

ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΠΡΟΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ  
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ»**

**«PREREQUISITES FOR THE EVALUATION OF ANTIMICROBIAL  
ACTIVITY»**

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΛΟΓΙΑΝΝΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ

ΜΑΡΚΟΥΤΖΗ ΕΛΕΝΗ

ΜΠΑΧΤΣΕΒΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΟΦΙΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 2020

# ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ - ΔΟΜΗ

- Σκοπός της παρούσας έρευνας
- Βήματα και Μεθοδολογία που ακολουθήθηκαν
- Αποτελέσματα και Προβληματισμοί
- Συμπεράσματα

# ΣΚΟΠΟΣ - ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ

- Αρχικός σκοπός ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης ενώσεων συναρμογής μετάλλων με αντιβιοτικά.
- Αναπροσαρμοσμένος σκοπός εργαστηριακή προετοιμασία:
  - διερεύνηση εργαστηριακών **αστοχιών**
  - ενδεδειγμένη και τεκμηριωμένη **αντιμετώπισή** τους
- Σπουδαιότητα:
  - Επιλογή στρατηγικής βάσει παρατηρήσεων και θεωρητικών δεδομένων
  - Εξοικείωση με την εργαστηριακή πράξη
  - Υιοθέτηση και εκμάθηση μικροβιολογικών εργαστηριακών τεχνικών
  - Συσχέτιση της εργαστηριακής εμπειρίας με εφαρμογές ασφάλειας τροφίμων

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Για την αποτελεσματική **αξιολόγηση** της αντιμικροβιακής δράσης πρέπει:

- Να ακολουθηθούν καθορισμένα **βήματα** επεξεργασίας
- Να προκύψουν αμιγείς **καλλιέργειες** μικροοργανισμών
- Να πραγματοποιηθούν οι κατάλληλες **μετρήσεις**

➤ **Αντιβιοτικό**: φάρμακο, δρα με στόχο την **θεραπεία** ή **πρόληψη** βακτηριακών λοιμώξεων



*Η μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης ενός αντιβιοτικού, γίνεται με τον δείκτη **MIC**, δηλαδή της μικρότερης δυνατής ποσότητας αντιβιοτικού που χρειάζεται για να καταστείλει την ανάπτυξη του παράγοντα φλεγμονής*

# Πειραματική διαδικασία

## ΒΗΜΑΤΑ

Παρασκευή  
θρεπτικών  
υποστρωμάτων

Αποστείρωση

Αποθήκευση  
Επανάληψη

Εμβολιασμός

Επώαση  
Συντήρηση

Αντιμετώπιση  
σφαλμάτων

Διαλυτοποίηση,  
διαδοχικές  
αραιώσεις

Ωστόσο, ενέχουν **σφάλματα** στα βήματα αυτά που αν δεν διευθετηθούν θα οδηγήσουν σε αδυναμία αξιολόγησης και απόδοσης της πειραματικής έρευνας

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΣΥΣΤΑΣΗ ΓΙΑ 100ml
<b>Nutrient broth</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>S. aureus</li><li>B. subtilis</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Peptone 0.5gr</li><li>Meat extract 0.3gr</li><li>Άγαρ 2gr</li></ul>
<b>Luria-broth</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>E. coli</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Tryptone 1gr</li><li>Yeast extract 0.5gr</li><li>NaCl 1gr</li><li>Άγαρ 2gr</li></ul>
<b>Yeast and Mold broth</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>X. campestris</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Yeast extract 0.3gr</li><li>Malt extract 0.3gr</li><li>Peptone 0.5gr</li><li>Dextrose 1g</li><li>Άγαρ 2gr</li></ul>
<b>Mueller-Hinton broth</b>	Για όλα τα μικροβιακά στελέχη	21gr σκόνης σε 1L απιονισμένο νερό

- **Πεπτόνη, Τρυπτόνη:** Πηγή πρωτεϊνών
- **Εκχύλισμα Κρέατος:** Μίγμα θρεπτικών
- **Χλωριούχο Νάτριο:** Πηγή νατρίου
- **Εκχύλισμα μαγιάς:** Πηγή άνθρακα

# ΑΠΟΤΥΧΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΕΡΕΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ



Για την δημιουργία των στερέων θρεπτικών υποστρωμάτων προστίθεται ένας πηκτικός παράγοντας, κυρίως άγαρ ή ζελατίνη.

