



ΓΕΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΣΧΟΛΗ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΣ: ΔΡ. ΓΚΙΑΟΥΡΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ

5^η θεματική ενότητα:

Μικροβιακή αύξηση και περιβαλλοντικές επιδράσεις



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό διατίθεται με τους όρους χρήσης Creative Commons (CC) – Αναφορά Δημιουργού – Μη Εμπορική Χρήση – Όχι Παράγωγα Έργα.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, διαγράμματα, κείμενα, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αιγαίου**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.



- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



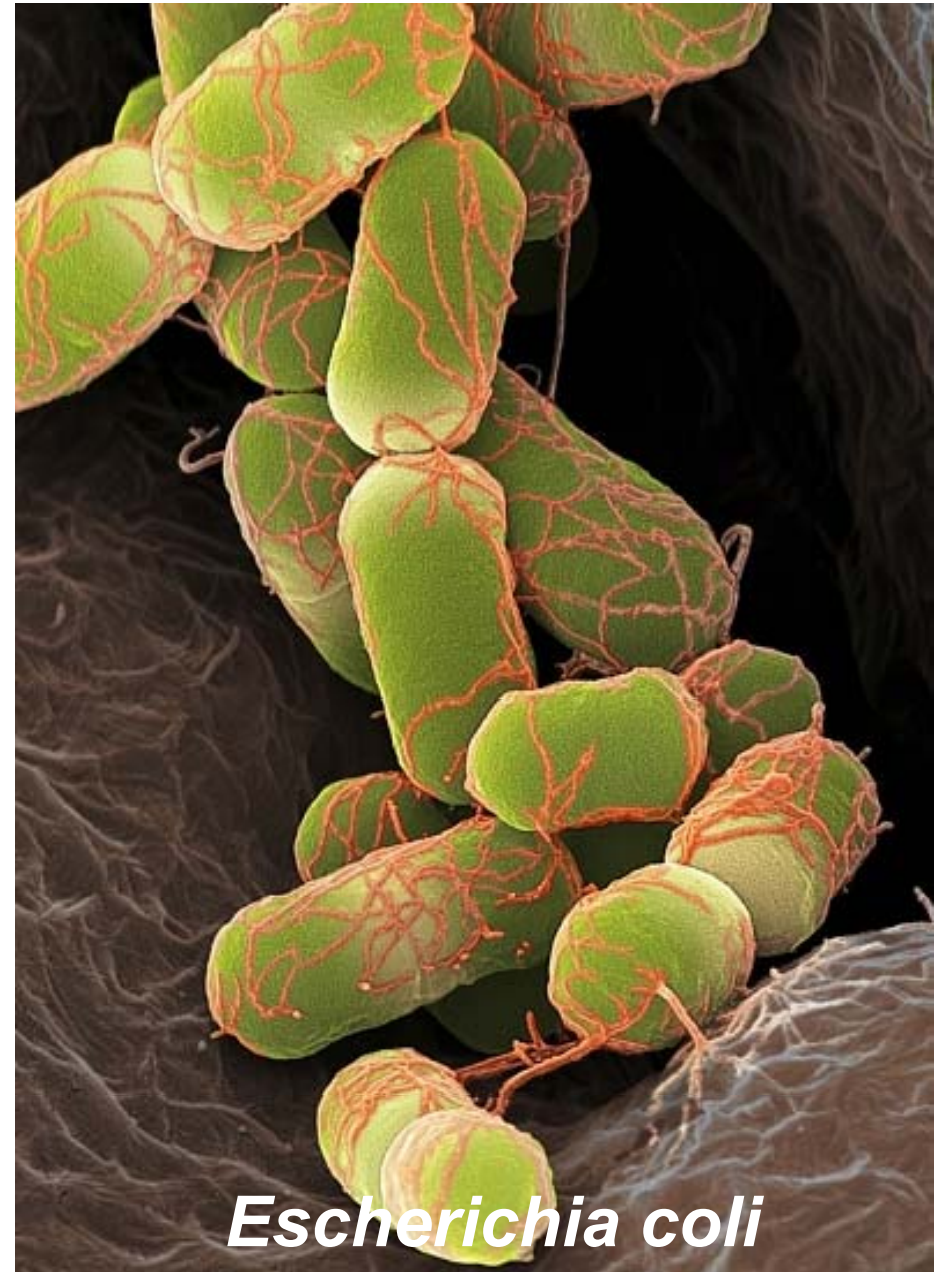
Κυτταρική αύξηση (ανάπτυξη) μικροοργανισμών

- Στη μικροβιολογία με τον όρο **αύξηση ή ανάπτυξη (growth)** αναφερόμαστε στον **πολλαπλασιασμό** ενός μικροβιακού κυττάρου.

- Η αύξηση αποτελεί ουσιώδες χαρακτηριστικό της μικροβιακής λειτουργίας,

δεδομένου πως κάθε κύτταρο έχει πεπερασμένο χρονικό όριο ζωής στη φύση

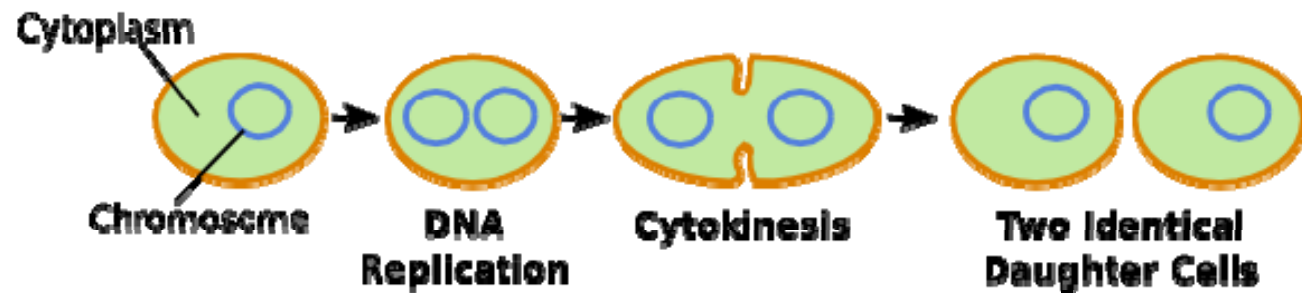
και επομένως τα είδη διατηρούνται μόνο μέσω της **διαρκούς αύξησης του πληθυσμού τους.**



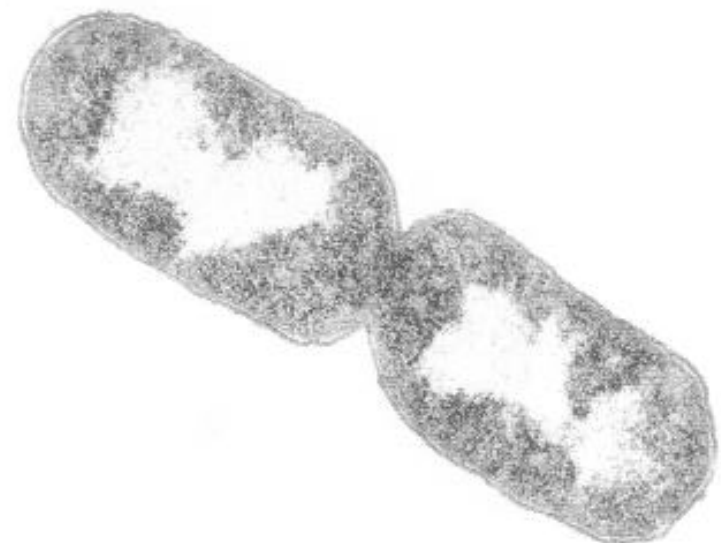
Escherichia coli

Πολλαπλασιασμός (αφυλετική αναπαραγωγή) βακτηρίων

- Τα βακτήρια αναπαράγονται μέσω μιας διαδικασίας που καλείται **δυναδική διάσπαση** (binary fission) ή **διχοτόμηση**.



- Στη δυναδική διάσπαση ένα κύτταρο διαιρείται **μη-φυλετικά** (asexually) σε δύο κύτταρα, με το κάθε νέο κύτταρο να είναι **κλώνος** του αρχικού κυττάρου.



■ Κατά τη διάρκεια της απλής διχοτόμησης, όλα τα κυτταρικά συστατικά πολλαπλασιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε κάθε θυγατρικό κύτταρο να διαθέτει ένα **πλήρες χρωμόσωμα** και **επαρκή αριθμό αντιγράφων** από:

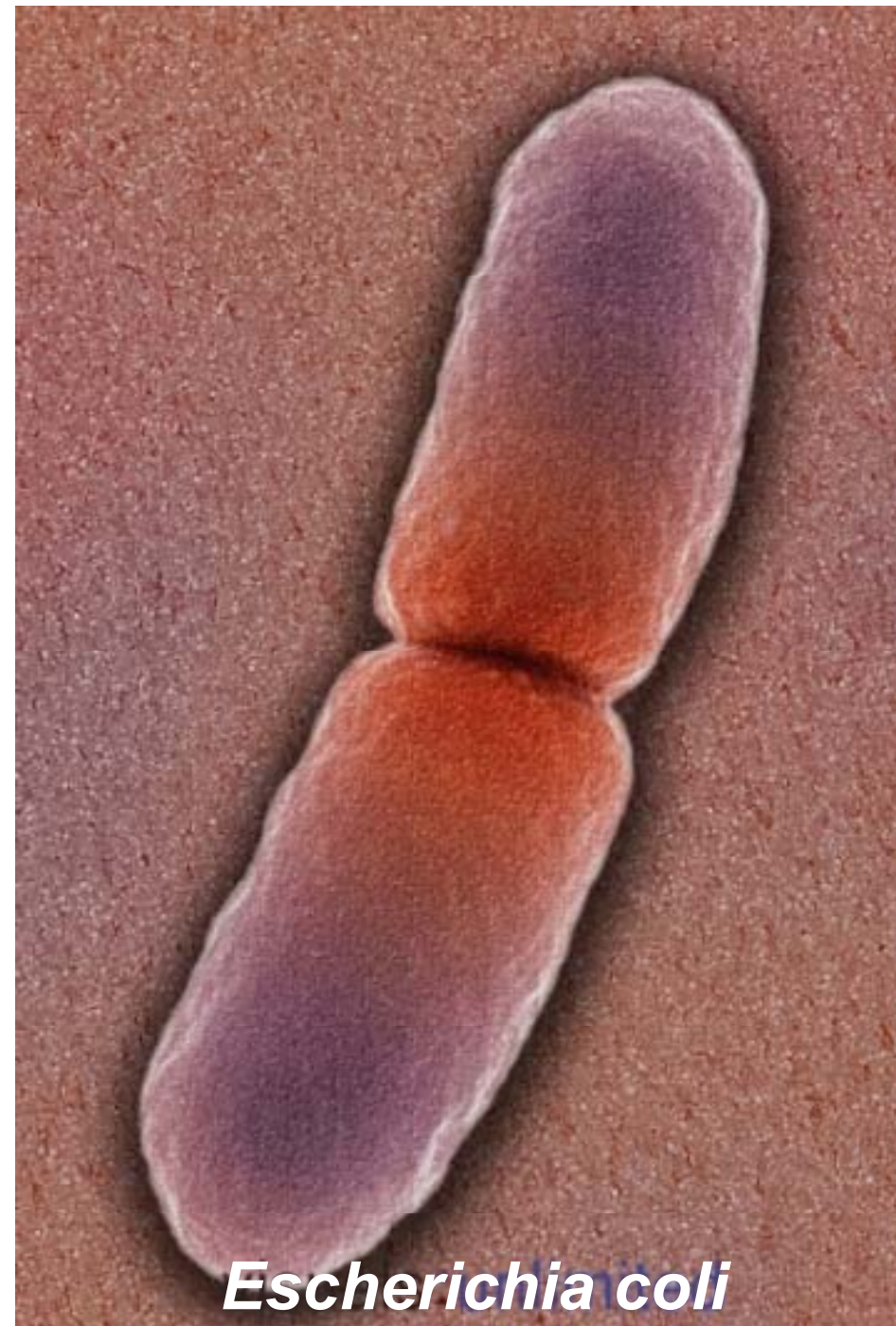
✓ μονομερή

✓ μακρομόρια

και

✓ ανόργανα ιόντα,

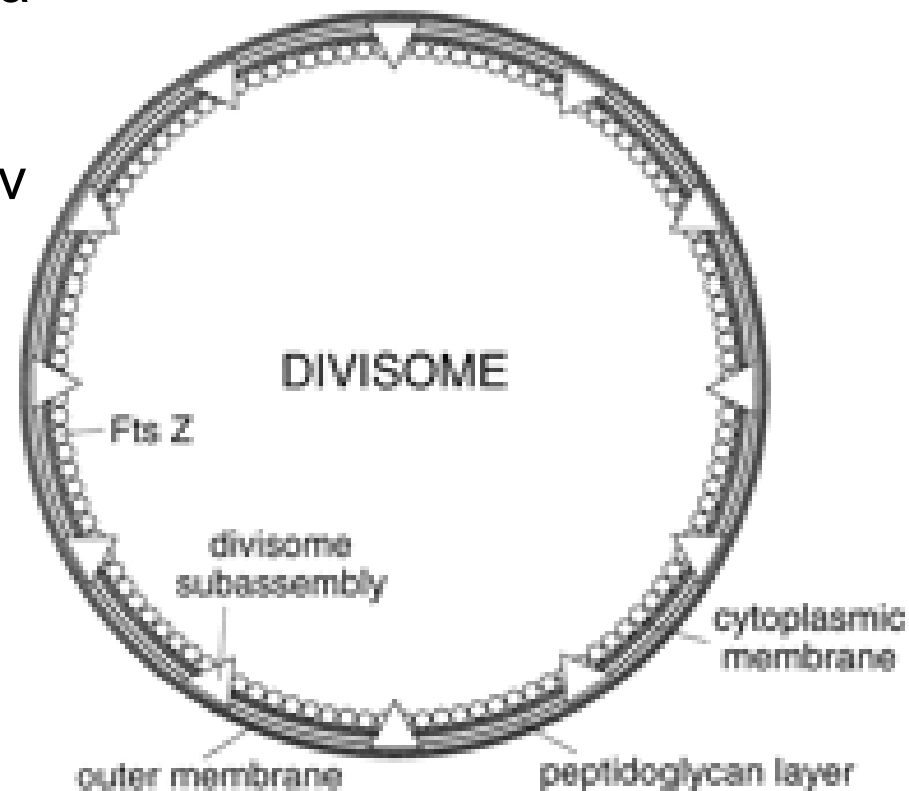
→ τα οποία είναι απαραίτητα για την αυτοτελή ύπαρξή του.



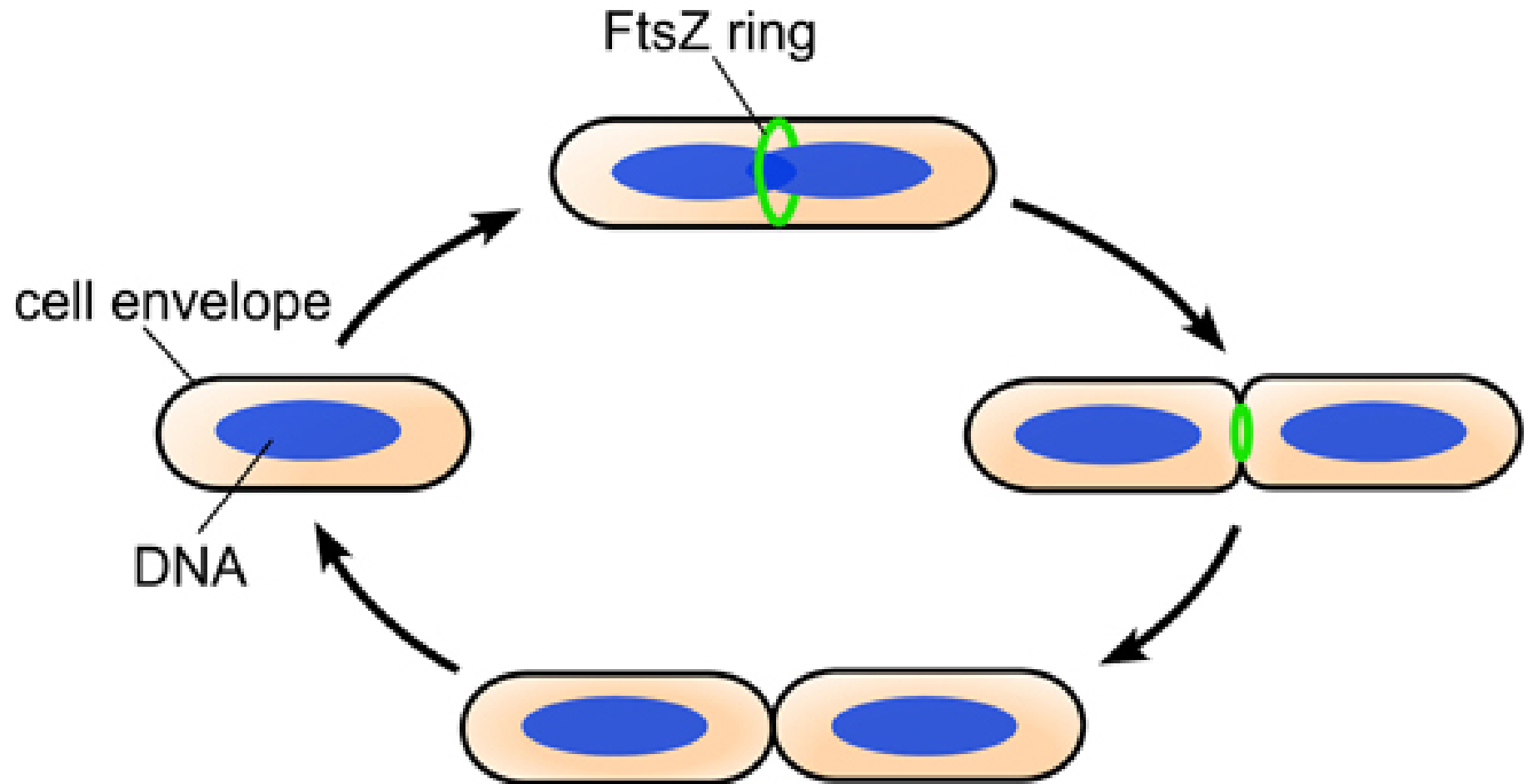
Escherichia coli

Πρωτεΐνες Fts και διαιρεσίωμα προκαρυωτικών κυττάρων

- Στα βακτήρια και στα αρχαία, οι **πρωτεΐνες Fts** (από **filamentous temperature sensitive**) είναι σημαντικές για την κυτταρική διαίρεση.
- Οι διάφορες πρωτεΐνες **Fts** αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας το **διαιρισίωμα** (divisome), το οποίο αποτελεί ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών.
- Η θέση του διαιρισιώματος καθορίζει το **επίπεδο της κυτταρικής διαίρεσης**, μέσω του σχηματισμού ενός δακτυλίου από μόρια της πρωτεΐνης **FtsZ**.
- Το διαιρεσίωμα περιέχει επίσης πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη **σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης** (κυτταρικού τοιχώματος).



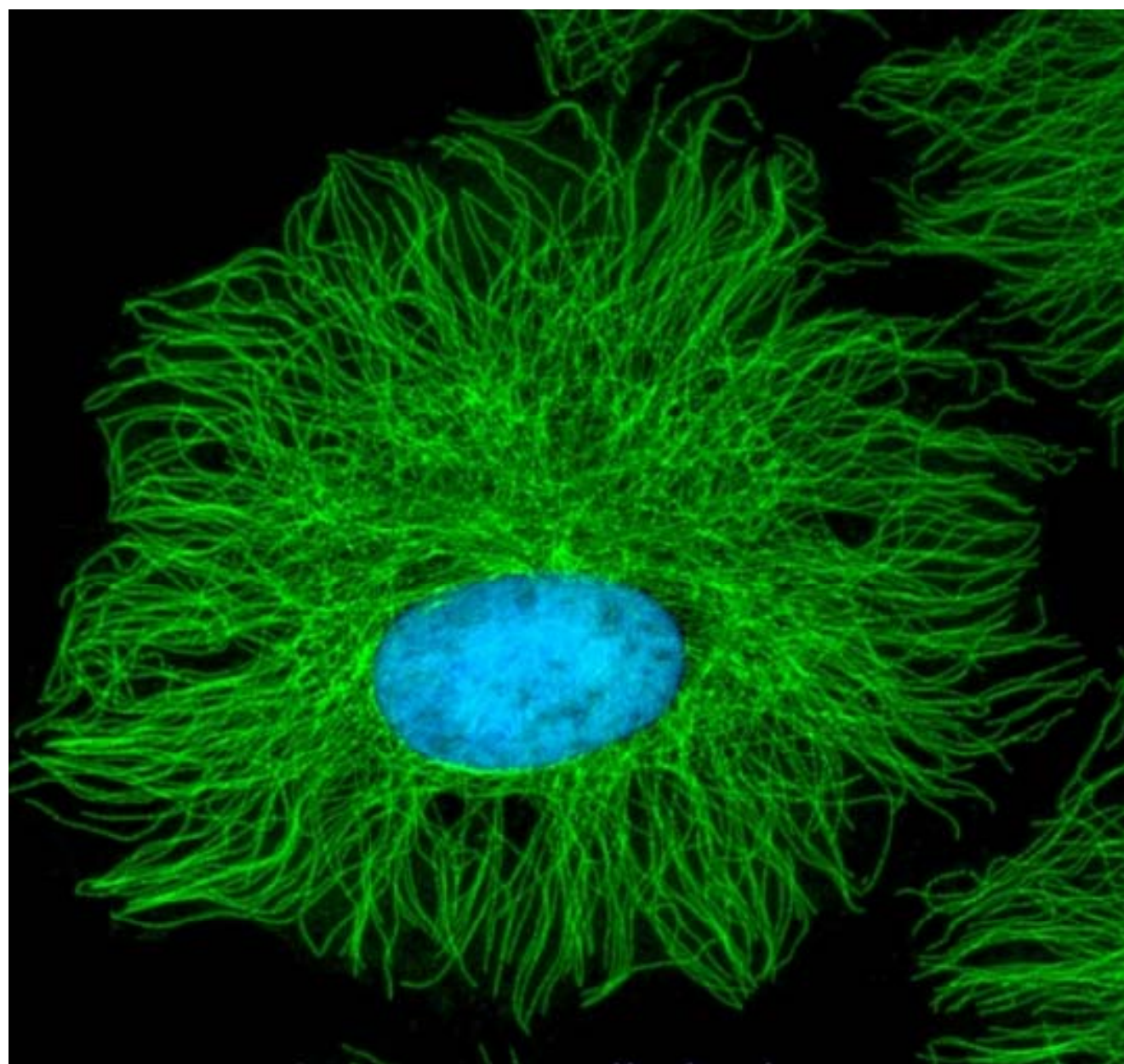
BINARY FISSION:



δυναδική διάσπαση, σχηματισμός δακτυλίου FtsZ που καθορίζει το επίπεδο της διαίρεσης

- Η αντιγραφή του DNA πραγματοποιείται πριν την κατασκευή του **διαφράγματος**.

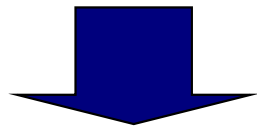
- Η **τουμπουλίνη** (tubulin), η οποία είναι η **κύρια πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων** (microtubules) της μιτωτικής ατράκτου των ευκαρυωτικών κυττάρων, εμφανίζει **δομικές ομοιότητες με την πρωτεΐνη FtsZ**.



