)	<i>P. putida</i>
Δίσκοι αντιβιοτικών		<i>B. subtilis</i>
Αποστειρωμένα αλουμινόχαρτα (διαστάσεων 10 cm x 10 cm)		<i>Streptomyces sp.</i>
Λάμπα UV		<i>A. nidulans</i>
Γυάλινα και πλαστικά τρυβλία Petri		

Διαδικασία Εκτέλεσης της Άσκησης

Μέρος Πρώτο

Παραγωγή βιοενεργών ενώσεων από ενδογενή μικροβιακά στελέχη στρεπτομυκήτων και εκτίμηση της ανασταλτικής δραστηριότητάς τους *in vitro* ως προς την αύξηση μικροβιακών δεικτών (*E. coli*, *B. subtilis*, *A. niger*).

- Σας δίνονται τρία τρυβλία με καλλιέργειες 36 ωρών, των 28°C, (δε θα πρέπει να έχουν σχηματιστεί σπόρια) ενός στελέχους *Streptomyces sp.* πάνω σε θρεπτικό άγαρ (NA). Ο εμβολιασμός έγινε σε τρία σημεία του τρυβλίου με 3 σταγόνες 50 μl εναιωρήματος σπορίων στρεπτομυκήτων.
- Τοποθετώντας το τρυβλίο ανεστραμμένο πάνω στον πάγκο εργασίας ανοίξετε ασηπτικά το τρυβλίο και προσθέστε 1 ml χλωροφορμίου μέσα στο καπάκι και στη συνέχεια κλείστε το τρυβλίο.
- Περιμένετε 30 λεπτά της ώρας ώστε να νεκρωθούν τα αναπτυσσόμενα μυκήλια του *Streptomyces sp.*
- Ετοιμάστε 3 κωνικές με 20 ml θρεπτικού μαλακού άγαρ (1 % άγαρ) σε κάθε κωνική φιάλη.
- Εμβολιάστε με 1 ml πυκνού εναιωρήματος καλλιέργειας *E. coli* την πρώτη κωνική, *B. subtilis* τη δεύτερη κωνική και *A. niger* την τρίτη κωνική.
- Στη συνέχεια καλύψτε με το μίγμα (μαλακό άγαρ-μικροοργανισμός) την επιφάνεια της καλλιέργειας του στρεπτομύκητα που έχει νεκρωθεί.
- Παρατηρήστε την παραγωγή της βιοενεργού ένωσης που έχει παραχθεί από το στρεπτομύκητα και εκτιμήστε τη δράση της, μέσω των ζωνών αναστολής που σχηματίζονται ως προς την *E. coli* (G⁻), το *B. subtilis* (G⁺) και τον ευκαρυωτικό οργανισμό *A. niger*. Συγκρίνετε τη διάμετρο της ζώνης αναστολής (Εικόνα. 6).



Εικόνα 6. Δημιουργία ζώνης αναστολής λόγω παραγωγής αντιμικροβιακής ένωσης από την αποικία του στρεπτομύκητα.

Μέρος Δεύτερο

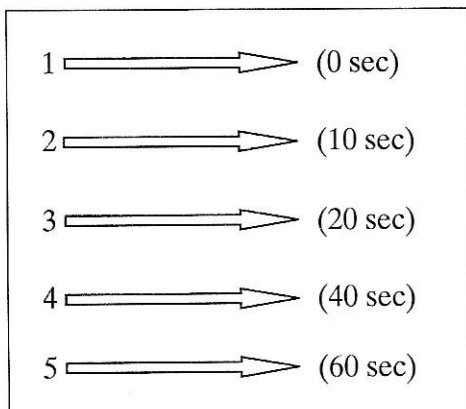
Προσδιορισμός της ευαισθησίας ενός κλινικού (*P. putida*), ενός εδαφικού (*E. coli*) και ενός εργαστηριακού (*Bacillus subtilis*) στελέχους ως προς τα αντιβιοτικά Πενικιλίνη, Νεομυκίνη και Τετρακυκλίνη.