➤ Μικρό ποσοστό επιτυχημένων υποστρωμάτων

**ΑΙΤΙΑ:** Ανεπιτυχής ομογενοποίηση άγαρ με τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά

## Άγαρ Χαρακτηριστικά:

- Μίγμα πολυσακχαριτών **αγαρόζη-αγαροπηκτίνη**
  - Σημείο **πήξης**: 40-45° C
  - Σημείο **τήξης**: 80-100° C
  - **Συγκέντρωση** στα υδατικά διαλύματα 1-1,5%
- Το διαλυμένο άγαρ μετά την ψύξη σχηματίζει **γέλη**
- Μετά την αποστείρωση (20' στους 121° C), το άγαρ εντοπίστηκε στον **πυθμένα** του δοχείου

# ΕΠΙΛΥΣΗ

Για να διασφαλιστεί η ομογενής κατανομή του άγαρ δύο **στρατηγικές** επιστρατεύτηκαν:

1. Θερμαινόμενη **ανάδευση** μέχρι την οπτική διαύγαση του διαλύματος, διαλυτοποίηση άγαρ
2. **Μετά** την αποστείρωση **ανάδευση** με μεταλλικό αναδευτήρα πριν την καθίζηση στον πυθμένα

Έπρεπε να γίνει:

- **Επανάληψη** παρασκευής υγρών καλλιεργειών
- Σωστή **ομογενοποίηση** συστατικών
- **Πήξη** υπό κεκλιμένο επίπεδο

οι οδηγίες παρασκευής **τροποποιήθηκαν** αναλόγως με αποτέλεσμα να μην παρουσιαστούν αντίστοιχα προβλήματα σε επόμενες καλλιέργειες

# ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ



Στόχος ήταν η δημιουργία μιας **καινούριας** αποθήκης αποικιών των μικροοργανισμών, ξεκινώντας με τον εμβολιασμό από την προηγούμενη διαθέσιμη αποθήκη του εργαστηρίου

## **ΑΙΤΙΕΣ:**

1. Λανθασμένο εμβολιασμό
2. Μικρή βιωσιμότητα του οργανισμού
3. Πρόβλημα κατά τη διαδικασία της επώασης

Το παλαιό απόθεμα που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να προκάλεσε:

- **Έλλειψη** θρεπτικών συστατικών
- Είσοδο στην **VBNC** κατάσταση
- **Απώλεια** καλλιεργησιμότητας



# VBNC ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Οι μικροοργανισμοί κατά την έκθεση τους σε αντίξοες για την ανάπτυξή τους συνθήκες εισέρχονται σε μια κατάσταση μεταβολισμού η οποία ονομάζεται βιώσιμη αλλά μη καλλιεργούμενη.

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Αντιβιοτικά

Θερμοκρασία

Έλλειψη  
θρεπτικών  
συστατικών

Χλωρίωση

Αλλαγές στο pH

Διάφορες  
εντάσεις λευκού  
φωτός

Οξυγόνο

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Χαμηλή **μεταβολική**  
δραστηριότητα

**Ανθεκτικότητα** σε  
αντιμικροβιακά

Μικρότερη  
μορφολογία

Μειωμένη **μεταφορά**  
θρεπτικών  
συστατικών

Αλλαγές στη  
**σύνθεση πρωτεϊνών**

Αλλαγές στην  
**αντιγραφή του DNA**

Αλλαγές στο  
**ριβοσωμικό**  
περιεχόμενο

**Θάνατος** => Λύση  
των κυττάρων και  
απώλεια της δομής  
τους

**VBNC** => Υπάρχει  
βιωσιμότητα των  
κυττάρων αλλά δεν είναι  
δυνατή η καλλιέργειά  
τους

Θεωρείται, από τους ερευνητές, ως η μοναδική **στρατηγική επιβίωσης** των μικροοργανισμών στις αντίξοες συνθήκες

# ΕΠΙΛΥΣΗ

Σε αυτήν την περίπτωση επιχειρήθηκε να αντιμετωπιστούν και τα τρία ενδεχόμενα με την επανάληψη της διαδικασίας

**Πρωταρχικός σκοπός:** η **αναζωογόνηση** των μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών, έξοδος από την VBNC κατάσταση