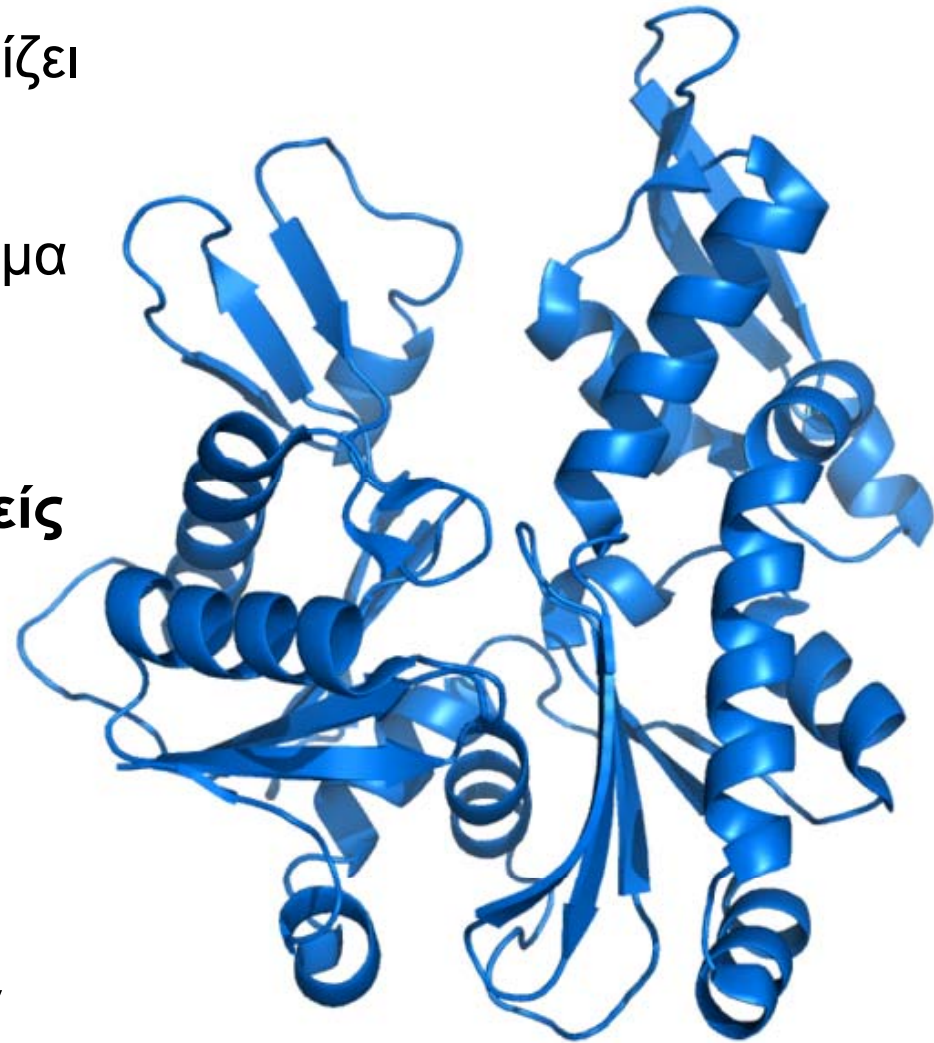
μικροφωτογραφία ανοσοφθορισμού ενός ευκαρυωτικού κυττάρου κυτταρικής σειράς HeLa, στο οποίο φαίνονται οι μικροσωληνίσκοι με **πράσινο** και το DNA με **γαλάζιο**

Κυτταρικό σχήμα προκαρυωτών (πρωτεΐνη MreB)

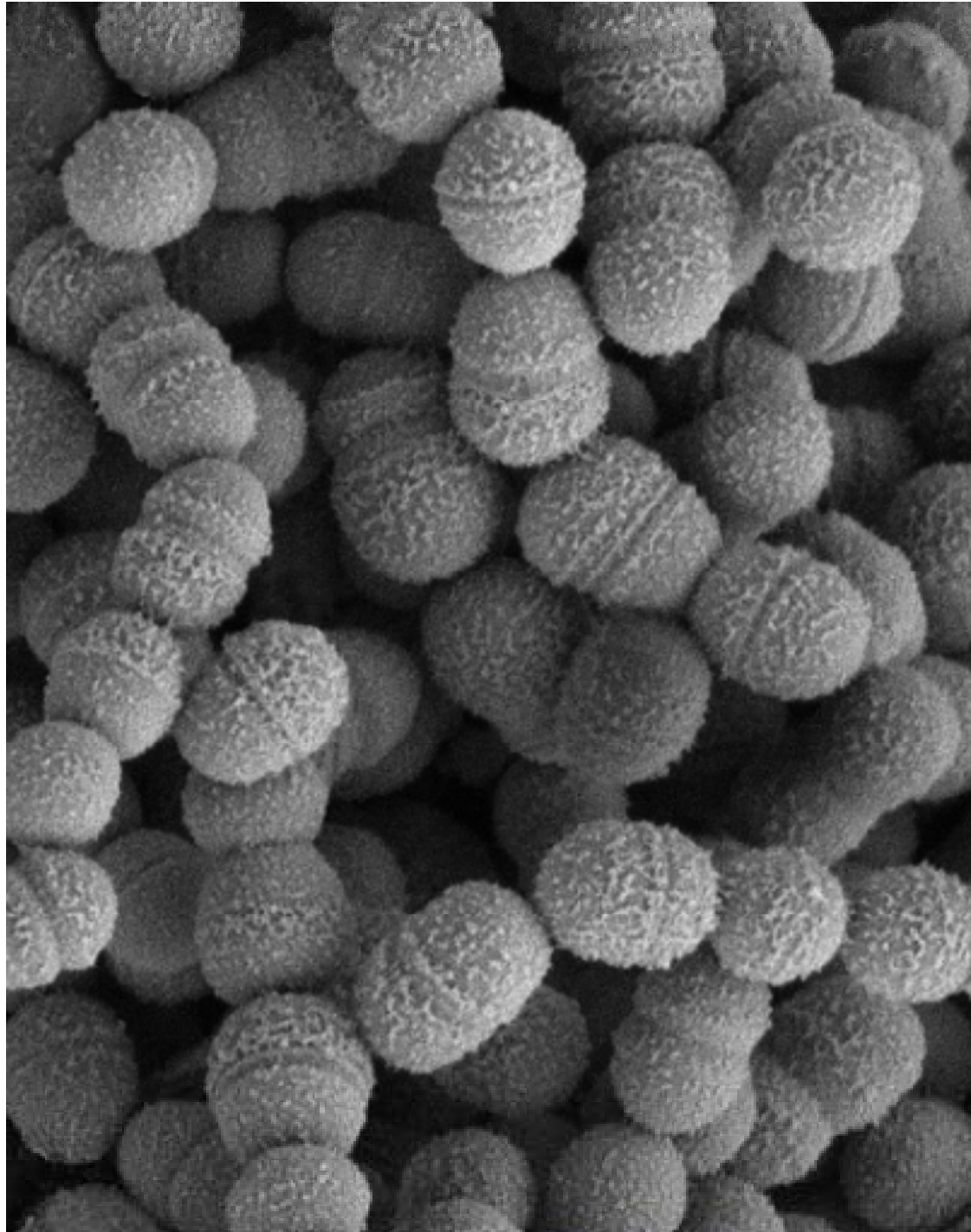
- Το **κυτταρικό τοίχωμα** στους μικροοργανισμούς είναι αυτό που καθορίζει το **ιδιαιτέρο σχήμα** του καθενός.
- Η μορφή που θα έχει το κυτταρικό τοίχωμα στους προκαρυωτικούς οργανισμούς καθορίζεται από την πρωτεΐνη **MreB**.
- Η πρωτεΐνη αυτή δημιουργεί **νηματοειδείς ταινίες** οι οποίες περιβάλλουν το εσωτερικό του κυττάρου **κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη**.



- Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένας **υποτυπώδης κυτταροσκελετός**, παρόμοιος με τον **κυτταροσκελετό των ευκαρυωτικών κυττάρων** (ο τελευταίος αποτελείται από ινιδία ακτίνης, ενδιάμεσα ινίδια και μικροσωληνίσκους).



τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης MreB βακτηρίου



Streptococcus salivarius

Βακτήρια θετικά κατά Gram, **κοκκοειδή**, προαιρετικά αναερόβια, τα οποία σχηματίζουν αλυσίδες κυττάρων που συγκρατούνται μαζί από το υλικό κάψουλας (capsular material) που περιβάλλει το κάθε κύτταρο.

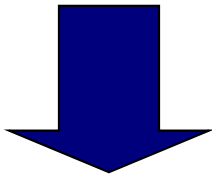
Αποτελούν κύρια βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας (commensalistic) της **στοματικής κοιλότητας** (oral cavity) και του **ανώτερου αναπνευστικού συστήματος** (upper respiratory tract) στους ανθρώπους.



ραβδόμορφα θετικά κατά Gram βακτήρια *Bacillus subtilis*

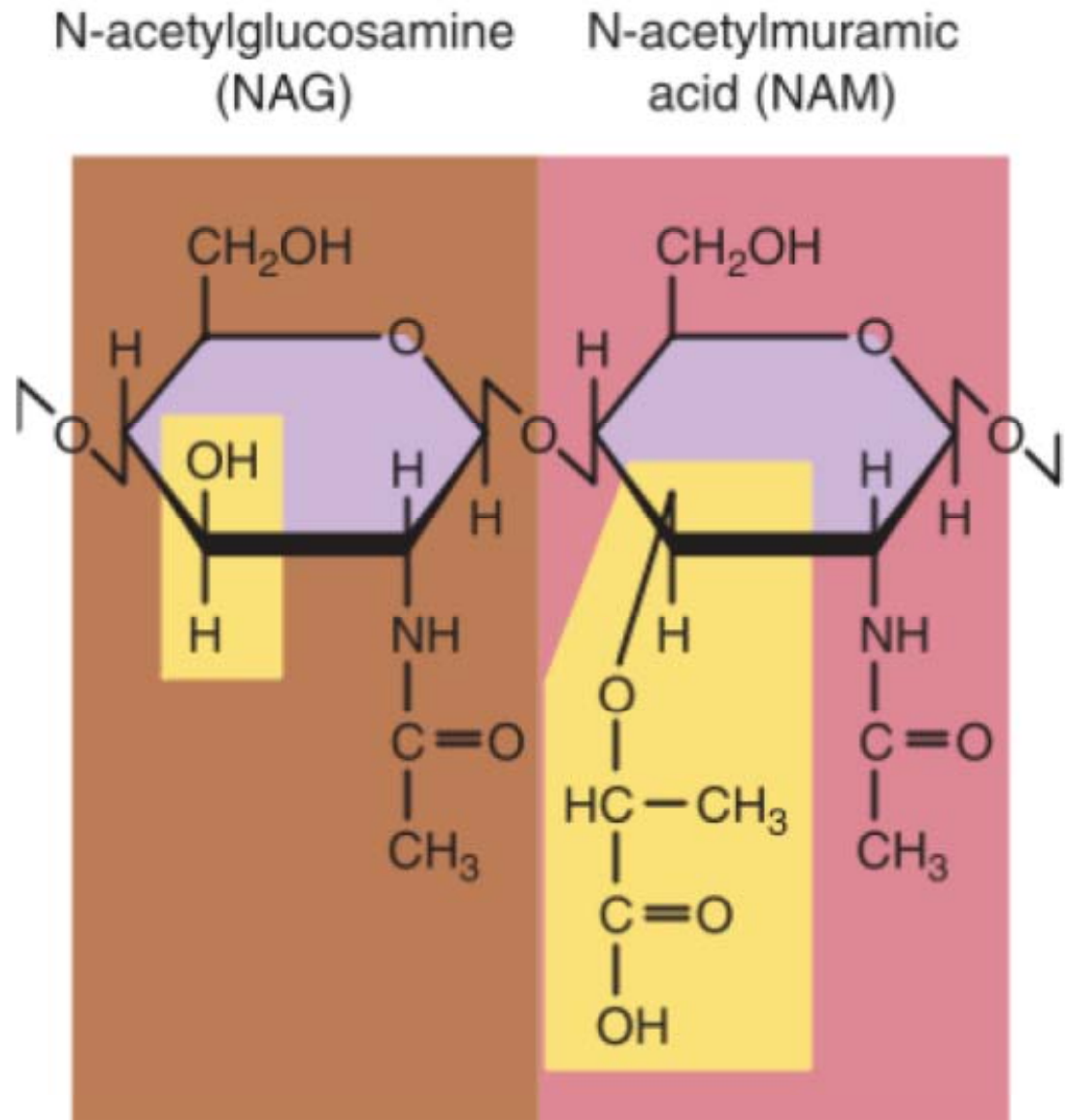
Σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος βακτηρίων

- Όταν ένα κύτταρο μεγεθύνεται πριν την κυτταρική διαίρεση, θα πρέπει να **συντίθενται νέο κυτταρικό τοίχωμα**.

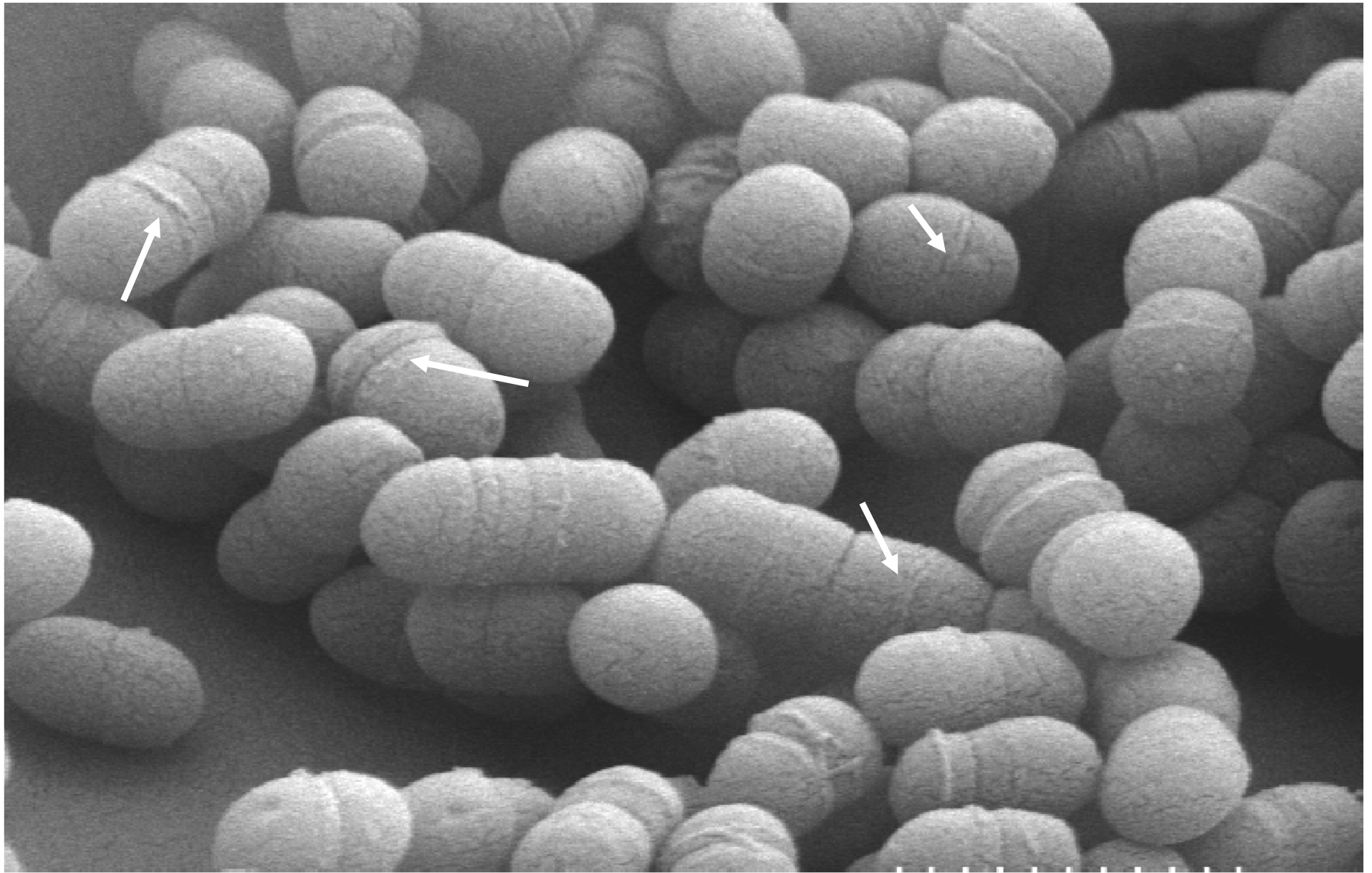


- Το νέο υλικό του κυτταρικού τοιχώματος προστίθεται στο προϋπάρχων, **δίχως να διαταράσσεται η δομή του τοιχώματος**.

- Η ένωση της **παλιάς** και της **νέας πεπτιδογλυκάνης** δημιουργεί μια **αναδίπλωση** στην επιφάνεια του κυττάρου των θετικών κατά Gram βακτηρίων, ανάλογη μιας **ουλής**.

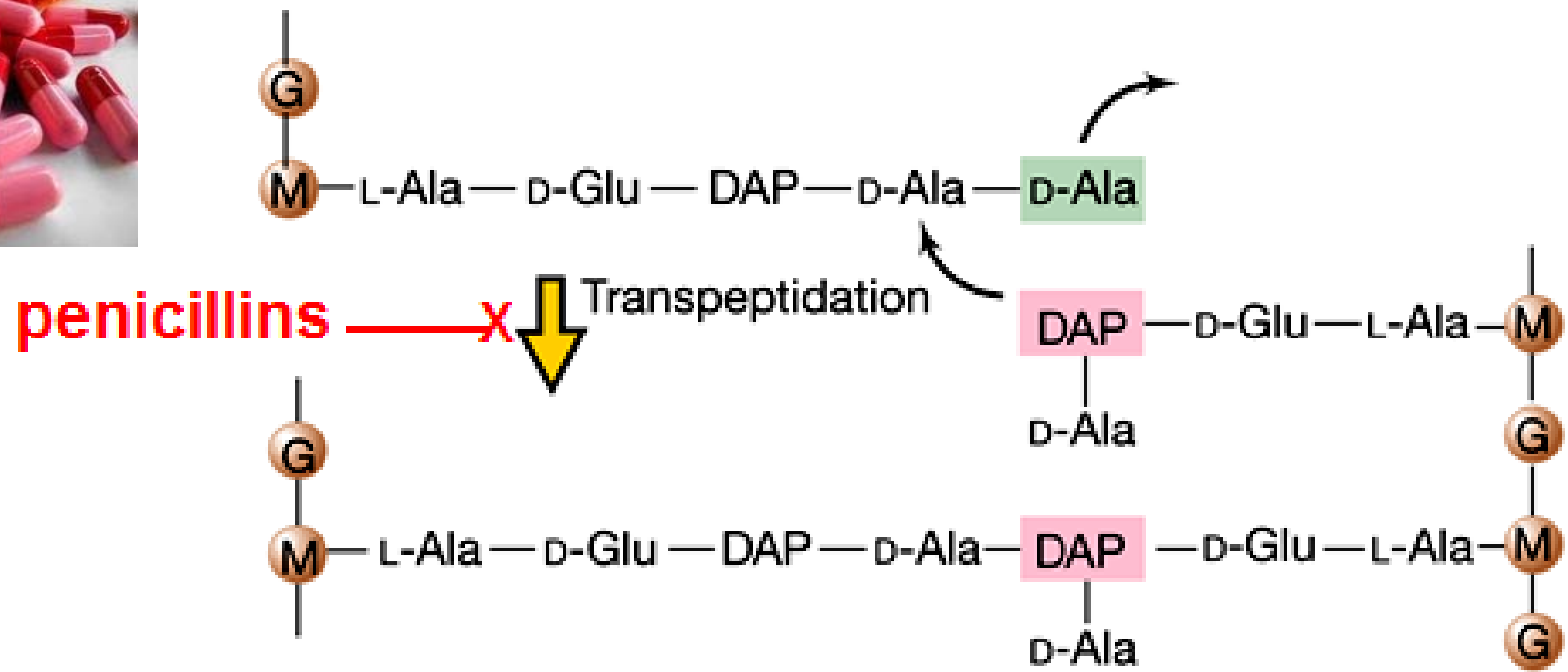


οι δομικές υπομονάδες της πεπτιδογλυκάνης



δαιρούμενα κύτταρα *Lactococcus lactis*
με τα βέλη διακρίνονται οι αναδιπλώσεις του κυτταρικού τοιχώματος στο σημείο
ένωσης παλιάς και νέας πεπτιδογλυκάνης

- Η **τρανσπεπτιδίωση** (transpeptidation) είναι ο σχηματισμός **πεπτιδικών διασυνδέσεων** μεταξύ **καταλοίπων N-ακετυλομουραμικού οξέος** στην πεπτιδογλυκάνη, κατά το τελικό στάδιο της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος.
- Η τρανσπεπτιδίωση είναι η αντίδραση που αναστέλλεται από το αντιβιοτικό **πενικιλίνη**.



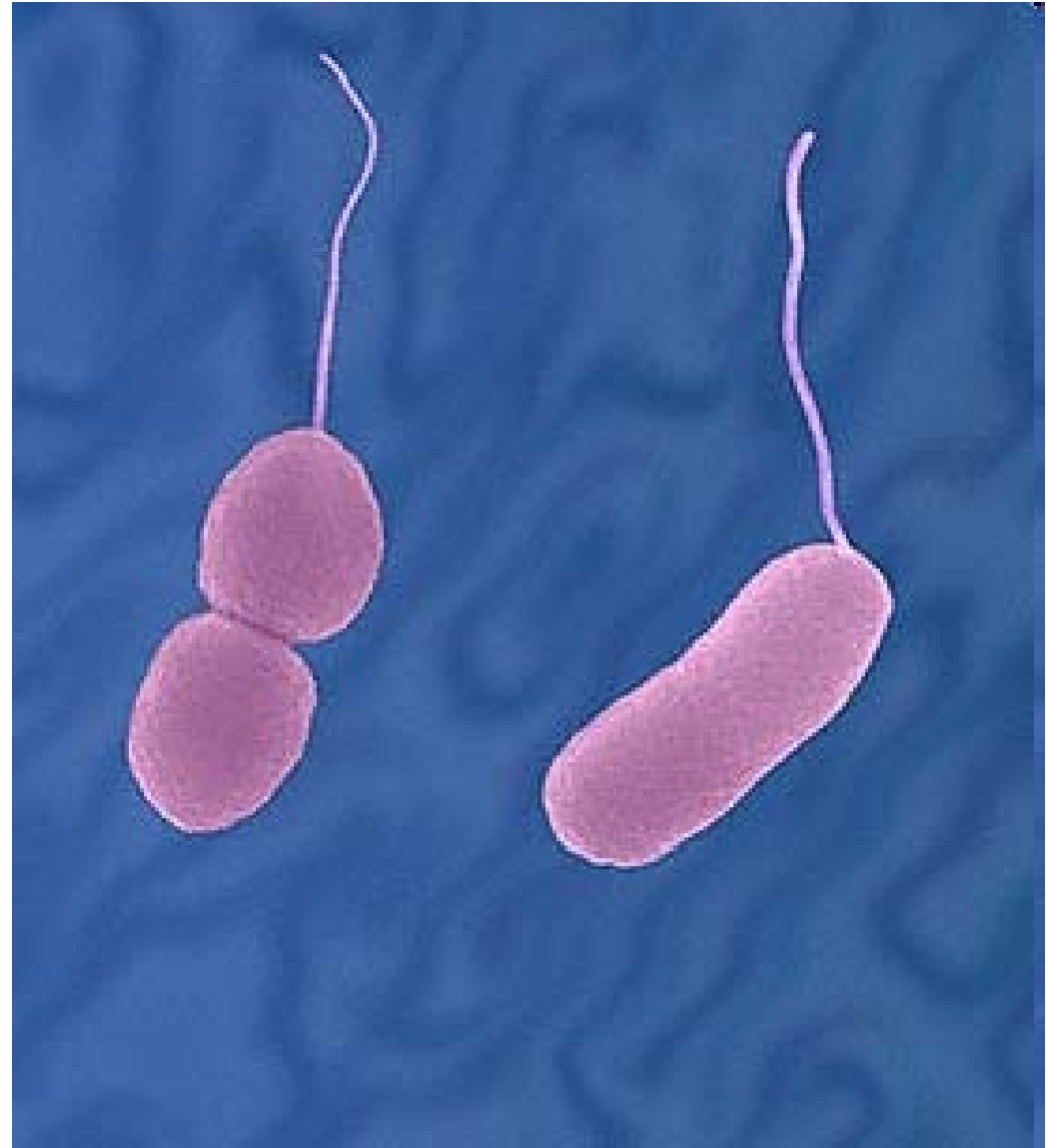
Ρυθμός αύξησης (μ) και χρόνος γενεάς (g)

- **Ρυθμός αύξησης** (growth rate, μ) είναι ο **ρυθμός μεταβολής του πληθυσμού**, δηλαδή η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα του χρόνου (dN/dt).
- Ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστεί ένας κυτταρικός πληθυσμός καλείται **χρόνος γενεάς** ή **χρόνος διπλασιασμού** (generation time, doubling time).