- Ετοιμάστε 3 τρυβλία με θρεπτικό άγαρ (NA) όπως στην άσκηση 2 (ζυγίστε, αποστειρώστε και διαμοιράστε το θρεπτικό υπόστρωμα στα τρυβλία).
- Εμβολιάστε κάθε τρυβλίο με 1 ml πυκνού εναιωρήματος *P. putida*, *E. coli*, *B. subtilis* αντίστοιχα (ανακινήστε ελαφρά το τρυβλίο ώστε το εμβόλιο να απλωθεί σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου).
- Τοποθετήστε τους εμποτισμένους δίσκους των αντιβιοτικών πάνω στην επιφάνεια του άγαρ με μία αποστειρωμένη λαβίδα ή με το σύστημα διανομής πολυδίσκων [Εικόνα 1 (β)].
- Πιέστε ελαφρά (με μία αποστειρωμένη λαβίδα ή με τον κρίκο εμβολιασμού ή με μία αποστειρωμένη βελόνα) τον κάθε δίσκο πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού άγαρ ώστε η επαφή να είναι πλήρης.
- Εντός 15 λεπτών μετά την εφαρμογή των δίσκων πάνω στο άγαρ επώαστε τα τρυβλία στους 28°C.
- Μετά από επώαση 24 ωρών μετρήστε τη διάμετρο της ζώνης αναστολής (όπως στην Εικόνα 4) και αξιολογήστε τα αποτελέσματα σύμφωνα με τον Πίνακα 1.
- Δικαιολογήστε τη δράση του κάθε αντιβιοτικού ως προς τον κάθε μικροοργανισμό χωριστά.

Μέρος Τρίτο

Θα παρατηρήσετε τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στην αύξηση μίας βακτηριακής καλλιέργειας και τη σχέση του χρόνου έκθεσης σε UV ως προς τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών.

- Σας δίνεται αραιωμένο δείγμα (30-300 κύτταρα/ml) από υγρή καλλιέργεια 24 ωρών του βακτηρίου *E. coli*
- Ετοιμάστε 5 τρυβλία με θρεπτικό άγαρ (ζυγίστε, αποστειρώστε, διαμοιράστε).
- Αριθμήστε τα τρυβλία από 1 έως 5 και σημειώστε το χρόνο έκθεσης κάθε τρυβλίου στην ακτινοβολία UV.



- Εναποθέστε σε κάθε τρυβλίο 0,3 ml υγρής καλλιέργειας. Με τη χρήση διανομέα απλώστε το εμβόλιο πάνω στο θρεπτικό άγαρ. Το τρυβλίο Νο 1 θα αποτελέσει το θετικό μάρτυρα.
- Τοποθετείστε τα τρυβλία 2, 3, 4 και 5 σε μία σειρά στο θάλαμο κάτω από το υπεριώδες φως το οποίο είναι κλειστό.
- Αφαιρέστε τα καπάκια των τρυβλίων και συγχρόνως ανοίξτε τη λάμπα UV.
- Μετά την παρέλευση του απαιτούμενου χρόνου έκθεσης **για κάθε τρυβλίο** τοποθετήστε το καπάκι πάνω σε κάθε τρυβλίο και στη συνέχεια απομακρύνετε το τρυβλίο από την ακτινοβολία UV.
- Επωάζετε τα τρυβλία στους 28° C για 48 ώρες.
- Μετά την επώαση, μετρήστε τις αποικίες σε κάθε τρυβλίο. Προσδιορίστε τον αριθμό βιώσιμων μονάδων (cfu) ανά 1 ml εμβολίου και βρείτε τον αριθμό βιώσιμων μονάδων (ABM) ανά ml αρχικής καλλιέργειας.
- Συμπληρώστε τον Πίνακα 2, σχεδιάστε σε γραφική παράσταση τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων ανά ml μετά την ακτινοβολία με UV και συσχετίστε το με το χρόνο έκθεσης.
- Αξιολογήσατε, συζητήσατε και ερμηνεύσατε τα αποτελέσματα σας.

Πίνακας 2. Επίδραση της ακτινοβολίας UV στο μικροβιακό πληθυσμό της *E. coli*.

Χρόνος Έκθεσης σε UV (sec)	Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων (ABM)	% Βιωσιμότητα
0		
10		
20		
40		
60		