## **Βήμα αναζωογόνησης:**

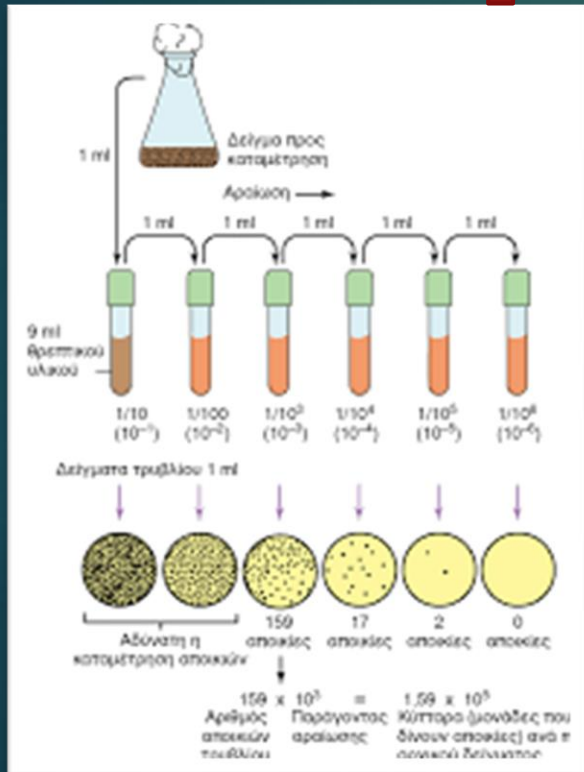
- Ενοφθαλισμός υγρής καλλιέργειας
- Ενοφθαλισμός των στερεών καλλιεργειών, εναρκτήριες καλλιέργειες

**Δευτερεύον σκοπός:** Επανάληψη διαδικασίας με μεγαλύτερη προσοχή σε:

- Εμβολιασμό
- Επώαση- Χειρισμούς

# ΑΝΑΖΩΟΓΟΝΗΣΗ

Η ικανότητα οποιουδήποτε μικροοργανισμού να **ξεπεράσει** την μη καλλιεργήσιμη κατάσταση και να επιστρέψει σε μια μεταβολικά ενεργή και καλλιεργήσιμη κατάσταση.



Οι ερευνητές προσπαθούν να διαχωρίσουν το ενδεχόμενο αναζωογόνησης λόγω ύπαρξης υπολειμμάτων καλλιεργήσιμων κυττάρων από την αναζωογόνηση των κατεσταλμένων κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται, συνήθως με τη **μέθοδο της αραίωσης**, όπου οι πληθυσμοί στην κατάσταση VBNC αραιώνονται σε τέτοιο βαθμό, ώστε η παρουσία οποιονδήποτε καλλιεργήσιμων κυττάρων να μην είναι εφικτή.

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΖΩΟΓΟΝΗΣΗΣ

- Απομάκρυνση του στρες ή άγχους
- Εμπλουτισμός με θρεπτικά συστατικά, κυρίως με τη μορφή υγρών καλλιεργειών
- Παράγοντας προαγωγής αναζωογόνησης *Rpf*

**Παράθυρο ανάνηψης:**  
Είναι το χρονικό περιθώριο εντός του οποίου μπορεί να πραγματοποιηθεί η αναζωογόνηση, μετά το πέρας του οποίου τα κύτταρα τελικά πεθαίνουν

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Παρασκευή **ανομοιογενούς** στερεού θρεπτικού υποστρώματος πηκτής με χρήση άγαρ
  - Η απλή ανάδευση πριν την αποστείρωση δεν είναι αρκετή
  - Αν μετά την αποστείρωση δεν αναδευτεί, δημιουργείται πηκτή ιδιαιτέρως υψηλού ιξώδους στον πυθμένα

## ΕΠΙΛΥΣΗ

- Τήξη και ομογενοποίηση του άγαρ (πριν την αποστείρωση)
- Ανάδευση του διαλύματος (μετά την αποστείρωση)

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Αδυναμία **ανάπτυξης** των μικροοργανισμών στα θρεπτικά
  - Εισέρχονται στην VBNC κατάσταση
  - Λανθασμένοι χειρισμοί

## ΕΠΙΛΥΣΗ

- Αναζωογόνηση και Επανάληψη
- Επιτυχής έκβαση επιβεβαίωσε την υπόθεση για είσοδο στην VBNC κατάσταση.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