Χρόνος (h)	Συνολικός αριθμός κυττάρων	Χρόνος (h)	Συνολικός αριθμός κυττάρων
0	1	4	256
0,5	2	4,5	512
1	4	5	1.024
1,5	8	5,5	2.048
2	16	6	4.096
2,5	32	.	.
3	64	.	.
3,5	128	10	1.048.576

Δεδομένα αύξησης ενός μικροβιακού πληθυσμού που αυξάνεται εκθετικά ή λογαριθμικά
(ο αριθμός των κυττάρων διπλασιάζεται ανά συγκεκριμένο χρονικό διάστημα =0,5 ώρα)

- Ο χρόνος γενεάς ποικίλει στους διάφορους μικροοργανισμούς και εξαρτάται από:
 - ✓ τις **περιβαλλοντικές συνθήκες** (π.χ. θερμοκρασία, pH, ενεργότητα ύδατος, οξυγόνο)
 - ✓ το **είδος του μικροοργανισμού** (δηλαδή το γενετικό υλικό του κυττάρου)
- Τα περισσότερα **βακτήρια** έχουν χρόνο γενεάς **από 1 έως 3 ώρες**, αλλά κάποια διαιρούνται κάθε 10 λεπτά, ενώ άλλα απαιτούν περισσότερο από 24 ώρες για να διαιρεθούν.



κύτταρα του αλόφιλου τροφιμογενούς παθογόνου ***Vibrio parahaemolyticus*** με το πολικό τους μαστίγιο. Αυτό διπλασιάζεται υπό άριστες συνθήκες κάθε 10-12 λεπτά.

χρόνοι γενεάς (διπλασιασμού) για μερικά βακτήρια σε διάφορες θερμοκρασίες

μικροοργανισμός

θερμοκρασία
(°C)

χρόνος γενεάς
(ώρες)

είδη βακτηρίων

Beneckea natriegens

37

0.16

→ *Escherichia coli*

40

0.35 21 min

→ *Bacillus subtilis*

40

0.43 25,8 min

→ *Staphylococcus aureus*

37

0.47 28 min

→ *Pseudomonas aeruginosa*

37

0.58

→ *Clostridium botulinum*

37

0.58

Rhodospirillum rubrum

25

4.6–5.3

Anabaena cylindrica

25

10.6

Mycobacterium tuberculosis

37

≈12

Treponema pallidum

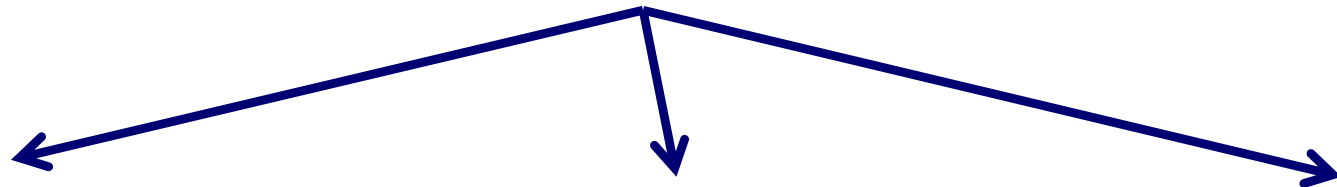
37

33

→ είδη βακτηρίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τα τρόφιμα

Κλειστή καλλιέργεια μικροοργανισμών

- Με τον όρο κλειστή καλλιέργεια (batch culture) αναφερόμαστε σε μια καλλιέργεια καθορισμένου όγκου στην οποία **δεν προστίθενται ούτε αφαιρούνται συστατικά**.



κωνικές φιάλες



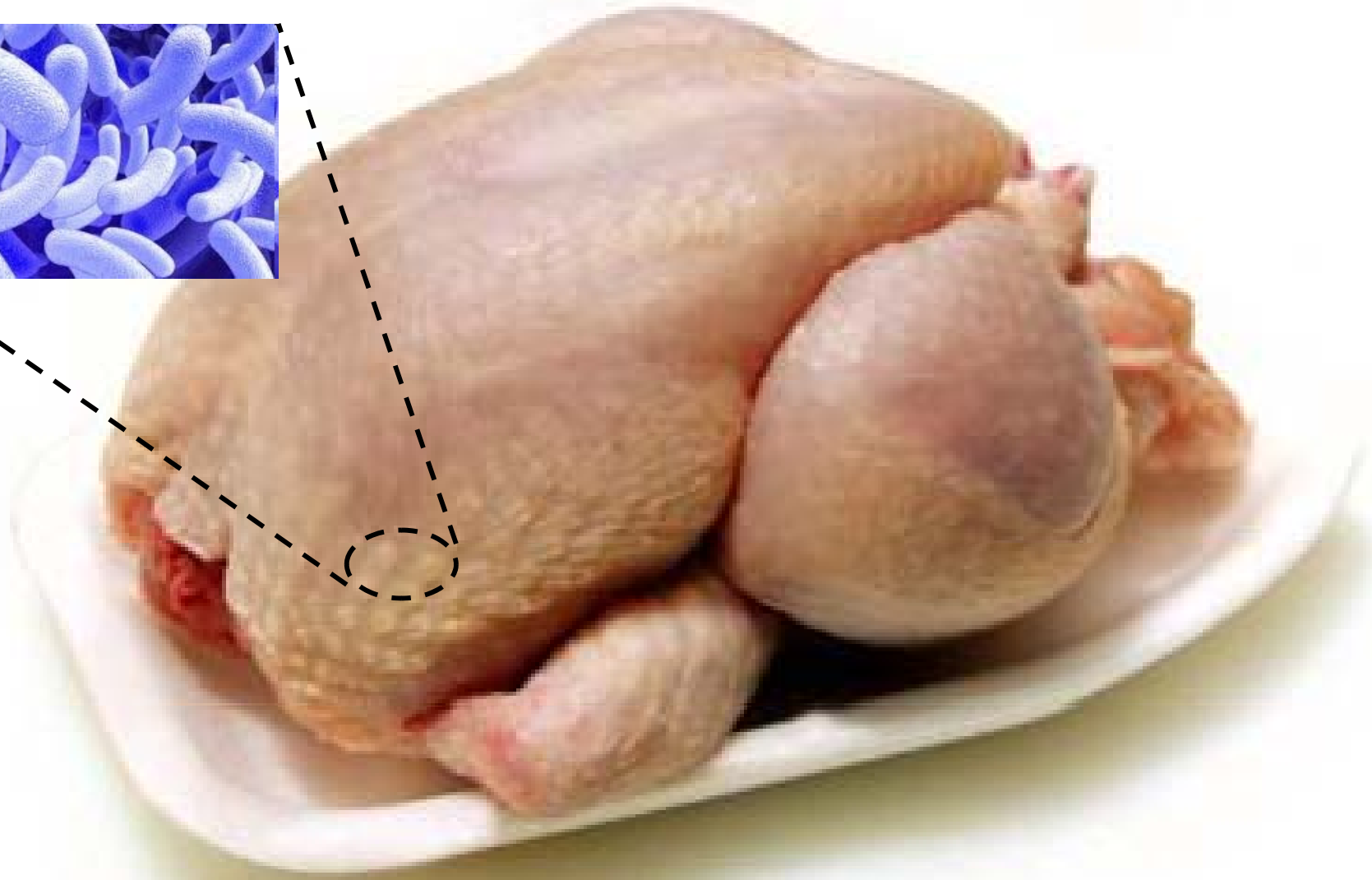
δοκιμαστικοί σωλήνες



τρυβλία Petri



διάφορα συστήματα κλειστής καλλιέργειας μικροοργανισμών



**οι μικροοργανισμοί μπορούν και πολλαπλασιάζονται στα
περισσότερα τρόφιμα τα οποία είναι κλειστά συστήματα
καλλιέργειας**

Σιγμοειδής καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης σε κλειστή καλλιέργεια (π.χ. τρόφιμο)

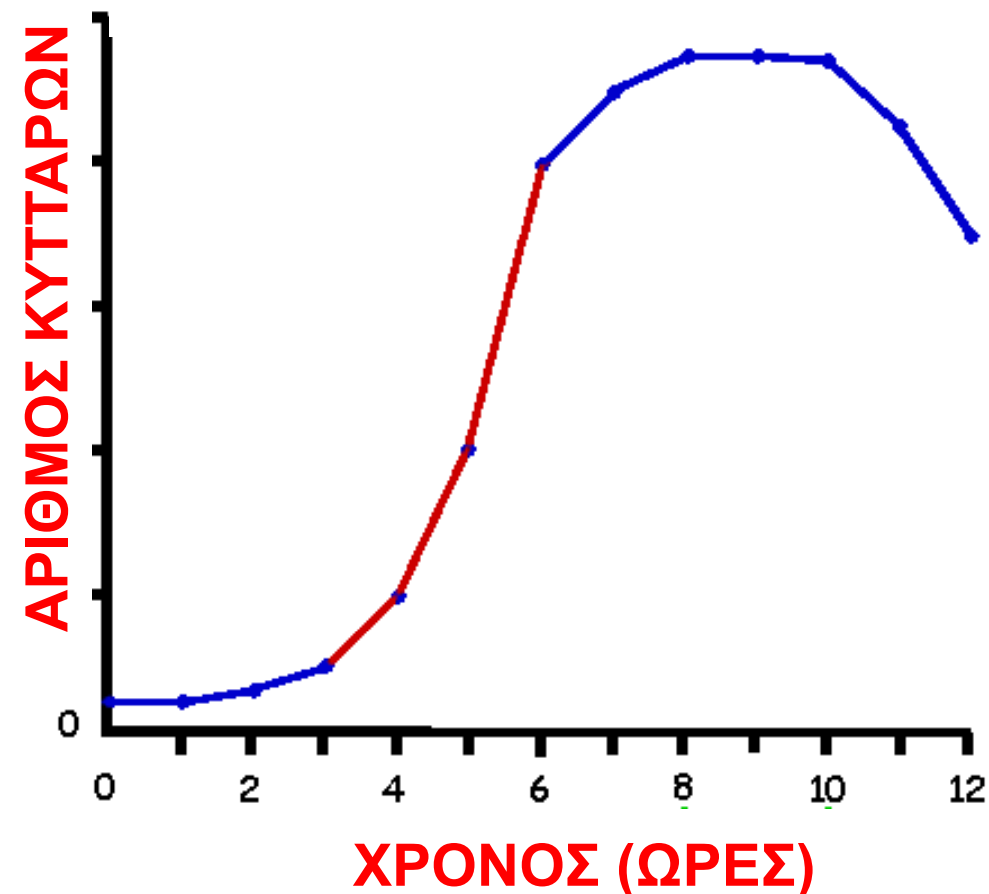
- Αν μετρηθεί ο πληθυσμός των κυττάρων (βακτηρίων) μιας **κλειστής μικροβιακής καλλιέργειας** σε τακτά χρονικά διαστήματα και σχεδιαστεί η **καμπύλη ανάπτυξης** σαν συνάρτηση **$y = f(x)$** ,

όπου: **y** = αριθμός κυττάρων (συνήθως ανά ml ή g)

x = χρόνος (συνήθως σε ώρες)

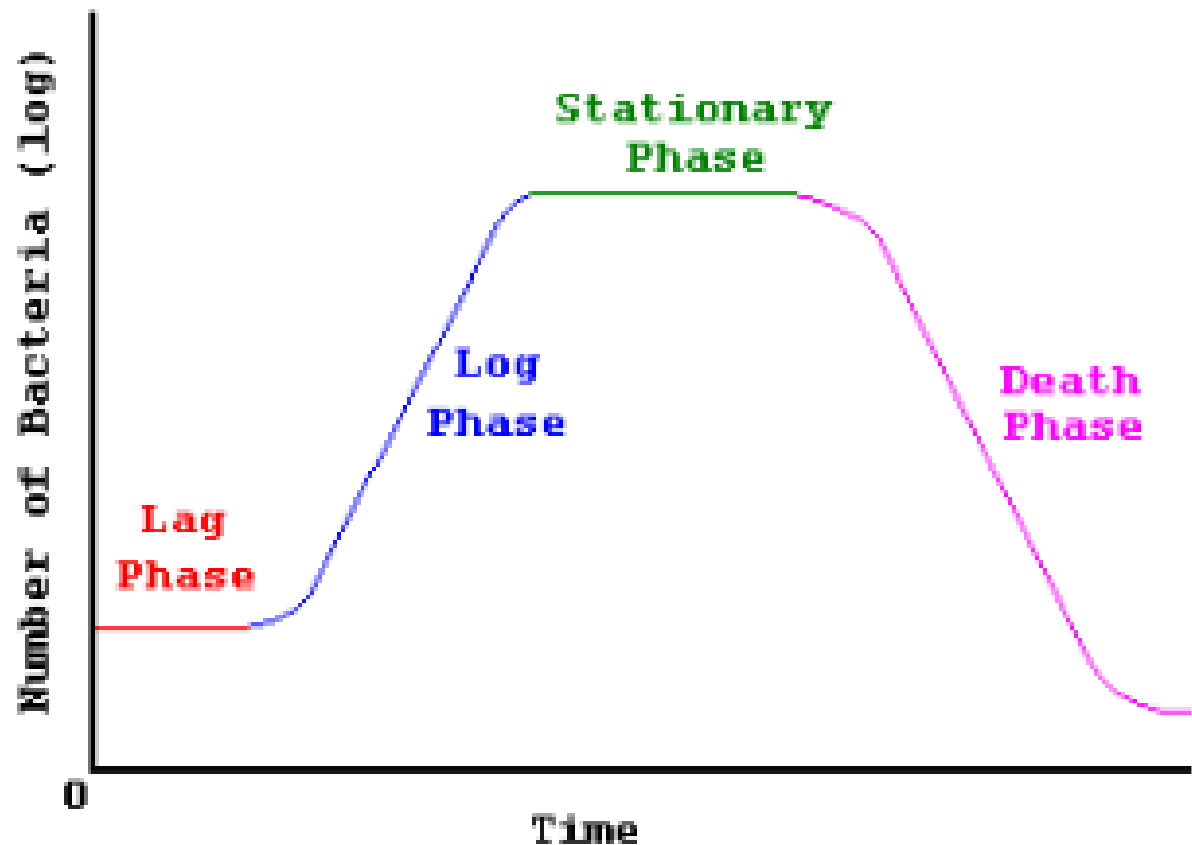
→ τότε προκύπτει μια τυπική σιγμοειδής καμπύλη (sigmoidal curve).

- Εξαιτίας των πολύ μεγάλων αριθμών, χρησιμοποιούμε λογαριθμικές κλίμακες για να αποδώσουμε γραφικά τη μικροβιακή αύξηση.



Φάσεις ανάπτυξης μικροβιακού πληθυσμού σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας (π.χ. τρόφιμο)

- Σ' ένα οποιοδήποτε κλειστό σύστημα καλλιέργειας, η μικροβιακή αύξηση διακρίνεται στις εξής φάσεις:
- ✓ **φάση προσαρμογής ή υστέρησης (lag phase)**
- ✓ **φάση εκθετικής (ή λογαριθμικής) αύξησης (exponential growth, log phase)**
- ✓ **στάσιμη φάση (stationary phase)**
- ✓ **φάση θανάτου (death phase)**



Φάση προσαρμογής

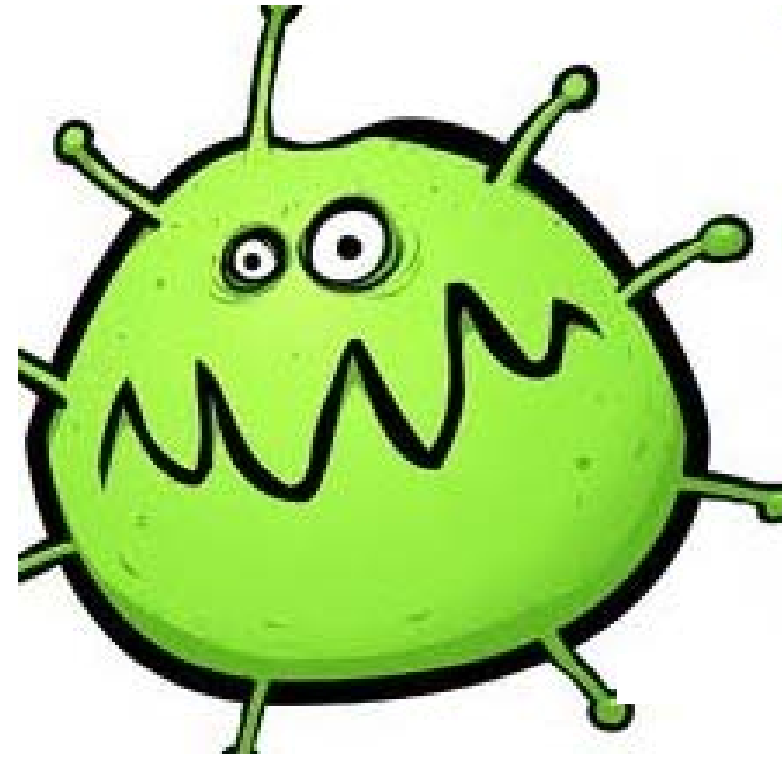
■ Όταν ένας μικροβιακός πληθυσμός ενοφθαλμίζεται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο, η ανάπτυξη δεν αρχίζει αμέσως, αλλά συνήθως ύστερα από μια χρονική περίοδο που λέγεται **φάση προσαρμογής** (lag phase).

➤ Για κάποιον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, η διάρκεια της φάσης προσαρμογής εξαρτάται από:

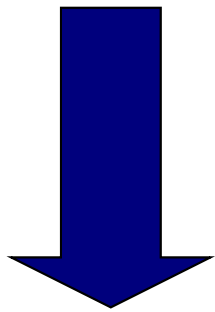
✓ το **ιστορικό των κυττάρων** (inoculum history), δηλαδή τις προηγούμενες συνθήκες στις οποίες τα κύτταρα βρίσκονταν

και

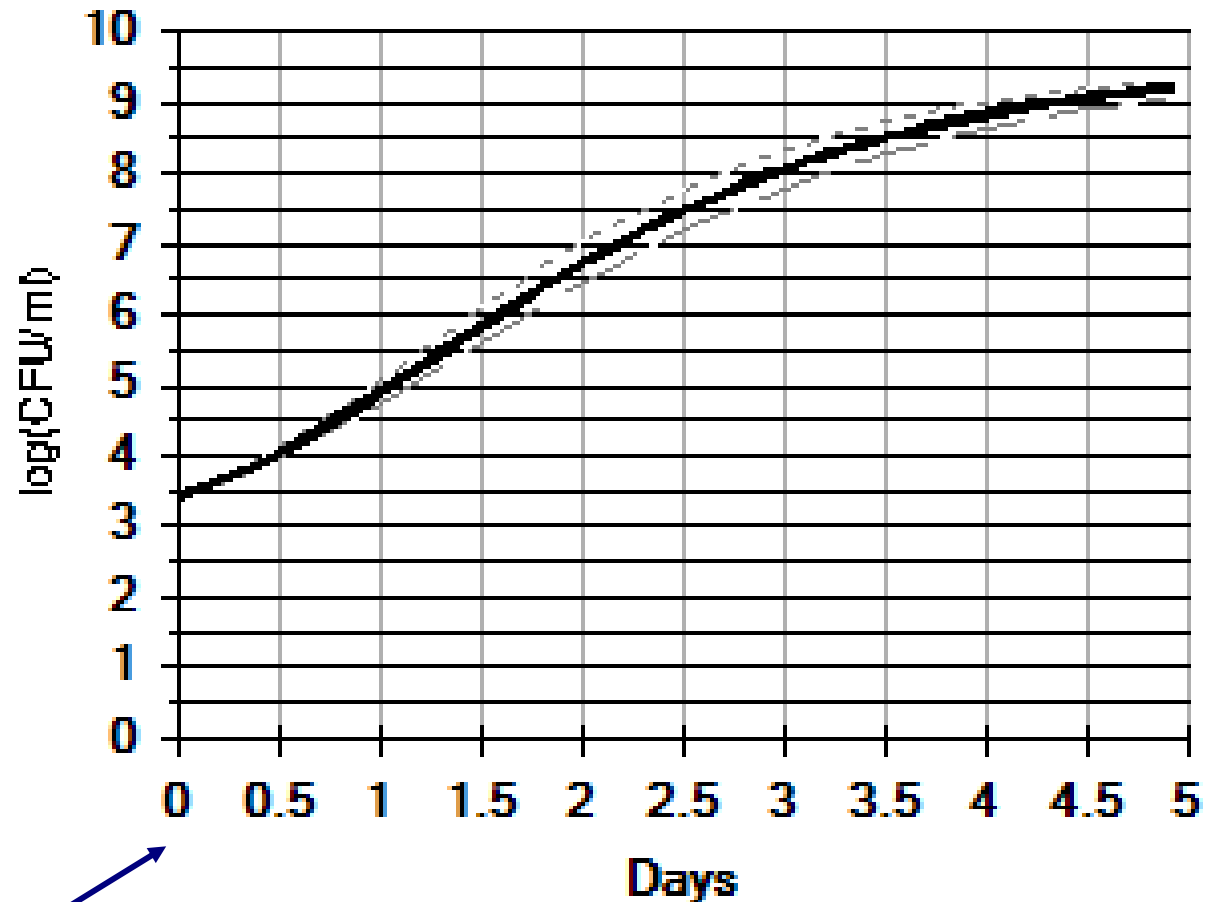
✓ τις **νέες συνθήκες καλλιέργειας** (growth conditions)



■ Κατά την περίοδο της φάσης προσαρμογής **τα κύτταρα προσαρμόζονται** (adapt themselves) στις νέες συνθήκες και παρατηρείται σύνθεση (παραγωγή) ουσιωδών μεταβολιτών (ενζύμων, άλλων μορίων και μακρομορίων).