- i. **Bogosiana G., Bourneuf E. V., 2001.** A matter of bacterial life and death, EMBO Reports
- ii. **Brock T.D., 1978.** Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures, Εκδόσεις: Springer, σσ 12-65
- iii. **Das B., Patra S. 2017.** Chapter 1 – Antimicrobials: Meeting the Challenges of Antibiotic Resistance Through Nanotechnology. Nanostructures for Antimicrobial Therapy, σσ 1-22
- iv. **Dong K., Pan H., Yang D., Rao L., Zhao L., Wang Y., Liao X., 2019.** Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms, COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY, σσ 149-172
- v. **G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case. 2016.** Εισαγωγή στη Μικροβιολογία, Εκδόσεις: Broken Hill, 12η έκδοση, σσ 27-50
- vi. **Gifflin J. D., D'Amore A.P., 1982.** Culture of retinal capillary cells using selective growth media, σσ74-80
- vii. **Haldeman D. L., Amy P. S., Ringelberg D., White D. C., Garen R. E., Ghiorse W. C., 1995.** Microbial growth and resuscitation alter community structure after perturbation, FEMS, σσ 27-37
- viii. **Hasman H., Bjerrum M. J., Christiansen L.E., Brunn Hansen H. C., Aerestrup F.M., 2009.** The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media, σσ 20-24
- ix. **Juhas M., Reub D.R., Zhu B., Commichau F.M., 2014.** Bacillus subtilis and Escherichia coli essential genes and minima cell factories after one decade of genome engineering. Microbiology. Τόμ. 160, σσ 2341-2351
- x. **Kang D.H., Siragusa G.R., 2001.** A rapid twofold dilution method for microbial enumeration and resuscitation of uninjured and sublethally injured bacteria,
- xi. **Kaushik N., 2014,** Pre-analytical errors: their impact and how to minimize them
- xii. **Li L., Mendis N., Trigui H., Faucher S. P., Oliver J.D., 2014.** The viable but nonculturable state and cellular resuscitation
- xiii. **Murgel G. A., Lion L. W., Acheson C., Shuler M. L., Emerson D., Ghiorse W. C., 1991.** Experimental apparatus for selection of adherent microorganisms under stringent growth conditions, American Society for Microbiology Journals
- xiv. **Özkanca R., Saribiyik F., Isika K., Sahina N., Karıptasc E., Flint K.P.** Resuscitation and quantification of stressed Escherichia coli K12 NCTC8797 in water samples, Τόμ. 2, σσ 212-220
- xv. **R. Hilal- Dandan, L.L. Brunton. 2014.** Η Φαρμακολογική Βάση της Θεραπευτικής, , Εκδόσεις: Broken Hill, 2η έκδοση, σσ 15-102
- xvi. **Ramamurthy T., Ghosh A., Pazhani G. P., Shinoda S., 2014.** Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria, Front. Public Health,
- xvii. **Salvino D'Amico, Tony C., Marx J.C., Feller G., Gerday C., 2006.** Psychrophilic microorganisms: challenges for life, EMBO
- xviii. **Trevors J.T, 2011.** Journal of Microbiological Methods, Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells, Εκδόσεις: Elsevier, σσ 266-273
- xix. **Upreti S. , Bansal R., Jeelani N., Bharat V., 2013,** Types and Frequency of Preanalytical Errors in Haematology Lab, σσ 2491-2493
- xx. **Vicente J. G., Holub E. B., 2013.** Xanthomonas campestris pv. Campestris (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. Molecular Plant Pathology. Τόμ. 14, σσ 2-18
- xxi. **Βικιπέδια, η ελεύθερη εγκυκλοπαίδεια, 2020, λύμα: Μικροοργανισμός.** Διαθέσιμο στον διαδικτυακό τόπο: (<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B9%CE%BA%CF%81%CE%BF%CE%BF%CF%81%CE%B3%CE%B1%CE%BD%CE%B9%CF%83%CE%BC%CF%8C%CF%82>). Τελευταία ενημέρωση 26 Μαρτίου 2020, (Πρόσβαση στις 15/7/2020)
- xxii. **Βικιπέδια, η ελεύθερη εγκυκλοπαίδεια, 2020. Λύμα: Αντιβιοτικό.** Διαθέσιμο στον διαδικτυακό τόπο: (<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BD%CF%84%CE%B9%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8C>). Τελευταία ενημέρωση 21 Ιανουαρίου 2020, (Πρόσβαση στις 17/7/2020)
- xxiii. **Κάππος Π. Α., 2016.** Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά, , σσ25-65
- xxiv. **Σκεπαστιανός Π., Καραμητρούσης Ε., 2012,** Θρεπτικά υποστρώματα και μεταβολισμός μικροθρεπτικών, Εκδόσεις: University Studio Press, σσ 31-91

A laboratory setting featuring a microscope on the left and a person wearing blue gloves holding a test tube on the right. The background is softly blurred, showing a person in a white lab coat. The text "Σας ευχαριστούμε" is overlaid in the center in a red, cursive font. A solid red rectangle is located in the top right corner.

*Σας ευχαριστούμε*