Listeria monocytogenes in Broth Culture (NaCl)



ανάπτυξη του τροφιμογενούς παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό στο εργαστήριο, **δίχως** φάση προσαρμογής

➤ Επομένως, αν μια καλλιέργεια που αυξάνεται εκθετικά ενοφθαλμιστεί στο ίδιο θρεπτικό μέσο και υπό τις ίδιες συνθήκες δεν παρατηρείται καθόλου φάση προσαρμογής (δηλαδή η εκθετική φάση αρχίζει αμέσως).

Εκθετική (ή λογαριθμική) φάση

- Στην εκθετική φάση (exponential growth, log phase), ο **αριθμός των κυττάρων διπλασιάζεται ανά συγκεκριμένο χρονικό διάστημα**.
 - ✓ π.χ. κάθε 30 λεπτά, κάθε 2 ώρες, κάθε 3 ημέρες
- Τα κύτταρα της εκθετικής φάσης βρίσκονται στην **πλέον υγιή τους κατάσταση**, επομένως τα κύτταρα αυτά είναι ιδανικά για διάφορες μελέτες (π.χ. εξαγωγή ενδοκυττάρων πρωτεϊνών).
- **Ο ρυθμός της εκθετικής αύξησης επηρεάζεται από:**
 - ✓ τις **περιβαλλοντικές συνθήκες** (π.χ. θερμοκρασία, pH, ενεργότητα ύδατος, σύσταση θρεπτικού μέσου)
 - και
 - ✓ το **είδος (γενετικά χαρακτηριστικά)** του μικροοργανισμού

Στάσιμη φάση

- Ένα μόνο βακτήριο (π.χ. *E. coli*) με χρόνο γενεάς 20 λεπτά, αν αυξανόταν εκθετικά για μόνο 48 ώρες θα παρήγαγε πληθυσμό συνολικού βάρους 4000 φορές το βάρος της γης !
(μέσο βάρος ενός βακτηρίου $\approx 10^{-12}\text{g}$)



- Όμως καθώς:
- εξαντλούνται διάφορα ουσιώδη θρεπτικά συστατικά

ή / και

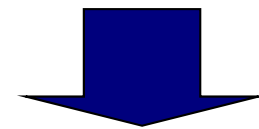
- συσσωρεύονται τοξικά προϊόντα,
η αύξηση σταματά και ο μικροβιακός πληθυσμός εισέρχεται στη στάσιμη φάση (stationary phase).



■ Συχνά, στην αρχή αυτής της φάσης κάποια κύτταρα **πολλαπλασιάζονται** ενώ κάποια άλλα **πεθαίνουν**, με τις δύο διαδικασίες να βρίσκονται σε πλήρη ισορροπία (μηδενικός ρυθμός αύξησης του συνολικού πληθυσμού).



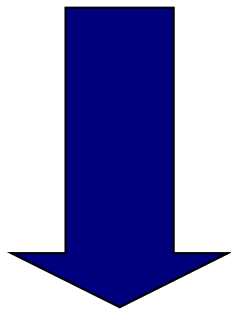
αποικίες μικροοργανισμών πάνω σε στερεό θρεπτικό υλικό σε κάποιο τρυβλίο.



τα κύτταρα της κάθε αποικίας έχουν εισέλθει στη στάσιμη φάση ανάπτυξης

Φάση θανάτου

- Αν η επώαση συνεχιστεί και αφού ο πληθυσμός έχει φθάσει στη στάσιμη φάση, **τα κύτταρα αρχίζουν να πεθαίνουν**.
- Συχνά στη φάση αυτή έχουμε **λύση των κυττάρων** (αυτόλυση, autolysis).
- Στη φάση θανάτου (death phase), ο πληθυσμός μειώνεται εκθετικά.

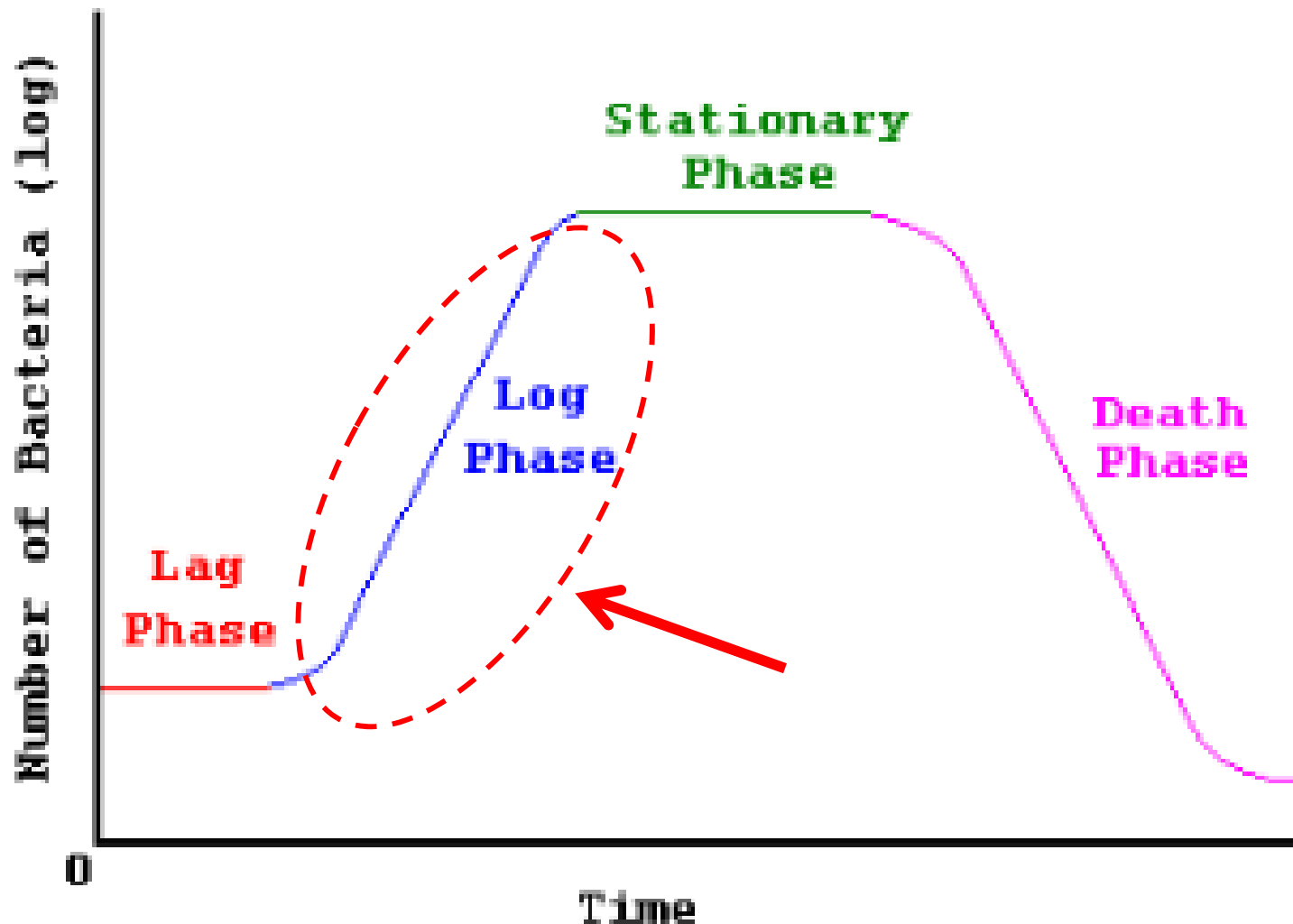


- Συνήθως όμως ο **ρυθμός θανάτου των κυττάρων** είναι όμως πολύ μικρότερος από το **ρυθμό της εκθετικής αύξησης**.



ζάρωση αποικίας *Bacillus subtilis* μετά από 96 ώρες στους 37°C, κάτι που υποδεικνύει πως έχει εισέλθει στη φάση θανάτου (μεγενθυμένη)

Μαθηματικές παράμετροι της εκθετικής αύξησης των βακτηρίων



- Η **εκθετική αύξηση** των βακτηρίων περιγράφεται από την εξής εξίσωση:

$$N = N_0 \cdot 2^n = N_0 e^{\mu \cdot t} \quad (2=e^{\ln 2})$$

<u>όπου:</u>	{	n	ο αριθμός των γενεών που ολοκληρώθηκαν
		N₀	ο αρχικός αριθμός κυττάρων
		N	ο τελικός αριθμός κυττάρων
		μ	ο ειδικός ρυθμός αύξησης (specific growth rate)
		t	ο χρόνος της αύξησης

- Ο **ειδικός ρυθμός αύξησης** εξαρτάται από:
 - ✓ το **μικροβιακό είδος** (γενετικά χαρακτηριστικά στελέχους) και
 - ✓ τις **περιβαλλοντικές συνθήκες**

- Ο **χρόνος γενεάς** (g) ενός μικροβιακού πληθυσμού που αυξάνεται εκθετικά μπορεί να υπολογιστεί μαθηματικά χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$g = t/n = (0,301 \cdot t)/(\log N - \log N_0)$$

όπου:

g	ο χρόνος γενεάς	
t	ο χρόνος της αύξησης	
n	ο αριθμός των γενεών που ολοκληρώθηκαν	↘
N₀	ο αρχικός αριθμός κυττάρων	
N	ο τελικός αριθμός κυττάρων	$N = N_0 2^n$
0,301	η τιμή του $\log_{10} 2$	↓

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

- ✓ Για παράδειγμα, αν κάτω από άριστες συνθήκες, ο αρχικός πληθυσμός των **10⁴ κυττάρων/ml** ενός βακτηριακού είδους αυξάνεται εκθετικά σε **10⁶ κύτταρα/ml** μέσα σε **2 ώρες**, ο χρόνος γενεάς είναι **18 λεπτά** [$g = (0,301 \cdot 2)/(6-4) = 0,301$ ώρες $\approx$ 18 λεπτά].

- Για ένα συγκεκριμένο μικροβιακό στέλεχος, ο **χρόνος γενεάς** μεταβάλλεται αλλάζοντας τις **συνθήκες ανάπτυξης** (growth conditions).

- Ο **ειδικός ρυθμός αύξησης** (μ) έχει μονάδες h^{-1} , είναι αντιστρόφως ανάλογος του **χρόνου γενεάς** ενός μικροβιακού πληθυσμού, και δίνεται από την εξίσωση:

$$\mu = \ln 2 / g = 0,693 / g = 2,3 \cdot (\log N - \log N_0) / t$$

$g = t/n = (0,301 \cdot t) / (\log N - \log N_0)$

- **Εκφράζει τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων ανά κύτταρο ανά μονάδα χρόνου.**
- Συνήθως έχει τιμή περίπου **0,2** για τις **μούχλες** και τις **ζύμες**.
- Ένα **βακτηριακό στέλεχος** που αναπτύσσεται γρήγορα, υπό άριστες συνθήκες, μπορεί να έχει ειδικό ρυθμό αύξησης (μ) **$2,5 \text{ h}^{-1}$** ή και περισσότερο.
- Κάτω από μη-άριστες συνθήκες, ο μ κυμαίνεται από **$0,2-0,02 \text{ h}^{-1}$** .



Pathogen Modeling Program (PMP) Online

- [PMP Home](#)
- × **PMP Online**
- [About PMP](#)
- [Tutorial](#)
- [Frequently Asked Questions](#)
- [References](#)

You are here: [PMP Home](#) / PMP Online

[Models >> Bacterium](#) ▶ [Bacteria >> Model](#) ▶

The models are based on extensive experimental data of microbial behavior in liquid microbiological media and food.

There can be no guarantee that predicted values will match those that would occur in any specific food system. Before the models could be used in such a manner, the user would have to validate the models for each specific food of interest.

OK

Pathogen modelling program (PMP)



Microorganism:

Listeria monocytogenes (Broth Culture) (NaCl)

Input Conditions

☒ Aerobic ☐ Anaerobic

Temperature:

Range: 4 to 37

20.0 °C 68.0 °F

pH:

Range: 4.5 to 7.5

5.0

Sodium Chloride (% [g/dL]):

Range: 0.5 to 10.5

3.0 (% [g/dL]) Water Activity 0.983

Sodium Nitrite (ppm):

Range: 0 to 150

0 (ppm)

Calculate Growth Data

Initial Level

3.0 log(CFU/ml) 1000 CFU/ml

Level of Concern

6.0 log(CFU/ml) 1,000,000 CFU/ml

Source and/or Relevant Publications

R.L. Buchanan, H.G. Stahl and R.C. Whiting, Effects and Interactions of Temperature, pH, Atmosphere, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite on the Growth of *Listeria monocytogenes*: Journal of Food Protection (1989) 52(12):844-851 - <http://www.arsame.gov/MES/HTML/ERRCPubs/5435.pdf>

Related Publications

Calculate Model with:

Lag

No Lag

Time Scale:

Days

Hours

Display Format:

Show Table

Show Chart

Modeled Growth Parameters:

Days

Lag Phase Duration: 1.91

Lower Confidence Limit: 1.70

Upper Confidence Limit: 2.15

Generation Time: 0.16

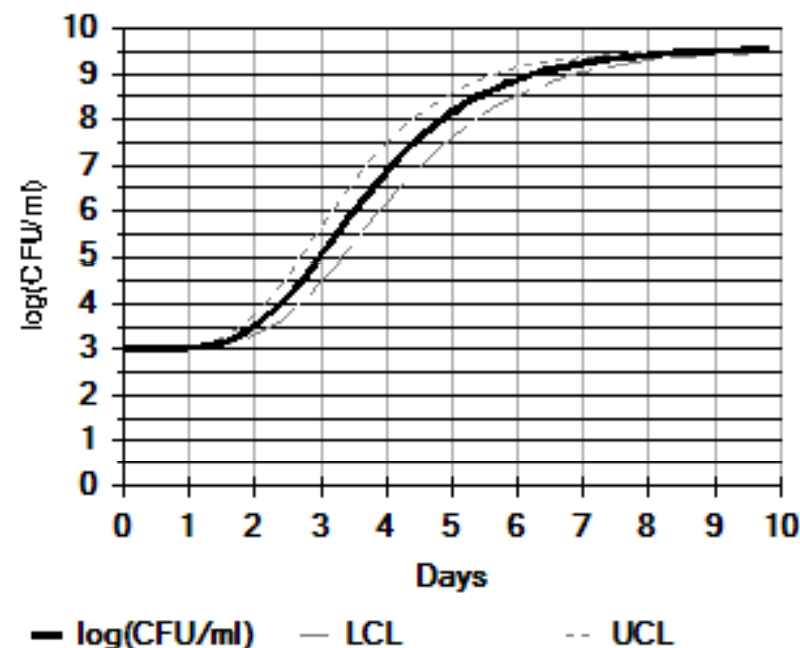
Lower Confidence Limit: 0.15

Upper Confidence Limit: 0.17

Time to Increase 3.0 logs: 3.50

Lower Confidence Limit: 3.15

Upper Confidence Limit: 3.88

Listeria monocytogenes in Broth Culture (NaCl)

ανάπτυξη με φάση προσαρμογής (1,91 ημέρες)

**Microorganism:***Listeria monocytogenes* (Broth Culture) (NaCl)**Input Conditions**
☒ Aerobic
 ☐ Anaerobic

Temperature:
 Range: 4 to 37

20.0 °C 68.0 °F

pH:
 Range: 4.5 to 7.5

5.0

Sodium Chloride (% [g/dL]):
 Range: 0.5 to 10.5

3.0 (% [g/dL]) Water Activity 0.983

Sodium Nitrite (ppm):
 Range: 0 to 150

0 (ppm)

Calculate Growth Data**Initial Level**

3.0 log(CFU/ml) 1000 CFU/ml

Level of Concern

6.0 log(CFU/ml) 1,000,000 CFU/ml

Source and/or Relevant Publications
 R.L. Buchanan, H.G. Stahl and R.C. Whiting, Effects and Interactions of Temperature, pH, Atmosphere, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite on the Growth of *Listeria monocytogenes*: Journal of Food Protection (1989) 52(12):844-851 - <http://www.arsame.gov/MES/HTML/ERRCPubs/5435.pdf>

 Related
 Publications
Calculate Model with:

Lag

No Lag

Time Scale:

Days

Hours

Display Format:

Show Table

Show Chart

Modeled Growth Parameters:Days**Lag Phase Duration:** 0.00

Lower Confidence Limit: 0.00

Upper Confidence Limit: 0.00

Generation Time: 0.16

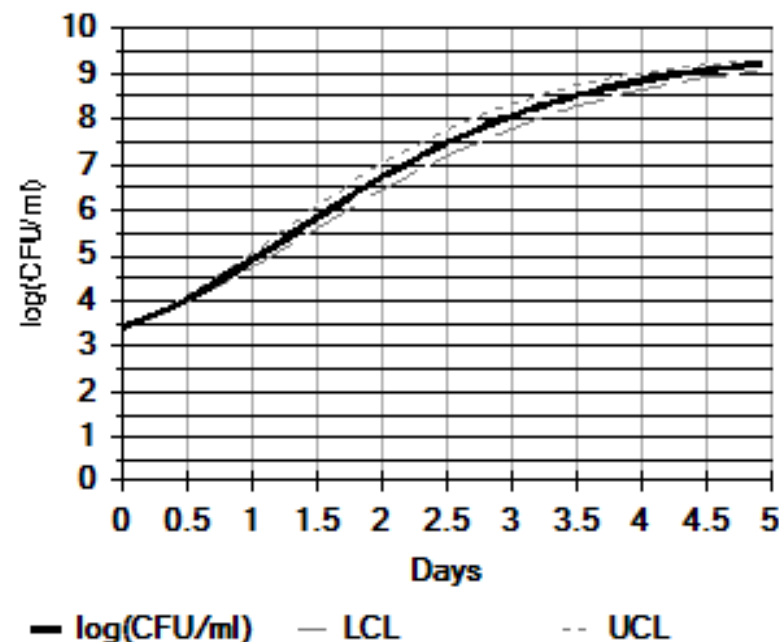
Lower Confidence Limit: 0.15

Upper Confidence Limit: 0.17

Time to Increase 3.0 logs: 1.58

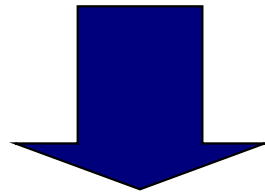
Lower Confidence Limit: 1.45

Upper Confidence Limit: 1.72

**FAQ about Lag and
 No Lag Calculations**
Listeria monocytogenes in Broth Culture (NaCl)

ανάπτυξη δίχως φάση προσαρμογής

Τρόποι μέτρησης μικροβιακού πληθυσμού (κυτταρικής συγκέντρωσης) ενός δείγματος



- ✓ διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία (serial decimal dilutions and plate counting)
- ✓ μετρήσεις θολερότητας (turbidity measurements)
- ✓ άμεση μικροσκοπική καταμέτρηση (direct microscopic count)
- ✓ μέθοδος της διήθησης ή της ηθμομεμβράνης (membrane filtration method)
- ✓ μετρήσεις αγωγιμότητας (impedance measurements)
- ✓ PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)
- ✓ κυτταρομετρία ροής (flow cytometry)

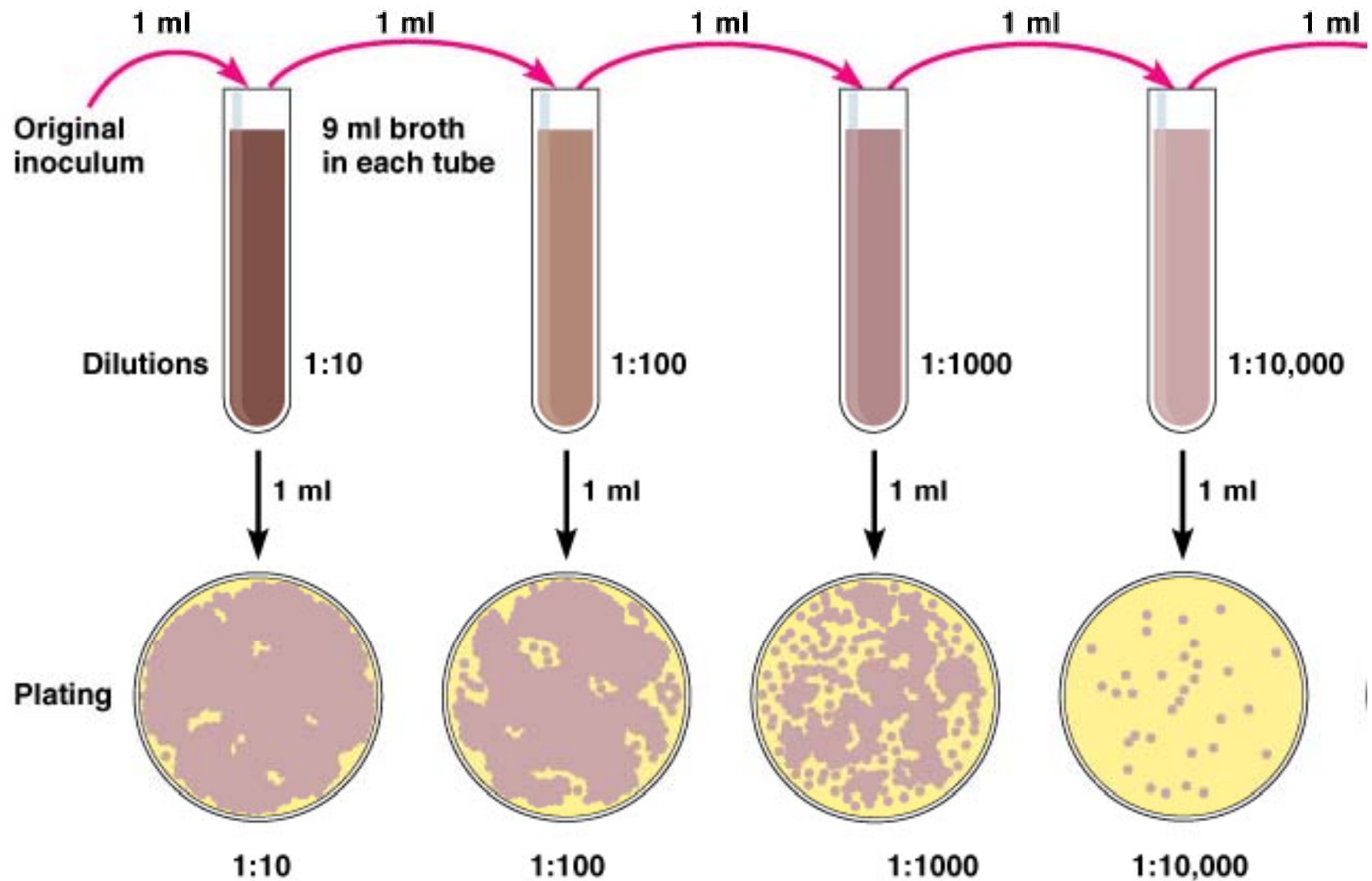
Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και καταμέτρηση σε τρυβλία

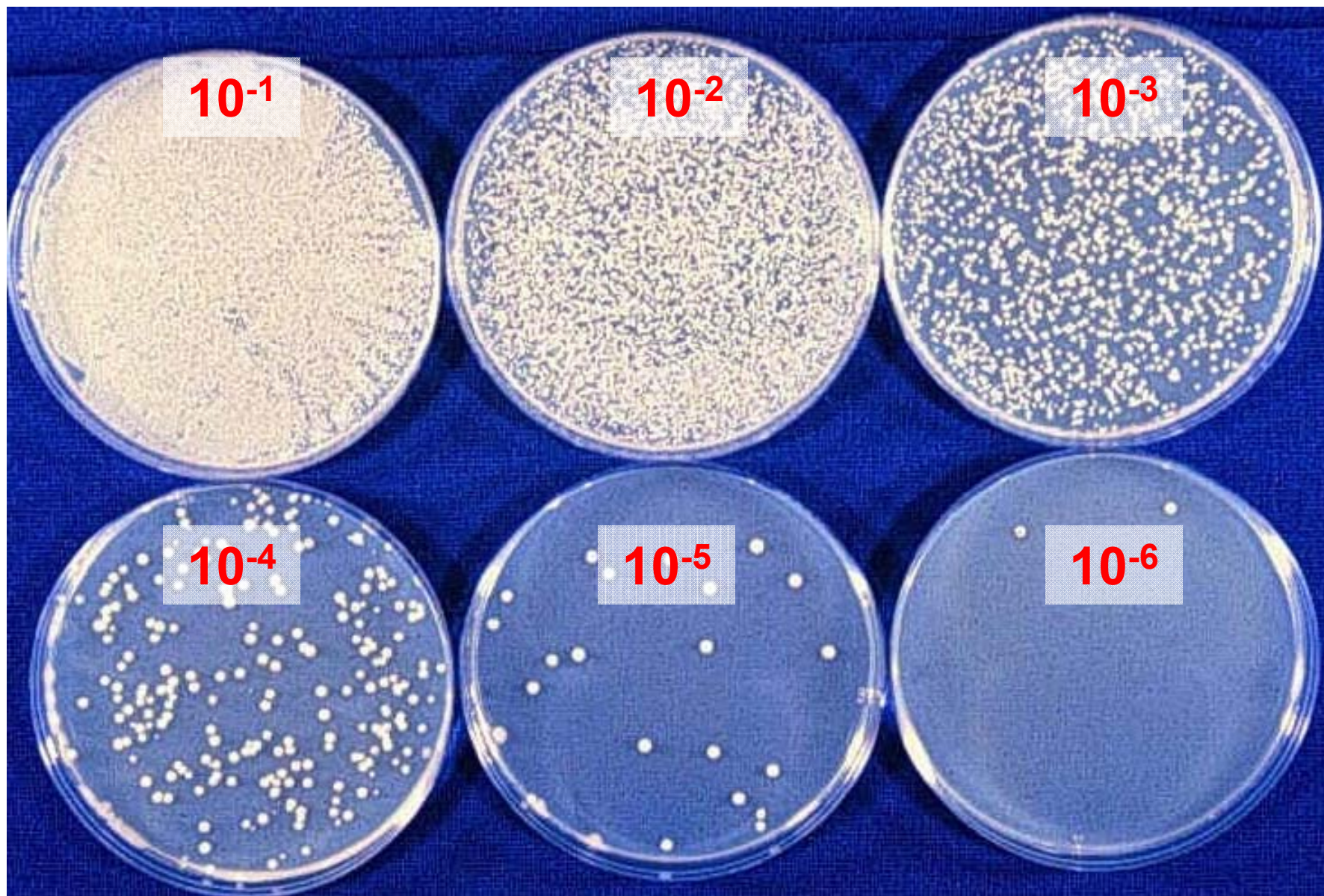
- Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος μέτρησης των βακτηριακών πληθυσμών είναι η **μέτρηση αποικιών πάνω σε στερεά θρεπτικά μέσα**.
 - Σημαντικό **πλεονέκτημα** αυτής της μεθόδου είναι ότι υπολογίζει τον αριθμό μόνο των **ζωντανών κυττάρων**.
 - Το **μειονέκτημά** της είναι ότι είναι **χρονοβόρος**, επειδή συνήθως απαιτούνται 24 ή και περισσότερες ώρες προκειμένου να αναπτυχθούν και να γίνουν ορατές οι αποικίες.
- Επειδή οι βακτηριακοί πληθυσμοί είναι συνήθως πολύ μεγάλοι, χρησιμοποιείται μια **σειρά αραιώσεων** του αρχικού δείγματος βακτηρίων και η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται στο πιο αραιό εναιώρημα.



αποικίες βακτηρίων στην επιφάνεια ενός στερεού θρεπτικού μέσου

διαδοχικές αραιώσεις και μέτρηση των αποικιών σε τρυβλία





τρυβλία με αποικίες, τα οποία το καθένα αντιστοιχεί σε διαφορετική δεκαδική αραίωση του ίδιου αρχικού δείγματος (κυτταρικού εναιωρήματος)

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ (CFU/ML) = ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ * ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

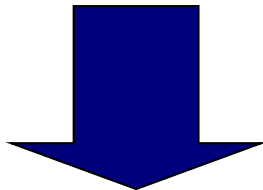
Αποικία μικροοργανισμών (π.χ. βακτηρίων)

- Στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου **κάθε βιώσιμο κύτταρο μπορεί να δώσει μια αποικία (colony).**
- **Μια αποικία είναι ένας μεγάλος αριθμός (10^8 - 10^9) μικροβιακών κυττάρων πάνω σ' ένα στερεό θρεπτικό υλικό που είναι ορατή με γυμνό μάτι.**

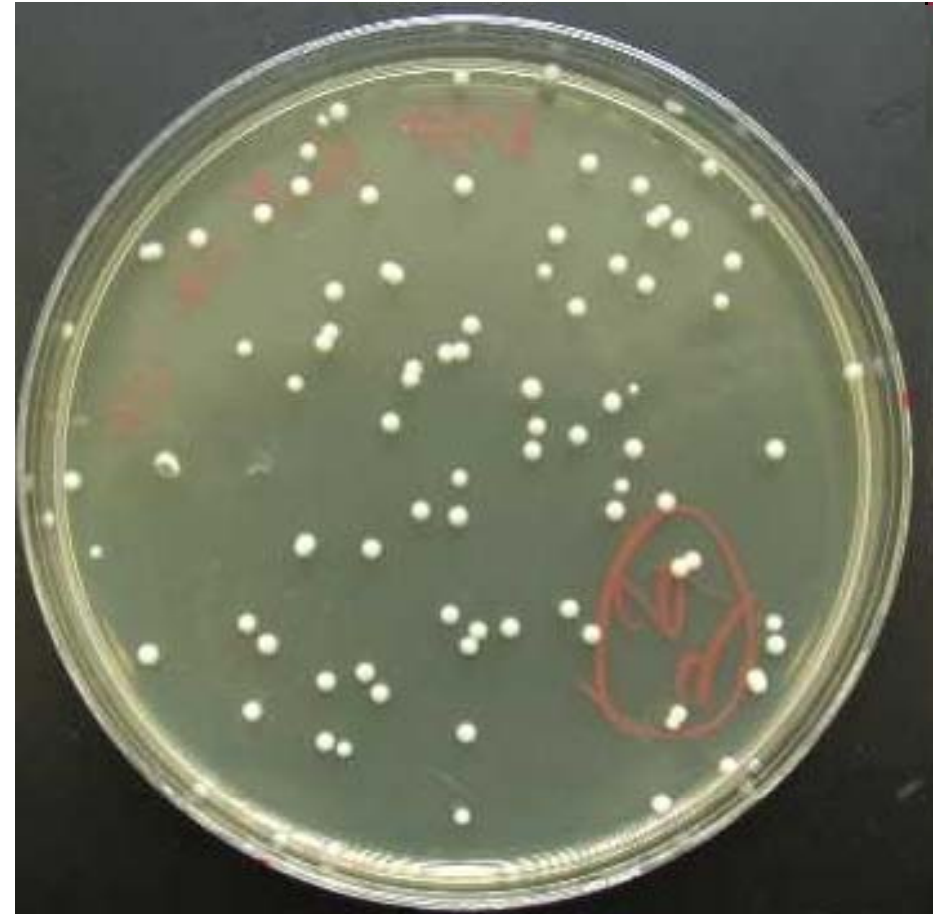


αποικίες μικροοργανισμών σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο. Κάθε αποικία μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει προέλθει από ένα κύτταρο

- Όμως, ένας μικροοργανισμός που κανονικά σχηματίζει **πολλαπλές κυτταρικές διευθετήσεις**, όπως αλυσίδες (chains), μια αποικία μπορεί να έχει προκύψει από αρκετά κύτταρα παρά από ένα μοναδικό κύτταρο.
- Επίσης πολλά βακτήρια μπορεί να σχηματίζουν **συμπαγείς μάζες** (clumped together).



- Για το λόγο αυτό, όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος της μέτρησης των αποικιών για τη μέτρηση ενός μικροβιακού πληθυσμού, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων εκφράζεται ως βιώσιμες μονάδες που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες (colony forming units, cfu).



αποικίες βακτηρίων στην επιφάνεια ενός στερεού θρεπτικού μέσου

Άμεση μικροσκοπική καταμέτρηση

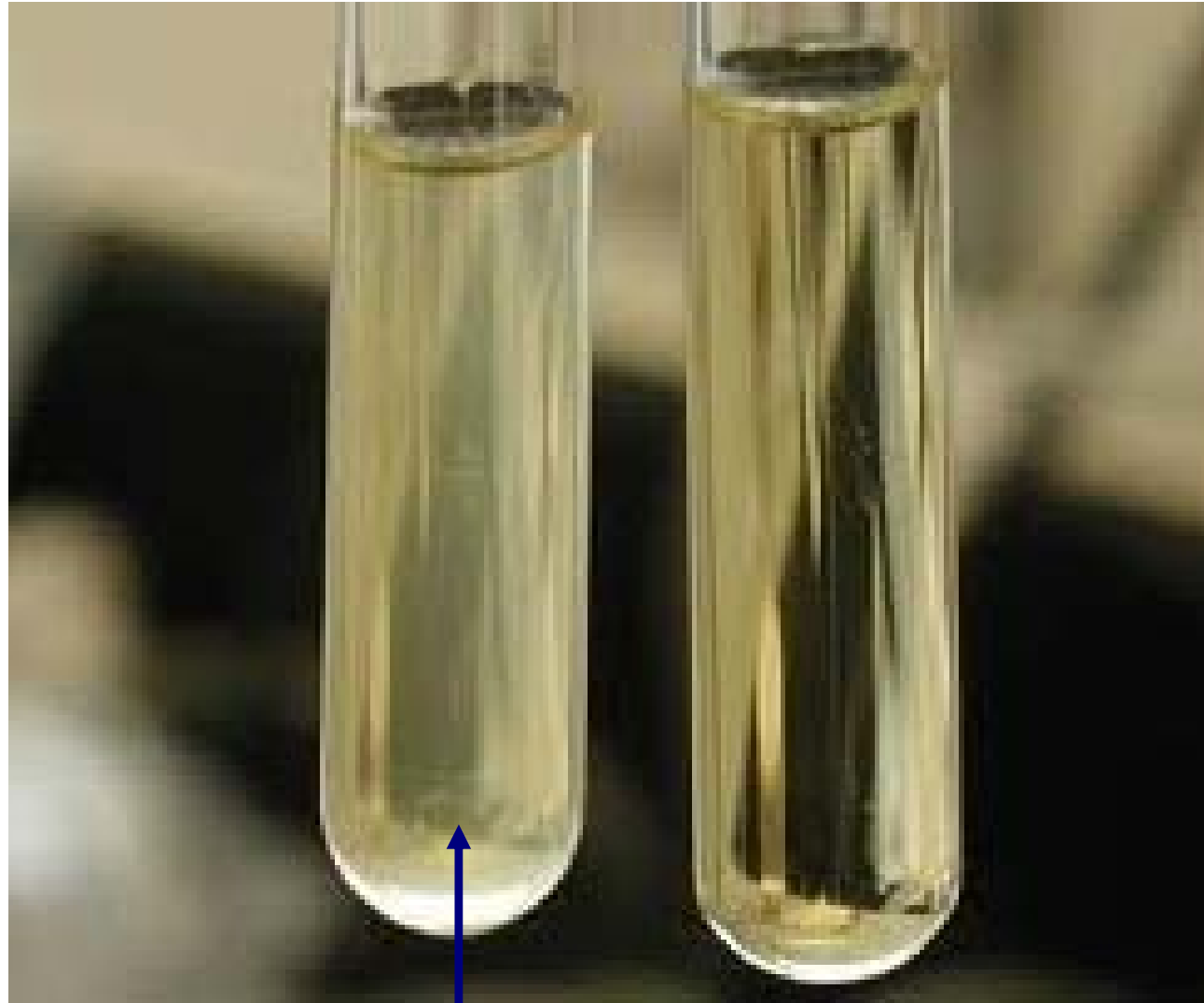


- Ο προσδιορισμός του ολικού αριθμού των κυττάρων σ' ένα μικροβιακό δείγμα είναι δυνατόν να προσδιοριστεί καταμετρώντας τα κύτταρα στο φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο (light microscope).
- **Εφαρμόζονται δύο τύποι άμεσης μικροσκοπικής καταμέτρησης:**
 - ✓ σε δείγματα που ξηραίνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες
 - ✓ **σε υγρά (νωπά) δείγματα**
- Στα υγρά δείγματα χρησιμοποιούνται ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες / **θάλαμοι καταμέτρησης (counting chambers).**
- Αυτές οι αντικειμενοφόρες πλάκες είναι χαραγμένες σχηματίζοντας **μικρά τετράγωνα γνωστού εμβαδού.**
- Πάνω από κάθε τετράγωνο μπορεί να χωρέσει ένας πολύ μικρός αλλά επακριβώς **υπολογισμένος όγκος υγρού δείγματος.**

Μετρήσεις θολερότητας (απορρόφησης)

- Οι μετρήσεις **θολερότητας** αποτελούν μια γρήγορη και εύκολη μέθοδο **έμμεσου υπολογισμού** του αριθμού των συνολικών κυττάρων ενός εναιωρήματος (ζωντανών και νεκρών).

- Ένα εναιώρημα κυττάρων φαίνεται **θολό** στο μάτι διότι τα κύτταρα **σκεδάζουν** (διασκορπίζουν) το φως που διέρχεται μέσα απ' αυτό.



υγρή καλλιέργεια με τουλάχιστον 10^6 κύτταρα ανά ml

➤ Η ικανότητα ενός κυτταρικού εναιωρήματος να «διασκορπίζει» το φως μπορεί να εκφραστεί:

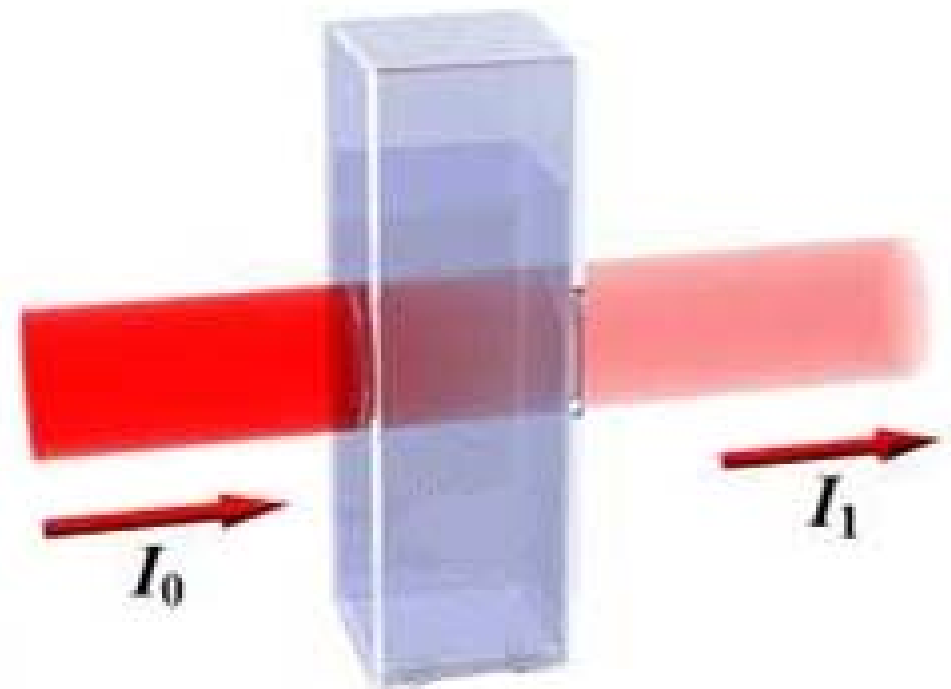
✓ είτε ως ποσότητα φωτός που **διαπερνά** (transmitted) διαμέσου του εναιωρήματος,

✓ είτε ως ποσότητα φωτός που **απορροφάται** (absorbed) απ' αυτό.

► Η ποσότητα του φωτός που απορροφάται αυξάνεται όσο αυξάνει ο μικροβιακός πληθυσμός του εναιωρήματος (δηλαδή η κυτταρική συγκέντρωση).

**ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ
(TRANSMITTANCE)**

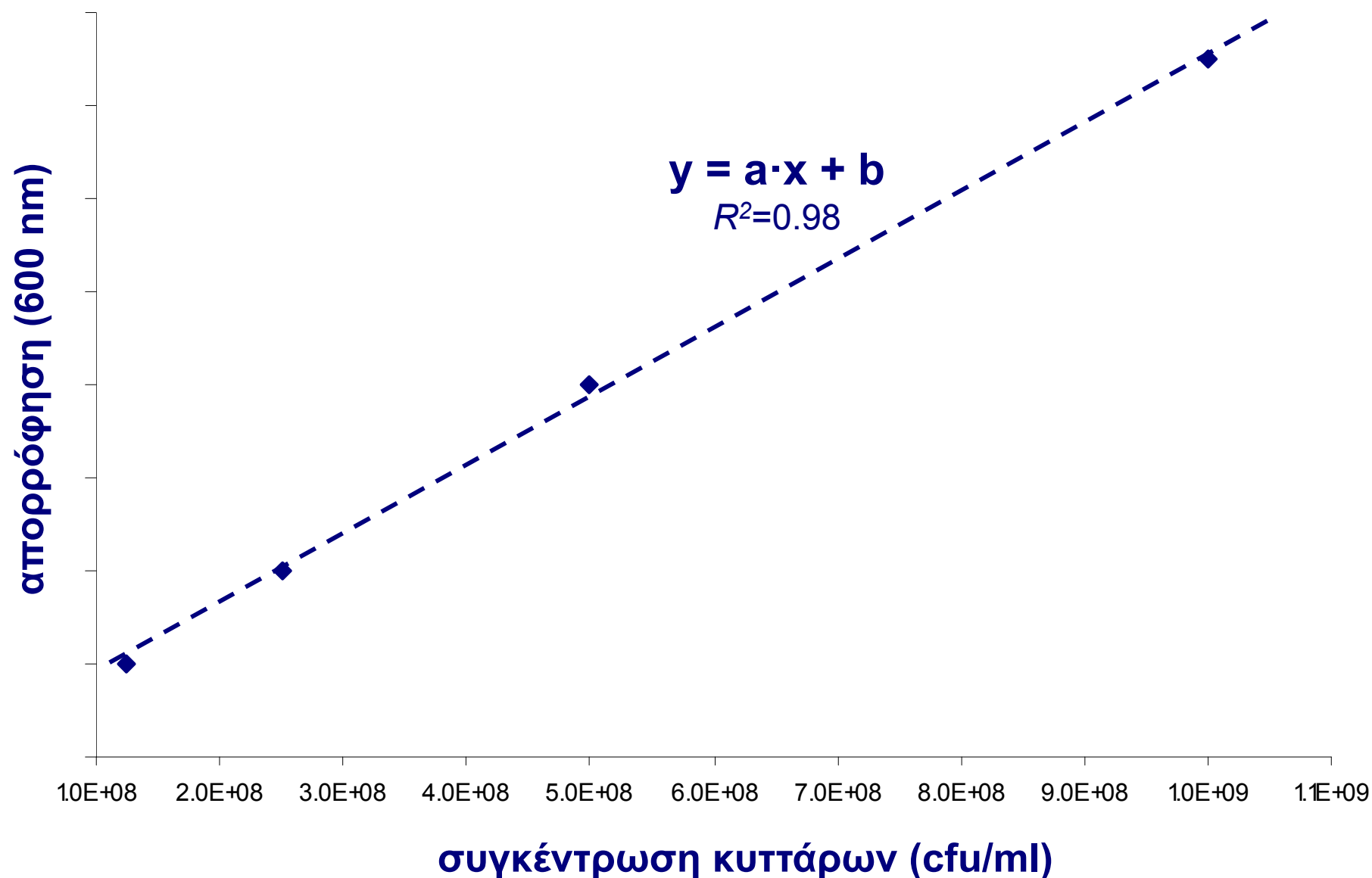
$$T = I_1/I_0$$



**ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ
(ABSORBANCE)**

$$A = \log_{10} (I_0/I_1) = -\log_{10} T$$

πρότυπη καμπύλη συσχέτισης των τιμών της απορρόφησης ($A_{600\text{nm}}$) με τις τιμές της κυτταρικής συγκέντρωσης (cfu/ml)



Όργανα μέτρησης απορρόφησης: φασματοφωτόμετρα



μικρό επιτραπέζιο
φασματοφωτόμετρο

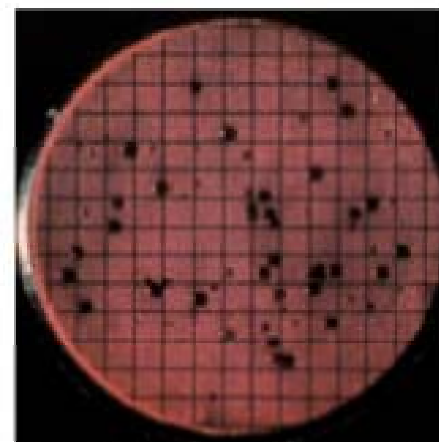
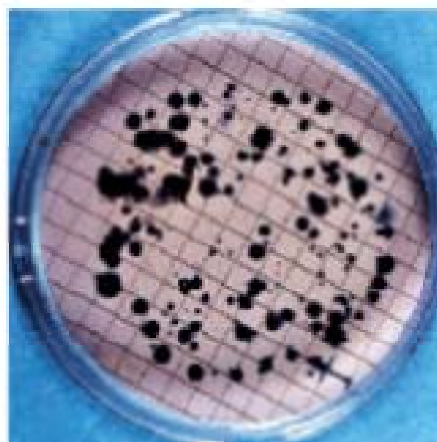
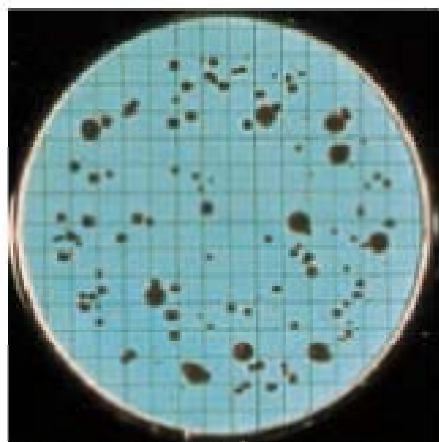
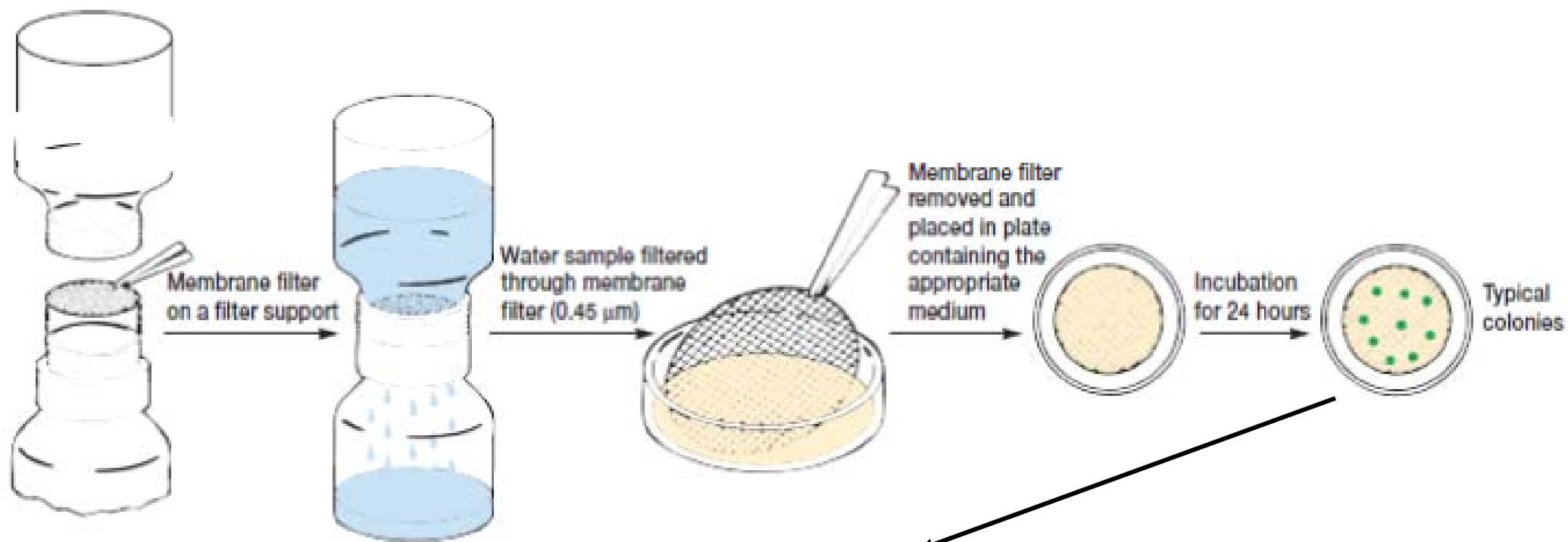


διαφόρων τύπων
κυβέττες (cuvettes)

θέση τοποθέτησης κυψελίδων
(κυβεττών)

Μέθοδος της ηθμομεμβράνης (διήθησης)

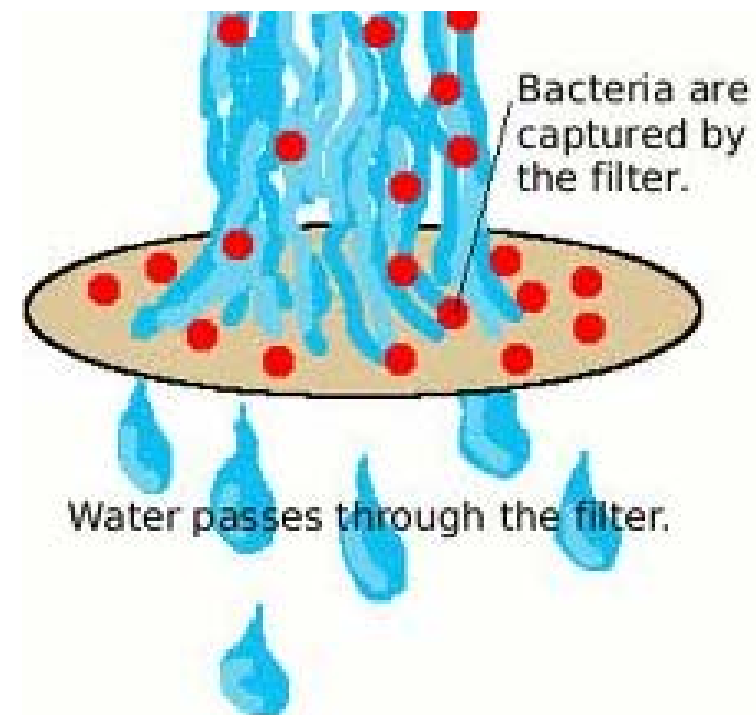
- Η μέθοδος της ηθμομεμβράνης χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών **σε υγρά δείγματα που συνήθως φέρουν χαμηλό μικροβιακό φορτίο** (<10 cfu/ml) (π.χ. πόσιμο νερό).
- **Σε αυτή τη μέθοδο:**
 - ✓ το υγρό δείγμα διηθείται διαμέσου ενός φίλτρου (δηλ. μεμβράνης με μικροσκοπικούς πόρους που συγκρατούν τα κύτταρα)
 - ✓ εν συνεχεία τα φίλτρα τοποθετούνται στην επιφάνεια στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων
 - ✓ ακολουθεί επώαση μέχρις ότου το κάθε κύτταρο να σχηματίσει μια ευδιάκριτη αποικία
- Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν **επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα** (ή επιλεκτικά και διαχωρισμού μαζί) για την επιλογή και καταμέτρηση συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών (π.χ. κολοβακτήρια).



**σχηματισμένες αποικίες σε μεμβρανικά φίλτρα
πάνω σε τρυβλία στερεών θρεπτικών υλικών**



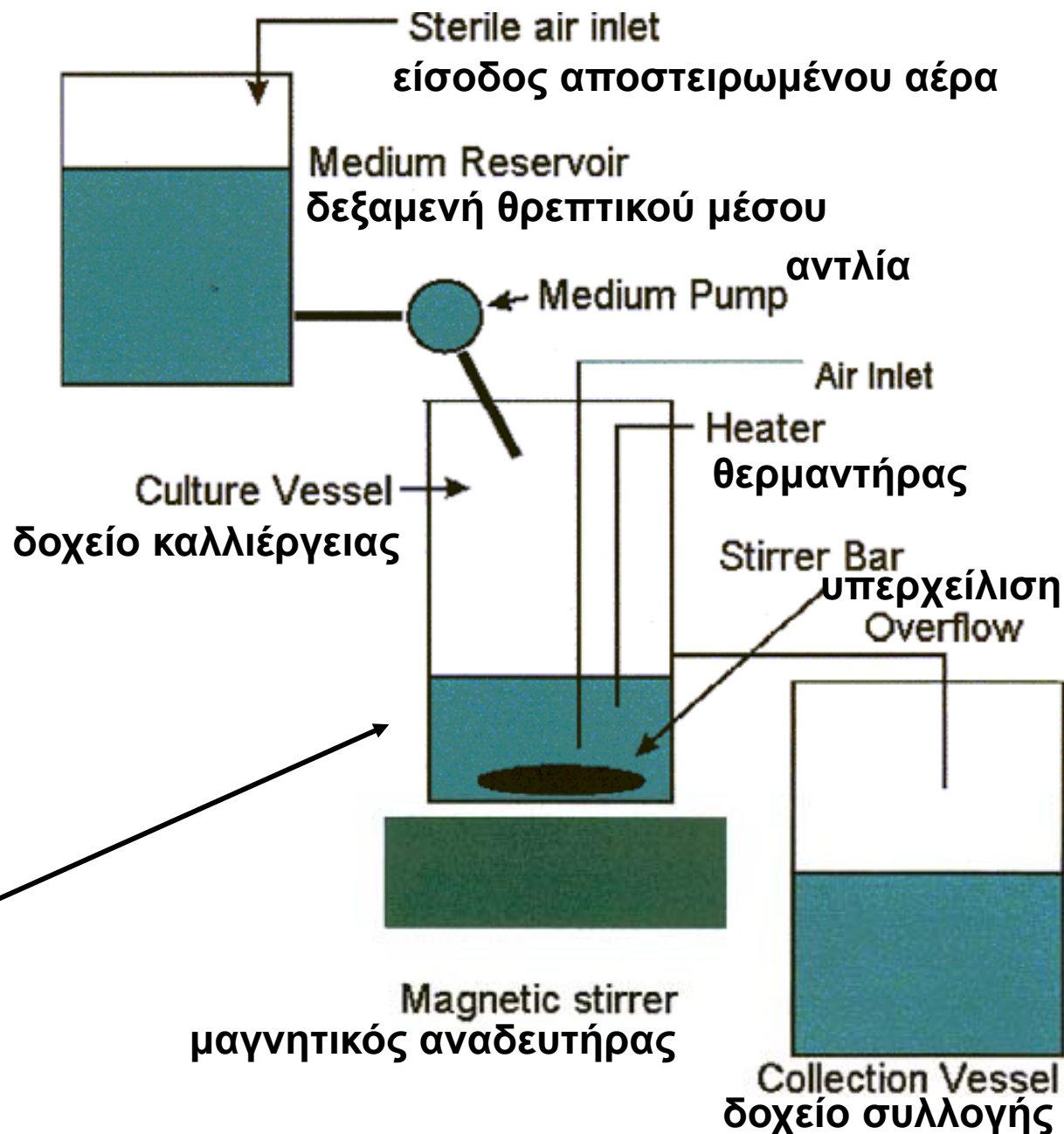
**τυπική συσκευή διήθησης
(φιλτραρίσματος)**

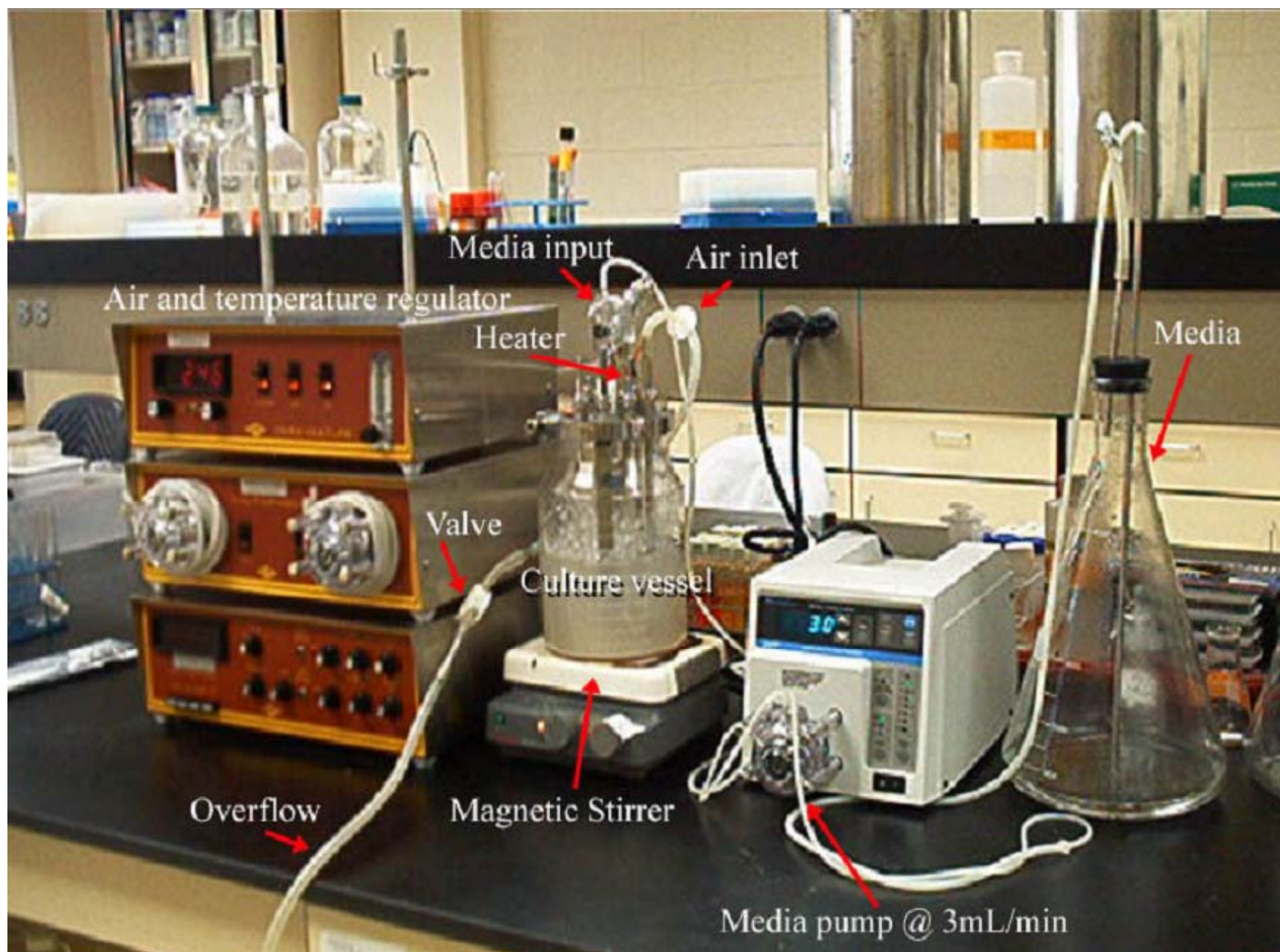


Συνεχής (ανοικτή) καλλιέργεια: χημειοστάτης

■ Μια **συνεχής καλλιέργεια** (continuous culture) είναι ένα σύστημα εισροής – εκροής σταθερού όγκου, στο οποίο συνεχώς προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό και απομακρύνονται τα προϊόντα του μεταβολισμού **με σταθερό ρυθμό**.

■ Ο συνηθέστερος τύπος συσκευής συνεχούς καλλιέργειας είναι ο **χημειοστάτης** (chemostat).



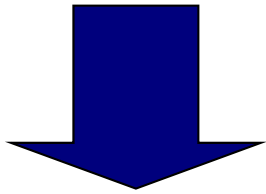


σύστημα συνεχούς καλλιέργειας (χημειοστάτης) στο εργαστήριο



Περιβαλλοντικές επιδράσεις στη μικροβιακή αύξηση

■ Οι δραστηριότητες των μικροοργανισμών επηρεάζονται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες.



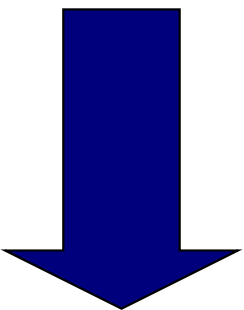
➤ Υπάρχουν 4 κύριοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή αύξηση:

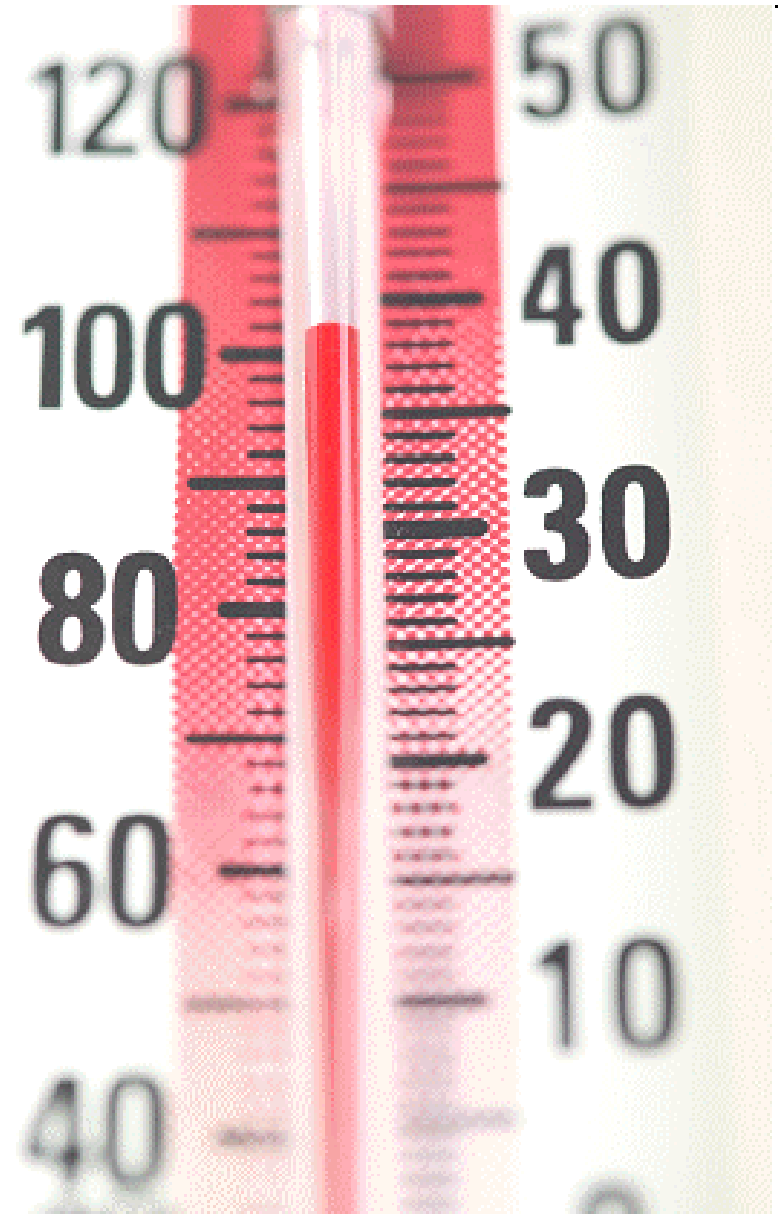
- ✓ η θερμοκρασία
- ✓ το pH (ενεργός οξύτητα)
- ✓ η διαθεσιμότητα του νερού (a_w)
- ✓ το οξυγόνο (O_2)





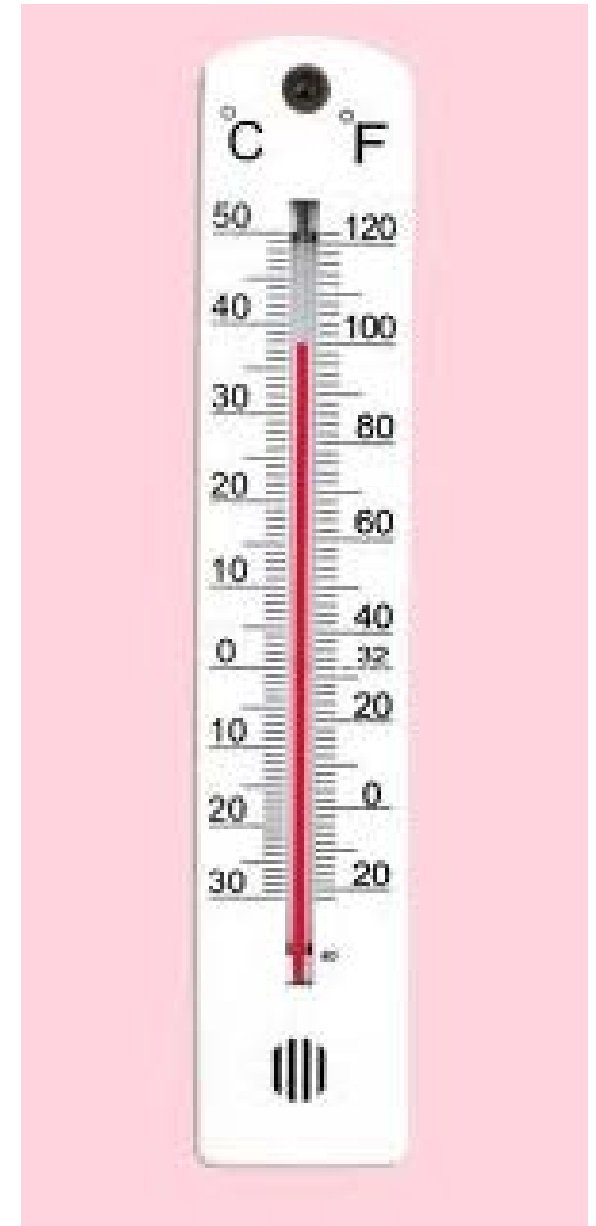
Επίδραση της θερμοκρασίας στη μικροβιακή ανάπτυξη

- Η **μικροβιακή ανάπτυξη** διεκπεραιώνεται μέσω **ενζυμικών αντιδράσεων**.
 - Επειδή η **θερμοκρασία** επηρεάζει τις ενζυμικές αντιδράσεις (δηλαδή τον κυτταρικό μεταβολισμό), είναι ένας από τους πιο **σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες** που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
- 
- ✓ Έτσι, μέσα σε κάποιο συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος για κάθε μείωση της θερμοκρασίας κατά 10°C , ο χρόνος γενεάς ενός μικροοργανισμού διπλασιάζεται.



Ελάχιστη, βέλτιστη και μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης

- Κάθε μικροοργανισμός αναπτύσσεται μόνο **εντός ενός συγκεκριμένου εύρους θερμοκρασιών**, όπου η ελάχιστη από τη μέγιστη διαφέρουν κατά περίπου 30-40°C.
- Η **ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης** (minimum) είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται ανάπτυξη ενός είδους.
- Η **βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης** (optimum) είναι η θερμοκρασία στην οποία το είδος αναπτύσσεται με μέγιστο ρυθμό (πιο γρήγορα).
- Η **μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης** (maximum) είναι η υψηλότερη θερμοκρασία στην οποία η μικροβιακή ανάπτυξη είναι δυνατή.



Σχέση μεταξύ θερμοκρασίας και ρυθμού αύξησης

- Αν αναπαραστήσουμε γραφικά το ρυθμό αύξησης σε σχέση με τη θερμοκρασία, παρατηρούμε πως η **άριστη θερμοκρασία** βρίσκεται πάντοτε πλησιέστερα στη **μέγιστη** παρά στην **ελάχιστη**.

- Πάνω από τη βέλτιστη θερμοκρασία, ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται γρήγορα.



- Κάτω από την ελάχιστη θερμοκρασία, οι μικροοργανισμοί απλώς σταματούν να αναπτύσσονται, ενώ πάνω από τη μέγιστη, οι μικροοργανισμοί αρχίζουν να θανατώνονται.

Κατηγορίες μικροοργανισμών με βάση τις θεμελιώδεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

(ελάχιστη, άριστη και μέγιστη)

Κατηγορία μικροοργανισμού	Θερμοκρασίες ανάπτυξης (°C)*		
	ελάχιστη	άριστη	μέγιστη
υπερθερμόφιλοι	65	80-100	120
θερμόφιλοι	45	55 - 65	80
μεσόφιλοι	10	30 - 40	45
ψυχρόφιλοι	-5	10 - 15	20
ψυχρότροφοι	0	20 - 30	40

* Οι τιμές των θερμοκρασιών αυτών δεν είναι απόλυτες (not clear-cut)

■ Οι ψυχρόφιλοι

μικροοργανισμοί βρίσκονται σε μονίμως ψυχρά περιβάλλοντα (π.χ. πολικές περιοχές) και μπορεί να πεθάνουν γρήγορα ακόμα και με σύντομη έκθεση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

■ Οι οργανισμοί που αυξάνονται σε θερμοκρασίες ψύξης (4°C), αλλά έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 20-30°C λέγονται **ψυχρότροφοι** ή **ψυχροανεκτικοί** (psychrotrophs, psychrotolerants).

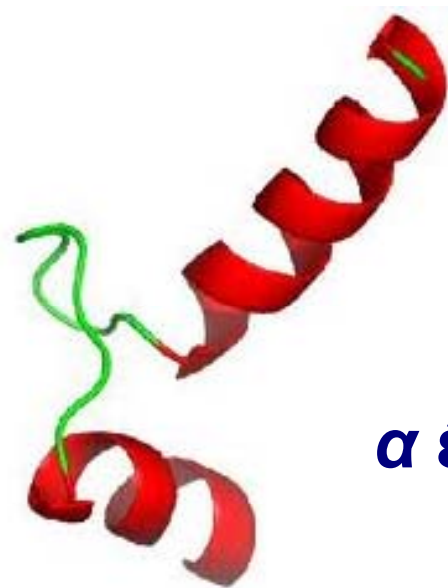
■ Πολλοί από τους μικροοργανισμούς που προκαλούν πρόβλημα σε τρόφιμα που συντηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης είναι **ψυχρότροφοι** (π.χ. βακτήρια του γένους *Pseudomonas*).



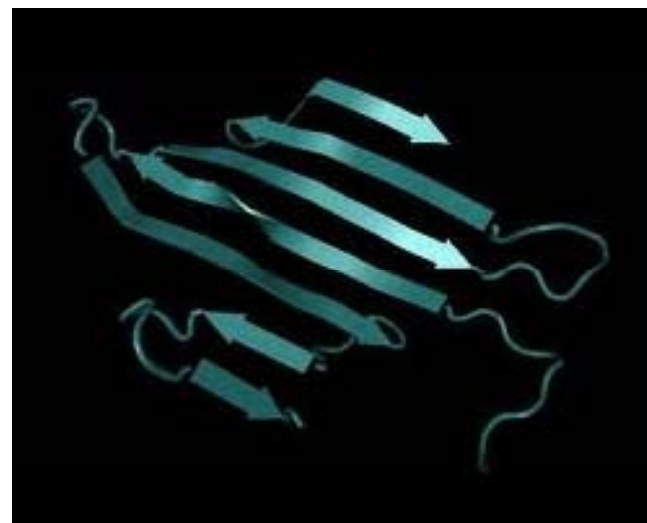
Pseudomonas fluorescens

Μοριακές προσαρμογές στη ψυχροφιλία

- Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί παράγουν **ένζυμα που λειτουργούν άριστα σε ψυχρές θερμοκρασίες.**
- Τα **ψυχροενεργά ένζυμα** έχουν:
 - ✓ περισσότερες **α -έλικες**
 - και
 - ✓ λιγότερες **β -πτυχωτές επιφάνειες** σε σχέση με άλλα ένζυμα που απενεργοποιούνται στις χαμηλές θερμοκρασίες.
- Η ύπαρξη **α -ελίκων** προσδίδει ευκινησία στις πρωτεΐνες.



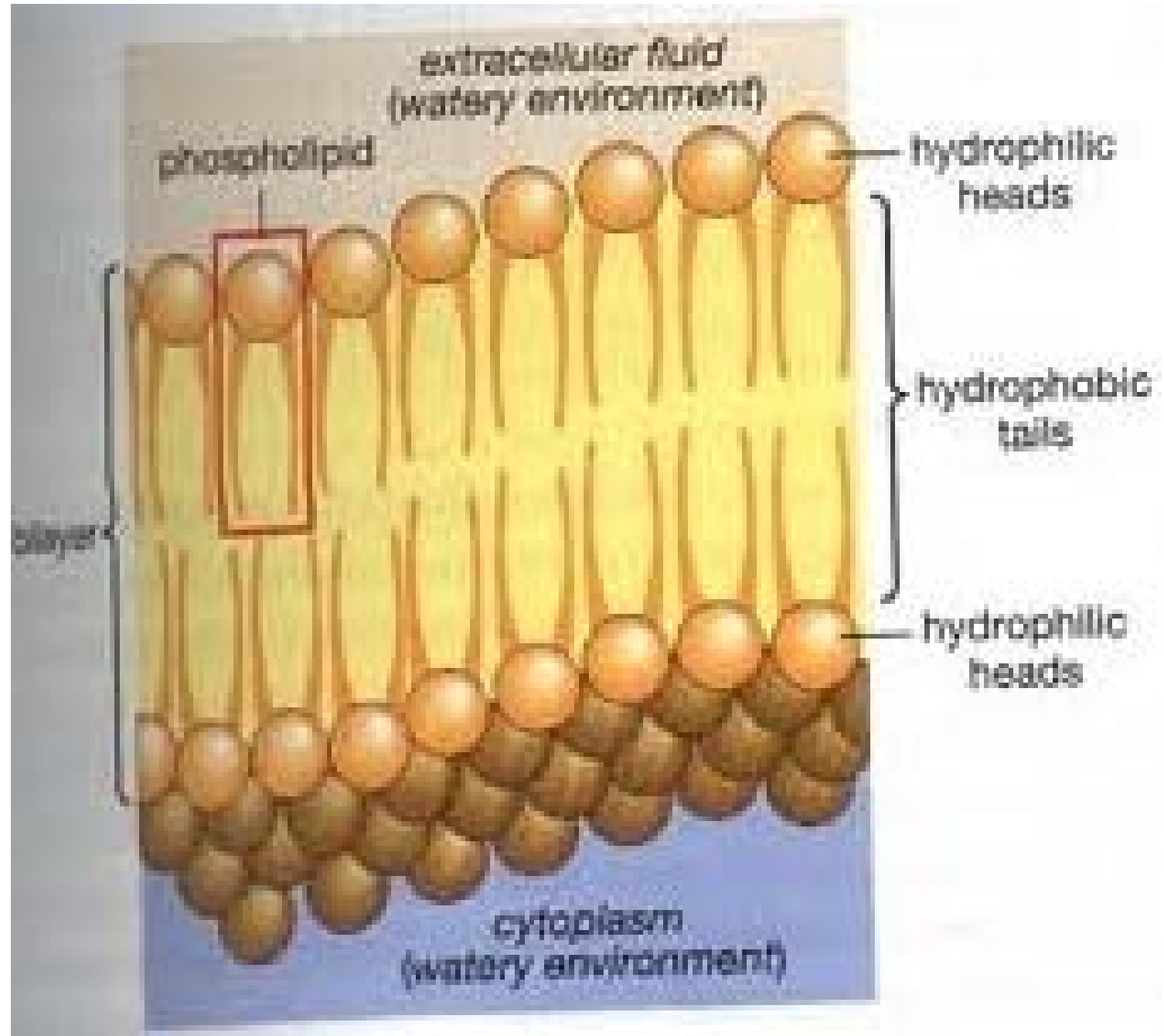
α έλικες



β πτυχωτές επιφάνειες

- Οι **κυτταρικές μεμβράνες** των ψυχρόφιλων μικροοργανισμών έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **ακόρεστα λιπαρά οξέα**.

- Τα **ακόρεστα λιπαρά οξέα** συμβάλλουν στη διατήρηση της ημίρευστης κατάστασης σε χαμηλές θερμοκρασίες.



Μικροβιακή αύξηση σε υψηλές θερμοκρασίες

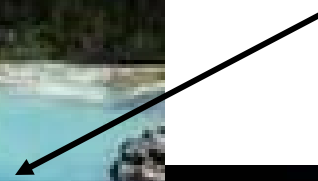
- Πάνω από τους 65°C επιζούν μόνο προκαρυώτες (βακτήρια, αρχαία).
- Τα **θερμόφιλα** είναι μικροοργανισμοί που έχουν συνήθως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης $55\text{-}65^{\circ}\text{C}$ και **δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες κάτω των 45°C .**
- Ορισμένα αρχαιοβακτήρια έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 80°C ή και υψηλότερη (**υπερθερμόφιλα ή ακραίως θερμόφιλα**).



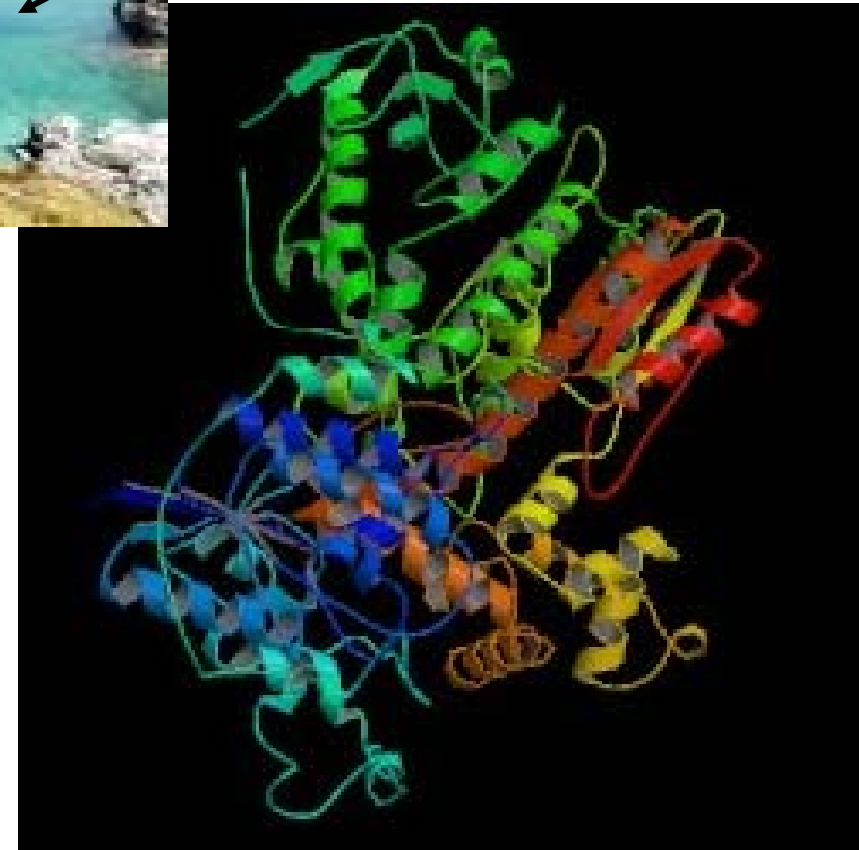
θερμή πηγή



θερμή πηγή



κύτταρα του θερμόφιλου βακτηρίου *Thermus aquaticus*, το οποίο αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 50 έως 80°C



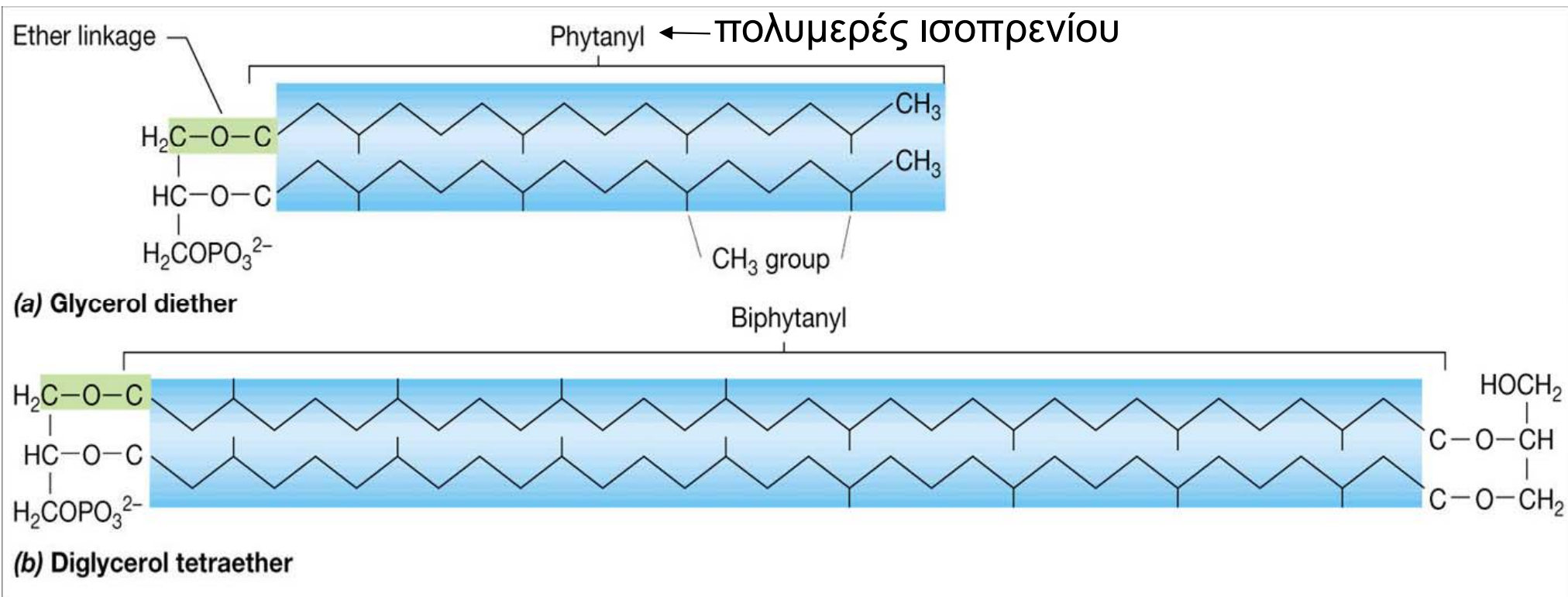
τριτοταγής δομή της *Taq* DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιείται στην αντίδραση PCR

Μοριακές προσαρμογές στη θερμοφιλία

- Αρκετά **θερμοσταθερά ένζυμα** συχνά διαφέρουν ελάχιστα, όσον αφορά την πρωτοταγή δομή, από ένζυμα των μεσόφιλων οργανισμών.
- ✓ Πιστεύεται πως λίγες σημαντικές αμινοξικές αντικαταστάσεις επιτρέπουν στα ένζυμα να πτυχώνονται (διπλώνονται) με τρόπο που τους προσφέρει θερμική σταθερότητα.
- Επίσης, η **σταθερότητα των πρωτεϊνών** στα υπερθερμόφιλα βελτιώνεται από:
 - ✓ τους **ιοντικούς δεσμούς** ανάμεσα στα αμινοξέα και
 - ✓ τον **έντονο υδρόφοβο χαρακτήρα** του εσωτερικού τους
- Οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί έχουν **λιπίδια πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα**, κάτι που επιτρέπει στις μεμβράνες τους να παραμένουν σταθερές και λειτουργικές στις υψηλές θερμοκρασίες (παρουσιάζουν δηλαδή **αυξημένη θερμοκρασία μετάπτωσης**).

Μεμβρανικά λιπίδια υπερθερμόφιλων αρχαίων: τετρααιθέρες διγλυκερόλης

- Τα αρχαία περιέχουν στις μεμβράνες τους επαναλαμβανόμενες μονάδες **ισοπρενίου (C5)** συνδεδεμένες με **αιθερικό δεσμό** στη φωσφογλυκερόλη.
- Οι **μονοστοιβάδες λιπιδίων** αποτελούμενες από **τετρααιθέρες διγλυκερόλης** είναι εξαιρετικά ανθεκτικές, και γι' αυτό βρίσκονται συχνά στα **υπερθερμόφιλα (hyperthermophilic)** αρχαία.



κρίσιμες
θερμοκρασίες
ανάπτυξης για
διαφόρους
προκαρυωτικούς
μικροοργανισμούς

μικροοργανισμός	κρίσιμες θερμοκρασίες (°C)		
	ελάχιστη	βέλτιστη	μέγιστη
Μη-φωτοσυνθετικοί προκαρυώτες			
<i>Bacillus psychrophilus</i>	-10	23-24	28-30
<i>Micrococcus cryophilus</i>	-4	10	24
→ <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	25-30	40
→ <i>Staphylococcus aureus</i>	6.5	30-37	46
→ <i>Enterococcus faecalis</i>	0	37	44
→ <i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	30	35-36	38
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	45	59	62
→ <i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	60-65	75
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60	80	85
<i>Pyrococcus abyssi</i>	67	96	102
<i>Pyrodictium occultum</i>	82	105	110
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90	106	113
Φωτοσυνθετικά βακτήρια			
→ είδη βακτηρίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τα τρόφιμα			
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	ND ^a	30-35	ND
<i>Anabaena variabilis</i>	ND	35	ND
<i>Oscillatoria tenuis</i>	ND	ND	45-47
<i>Synechococcus eximius</i>	70	79	84

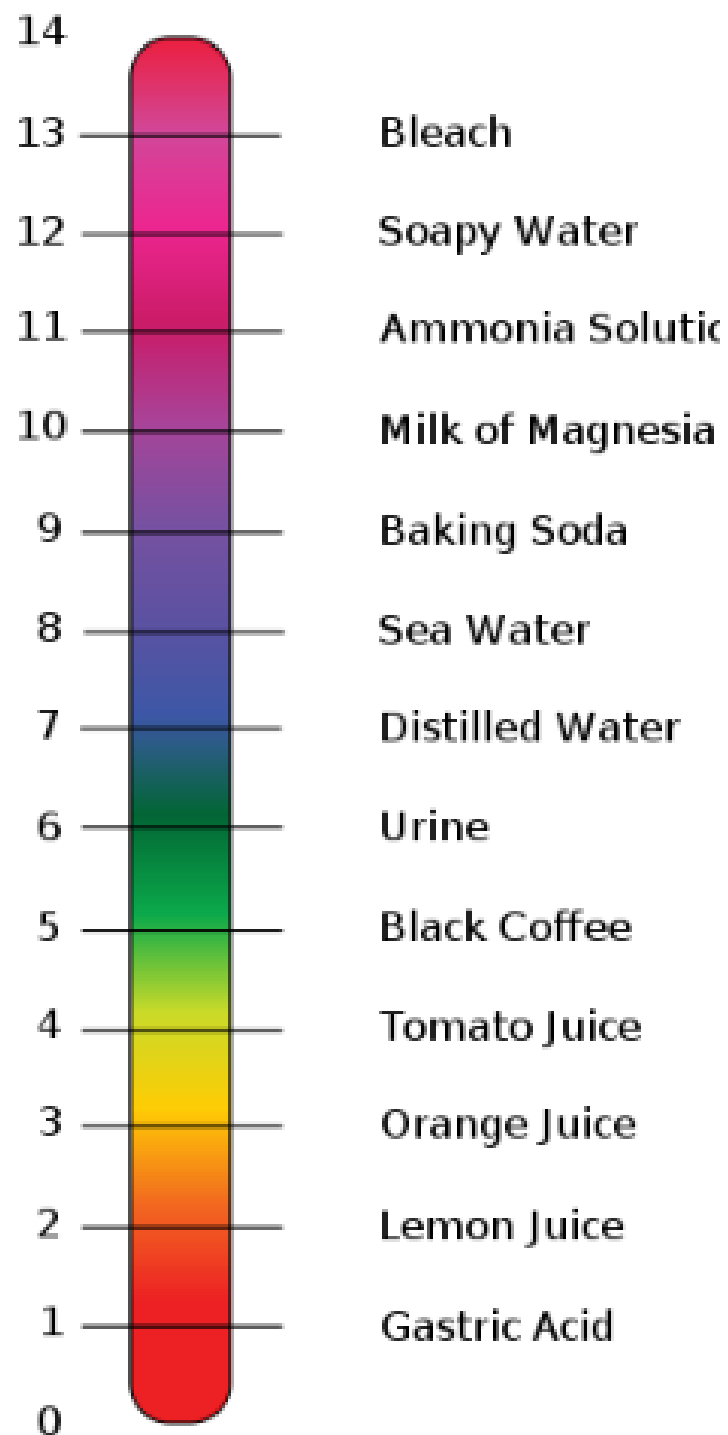


Επίδραση του pH (ενεργού οξύτητας) στη μικροβιακή ανάπτυξη

- Το **pH** δείχνει τη **συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου** (πρωτονίων) σ' ένα σύστημα (π.χ. τρόφιμο) και εκφράζεται σαν:

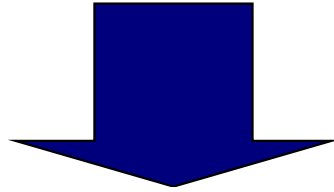
$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$$

- Το εύρος του κυμαίνεται από **0 έως 14**, με:
- ❖ **pH = 7** να είναι το **ουδέτερο**
- ❖ **pH > 7** το **βασικό ή αλκαλικό**
- ❖ **pH < 7** το **όξινο**



Ελάχιστο, βέλτιστο και μέγιστο pH ανάπτυξης

- Κάθε μικροβιακό είδος έχει ένα **ελάχιστο**, ένα **βέλτιστο** και ένα **μέγιστο** pH για ανάπτυξη.

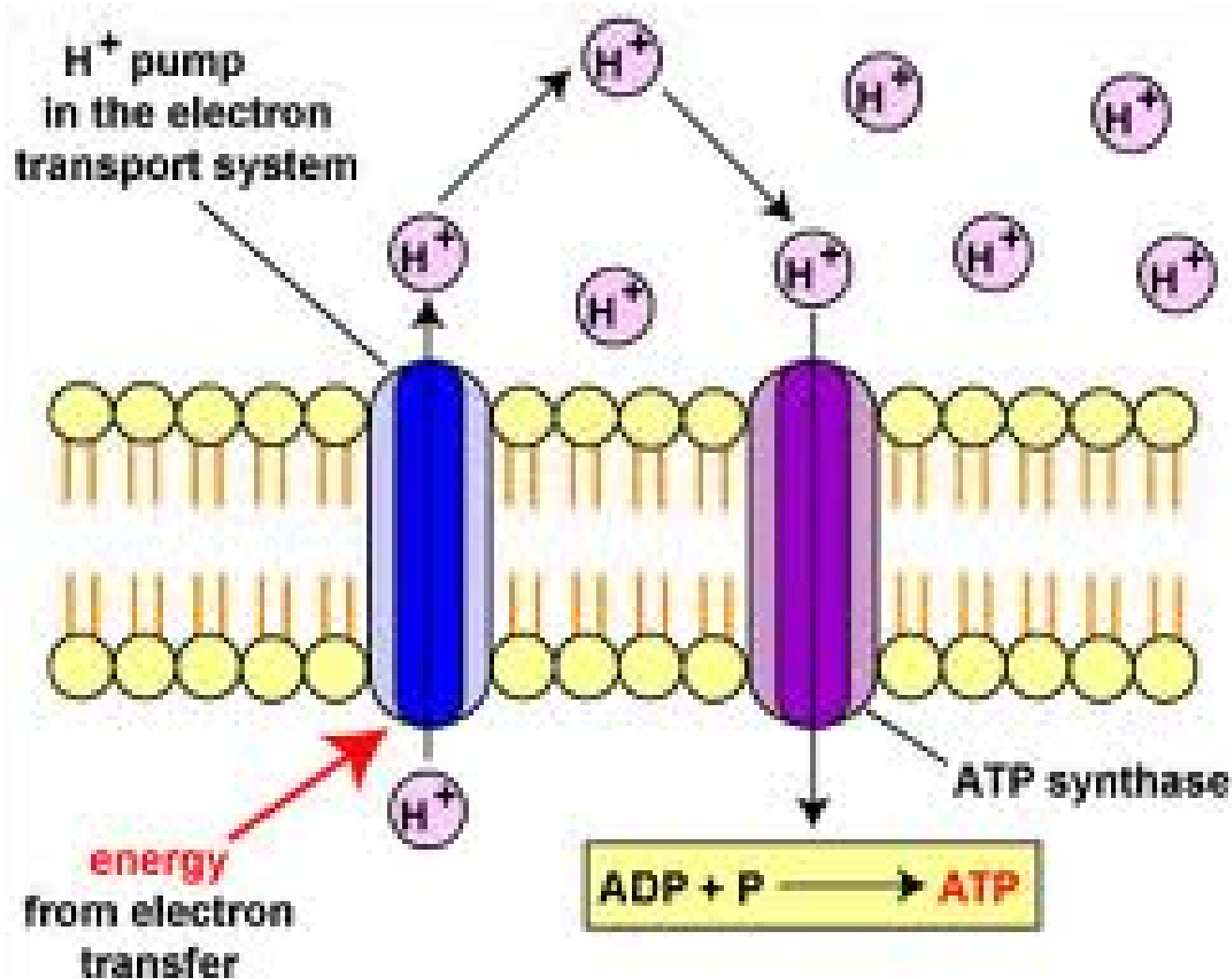


- Τα **περισσότερα βακτήρια** αναπτύσσονται βέλτιστα σε τιμές pH κοντά στο ουδέτερο (6,5-7,5).
- Πολύ λίγα βακτήρια αναπτύσσονται σε όξινες τιμές $\text{pH} < 4$.
- Οι **μύκητες (μούχλες και ζύμες)** αναπτύσσονται σε μεγαλύτερο εύρος τιμών pH (1,5-9,0), σε σχέση με τα βακτήρια (4,0-9,0), αλλά το βέλτιστο pH των μυκήτων είναι γενικά μικρότερων από εκείνο των βακτηρίων (συνήθως 5-6).
- Όταν οι μικροοργανισμοί εκτίθεται σε τιμές pH χαμηλότερες από το ελάχιστο ή το μέγιστο για ανάπτυξη, αυτοί θανατώνονται.

Πρωτονιεγερτική δύναμη (proton motive force)

- Για τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών και τη σύνθεση της ενέργειας, τα βακτήρια διατηρούν μια **διαμεμβρανική βαθμίδωση pH** (transmembrane pH gradient) **περίπου 0,5-1,0 μονάδα** (με πιο αλκαλικό το εσωτερικό pH) και μια **βαθμίδωση πρωτονίων** (περίπου 200 mV).

- Τα δύο αυτά μαζί συνιστούν την **πρωτονιεγερτική δύναμη**.



- Το **ενδοκυτταρικό pH** θα πρέπει να παραμένει σχετικά κοντά στην ουδετερότητα, ακόμα και αν το εξωκυττάριο είναι πολύ όξινο ή πολύ βασικό.
- Σε μια **κλειστή καλλιέργεια** το pH συνήθως μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αύξησης, εξαιτίας των χημικών αντιδράσεων του μεταβολισμού (π.χ. παραγωγή οξέων, αλκαλικών ενώσεων).
- Προκειμένου να διατηρείται το pH της καλλιέργειας σταθερό, συνήθως προστίθενται στο θρεπτικό υλικό κάποιο **ρυθμιστικό διάλυμα** (buffer solution).
- Ένα πολύ **αποτελεσματικό ρυθμιστικό διάλυμα** που χρησιμοποιείται συχνά σε καλλιεργητικά υλικά είναι ένα **μείγμα K_2HPO_4 και KH_2PO_4** (για εύρος τιμών pH κοντά στην ουδετερότητα (pH 6-7,5)).





Επίδραση της ενεργότητας του νερού (a_w) στη μικροβιακή ανάπτυξη

- Η **ενεργότητα νερού** (water activity, a_w) είναι ένα μέτρο της **διαθεσιμότητας του νερού για βιολογικές λειτουργίες** και σχετίζεται με το νερό που βρίσκεται σ' ένα περιβάλλον σε ελεύθερη μορφή.
- Η **ενεργότητα του νερού ισούται με το λόγο της τάσης των ατμών του νερού (P) που περιέχει κάποια διαλυμένη ουσία, προς την τάση ατμών του καθαρού νερού (P_0)**.

$$a_w = P/P_0$$

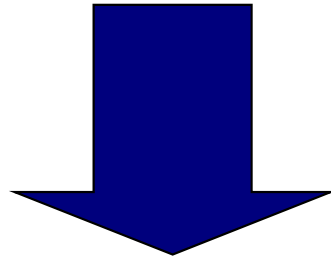
- **Τάση ατμών** (vapor pressure) ενός υγρού σε μια ορισμένη θερμοκρασία είναι η **πίεση των ατμών** του υγρού, όταν ατμοί και υγρό βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας (δηλαδή η ταχύτητα εξάτμισης είναι ίση με την ταχύτητα υγροποίησης).



φορητή συσκευή μέτρησης της ενεργότητας νερού

- **Αν το ελεύθερο νερό στο περιβάλλον ενός κυττάρου (π.χ. σε κάποιο τρόφιμο) μειωθεί (δηλαδή μειωθεί η ενεργότητα νερού):**
 - ✓ είτε απομακρύνοντας νερό (μέσω ξήρανσης, συμπύκνωσης ή κρυσταλλοποίησης λόγω κατάψυξης)
 - ✓ είτε προσθέτοντας διαλυμένες ουσίες και υδρόφιλα κολλοειδή, τα οποία δεν μπορούν να μπουν εύκολα στα κύτταρα,

το ελεύθερο νερό των κυττάρων μετακινείται στο εξωτερικό προκειμένου να αποκατασταθεί η ισορροπία.



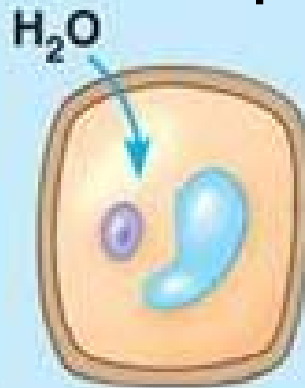
- **Η απώλεια του νερού προκαλεί ωσμωτικό σοκ (osmotic shock) και πλασμόλυση (plasmolysis) κατά τη διάρκεια των οποίων τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται.**
- **Η απώλεια του νερού μπορεί να είναι αρκετά αξιοσημείωτη ακόμα και για μια πολύ μικρή μείωση της τιμής της a_w .**

υποτονικό διάλυμα

Hypotonic solution



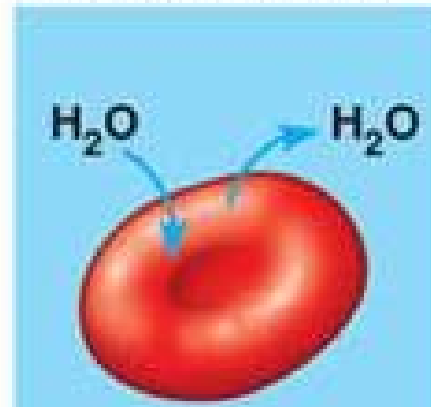
Lysed
λύση



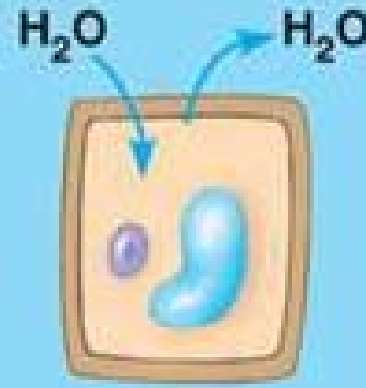
Turgid (normal)
«φουσκωμένο»
(φυσιολογικό)

ισότονο διάλυμα

Isotonic solution



Normal
ισορροπία



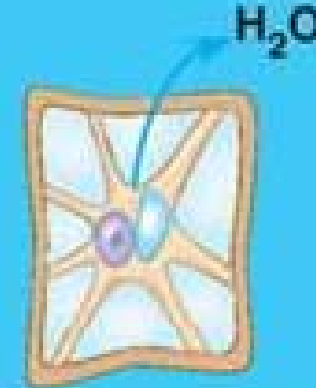
Flaccid
«πλαδαρό»

υπερτονικό διάλυμα

Hypertonic solution



Shriveled
συρρίκνωση



Plasmolyzed
πλασμόλυση

ζωικό
κύτταρο

βακτήριο ή
φυτικό
κύτταρο

επίδραση διαφόρων ωσμωτικών διαλυμάτων σ' ένα κύτταρο με κυτταρικό τοίχωμα (π.χ. βακτήριο) ή χωρίς αυτό (π.χ. ζωικό κύτταρο)

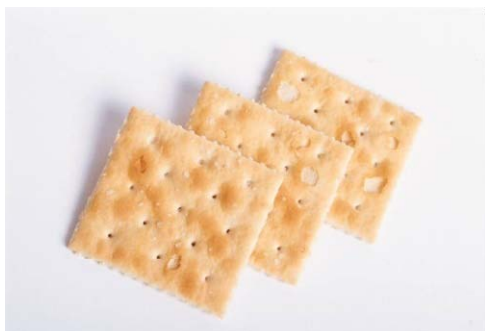
ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΣΥΝΗΘΙΣΜ. ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ενεργότητα νερού	συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου	
	<i>Molal</i>	<i>Percent, w/v</i>
0.995	0.15	0.9
0.99	0.30	1.7
0.98	0.61	3.5
0.96	1.20	7
0.94	1.77	10
0.92	2.31	13
0.90	2.83	16
0.88	3.33	19
0.86	3.81	22

θαλασσινό νερό

μπορεί να αναπτυχθεί ο *Staphylococcus aureus* !

σχέση ανάμεσα στην ενεργότητα νερού (a_w) και στη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl, αλάτι)



κρακεράκια ($a_w \approx 0,10$)



παρμεζάνα ($a_w \approx 0,72$)



ζυμούμενα αλλαντικά
($a_w \approx 0,90$)



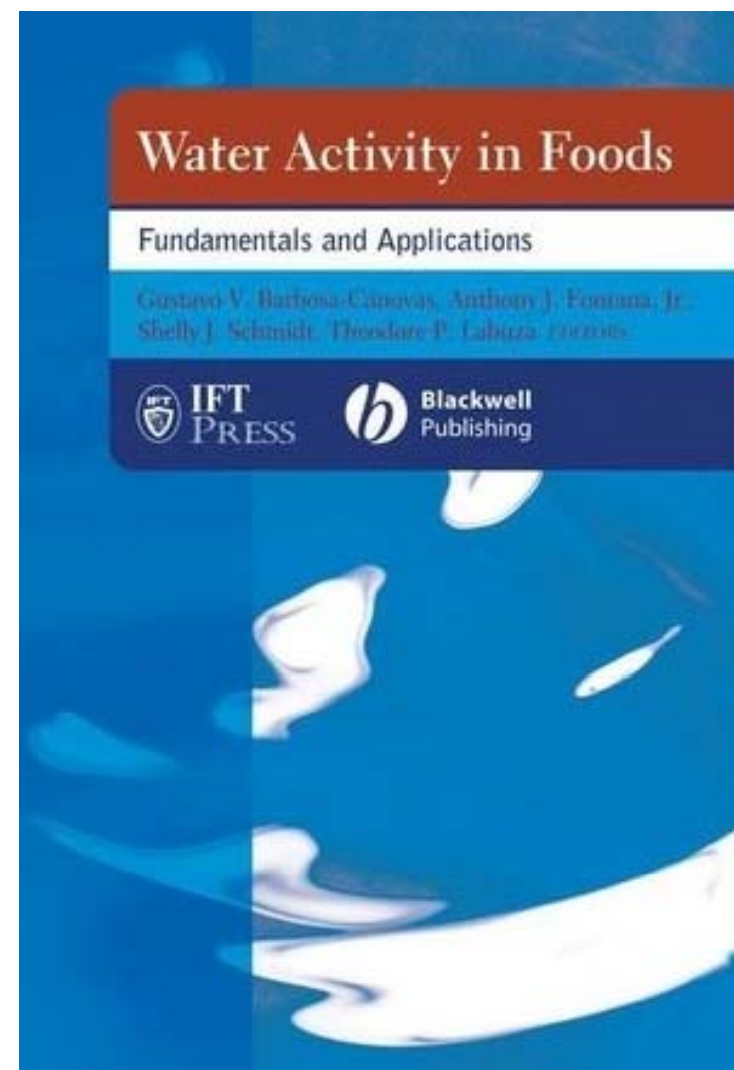
ψωμί ($a_w \approx 0,96$)



παστά ψάρια ($a_w \approx 0,95$)



αυγά ($a_w \approx 0,99$)

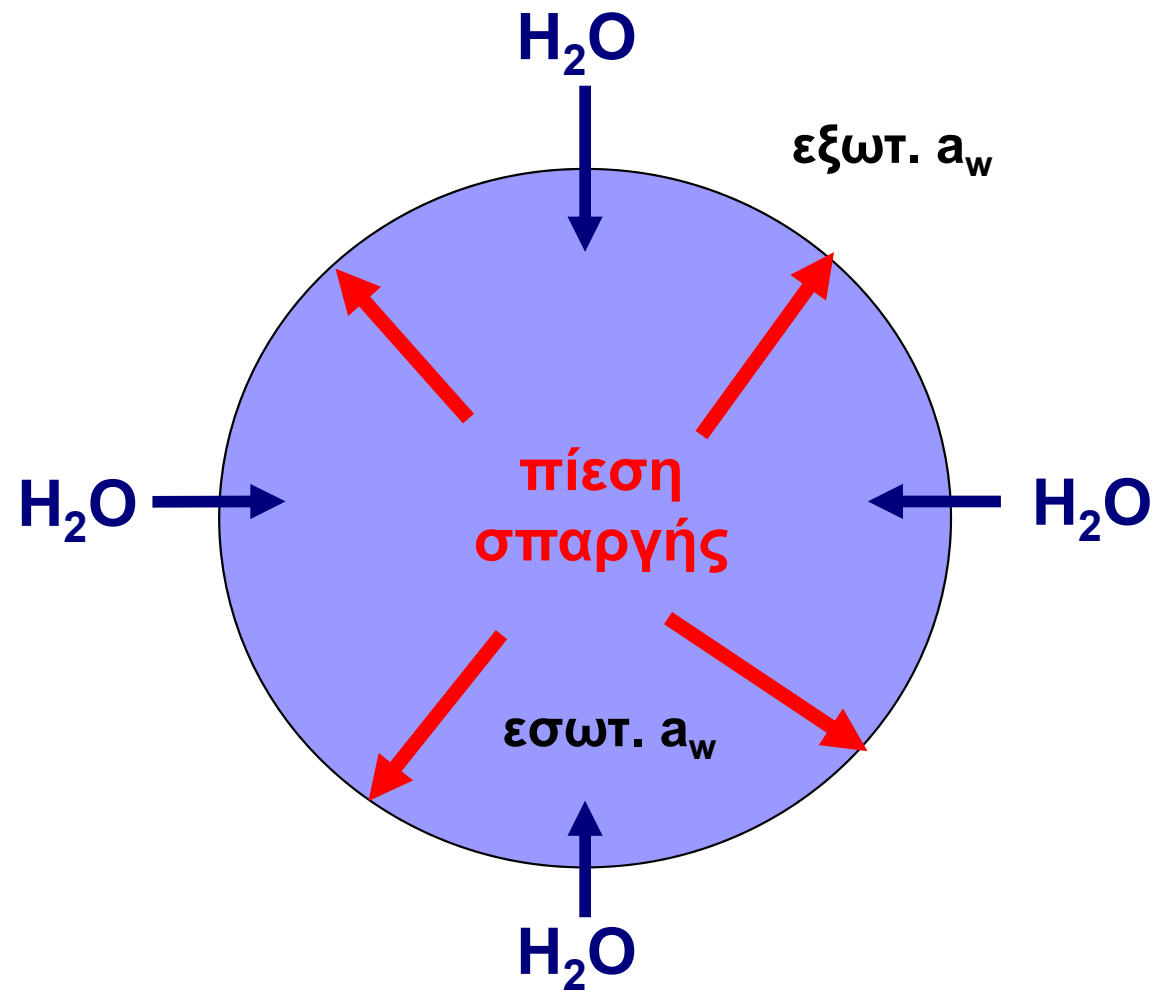


Editors: G.V. Barbosa-Cánovas, A.J. Fontana, Jr., S.J. Schmidt and T.P. Labuza
ISBN: 978-0-8138-2408-6

p. 440, 2007, Wiley-Blackwell,

Ενδοκυττάρια ενεργότητα νερού και πίεση σπαργής

- Οι μικροοργανισμοί με **κυτταρικό τοίχωμα** (π.χ. βακτήρια, μύκητες) διατηρούν **ελαφρώς χαμηλότερη ενεργότητα νερού στο εσωτερικό των κυττάρων** σε σχέση με το εξωτερικό περιβάλλον, προκειμένου να διατηρήσουν την **πίεση σπαργής** (turgor pressure, turgidity) και αυτό είναι σημαντικό για την κυτταρική ανάπτυξη.



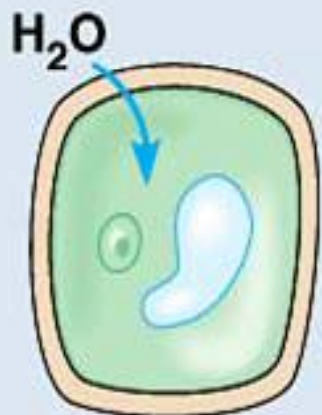
βακτηριακό κύτταρο
ισχύει a_w (εσωτ.) < a_w (εξωτ.)

➤ Με τη διαδικασία της ώσμωσης το νερό διαχέεται:

- από μια περιοχή υψηλής συγκέντρωσης νερού (χαμηλής συγκέντρωσης διαλυμένης ουσίας, **μεγάλο a_w**)
 - προς μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης νερού (υψηλής συγκέντρωσης διαλυμένης ουσίας, **μικρό a_w**).
- Η ενεργότητα νερού καθίσταται περιοριστική για ένα κύτταρο όταν η συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών στο περιβάλλον αυξάνεται πέρα από κάποιο όριο.

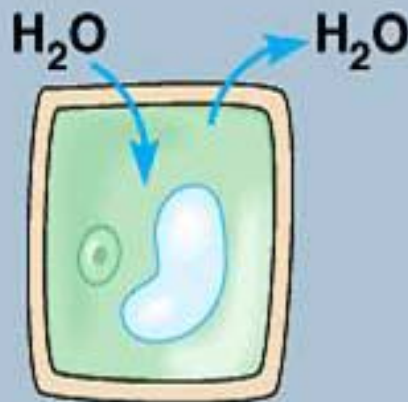


υποτονικό διάλυμα



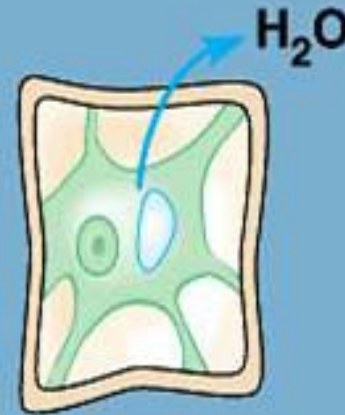
«φουσκωμένο»
(φυσιολογικό)

ισότονο διάλυμα



«πλαδαρό»

μειωμένο a_w
υπερτονικό διάλυμα



πλασμόλυση

γεγονότα που λαμβάνουν χώρα όταν ένα κύτταρο με κυτταρικό τοίχωμα (π.χ. βακτήριο) βρεθεί στις 3 πιθανές ωσμωτικές συνθήκες

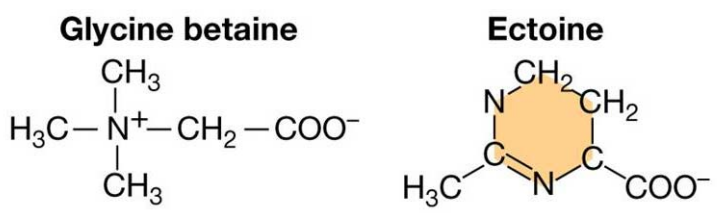
➤ Όμως, κάποιοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει πολύ αποτελεσματικούς μηχανισμούς, όπως:

- ✓ μεταφορά διαλυμένων ουσιών στο εσωτερικό των κυττάρων (συμβατές διαλυμένες ουσίες)
- ✓ ενδοκυττάρια σύνθεση κάποιων διαλυμένων ουσιών

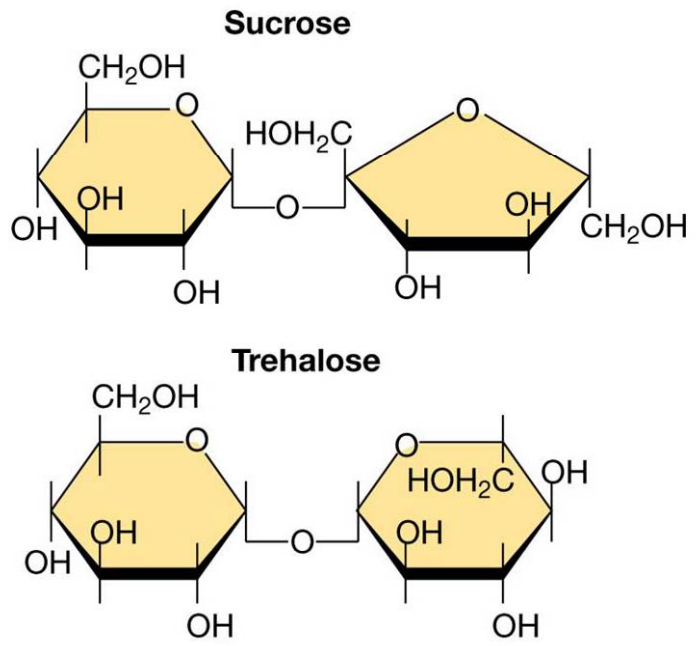
για να υπερνικήσουν την πλασμόλυση και να ξανακερδίσουν τη χαμένη πίεση σπαργής.

■ Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτύσσονται σε σχετικά μικρές τιμές a_w (π.χ. ωσμώφιλες ζύμες και μούχλες) συνήθως παρουσιάζουν αυτή την ικανότητα.

1. Amino acid-type solutes:



2. Carbohydrate-type solutes:



χημικές δομές μερικών κοινών συμβατών διαλυμένων ουσιών που συναντώνται στους μικροοργανισμούς



Επίδραση του οξυγόνου (O_2) στη μικροβιακή ανάπτυξη

■ Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της κυτταρικής **αερόβιας αναπνοής** (aerobic respiration).

➤ **Βάση των απαιτήσεων τους σε αέριο μοριακό οξυγόνο (O_2), οι μικροοργανισμοί διακρίνονται στους:**

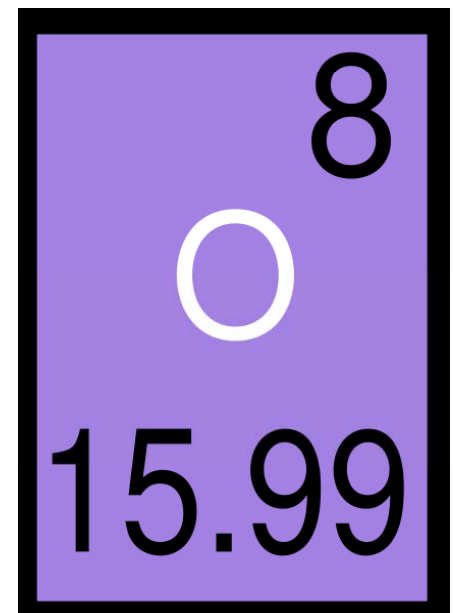
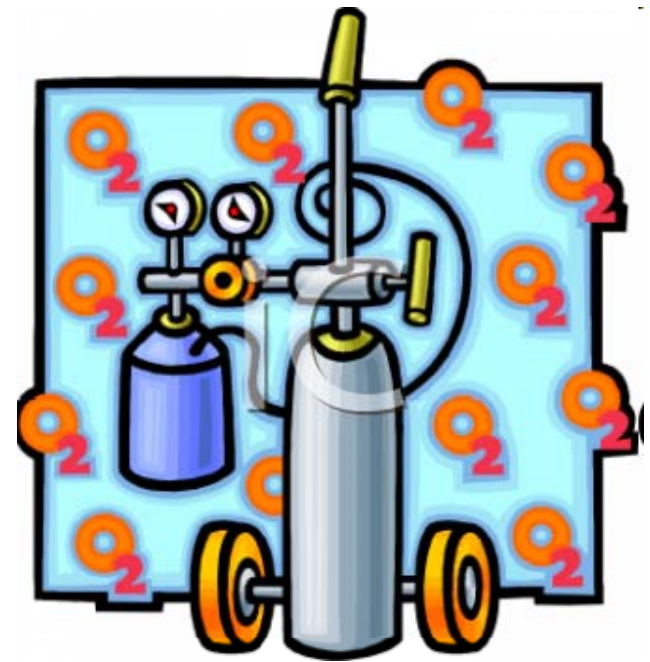
✓ υποχρεωτικά αερόβιους (obligate aerobes)

✓ προαιρετικά αναερόβιους (facultative anaerobes)

✓ υποχρεωτικά αναερόβιους (obligate anaerobes)

✓ μικροαερόφιλους (microaerophiles)

✓ αεροανθεκτικούς (aerotolerants)



Υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί

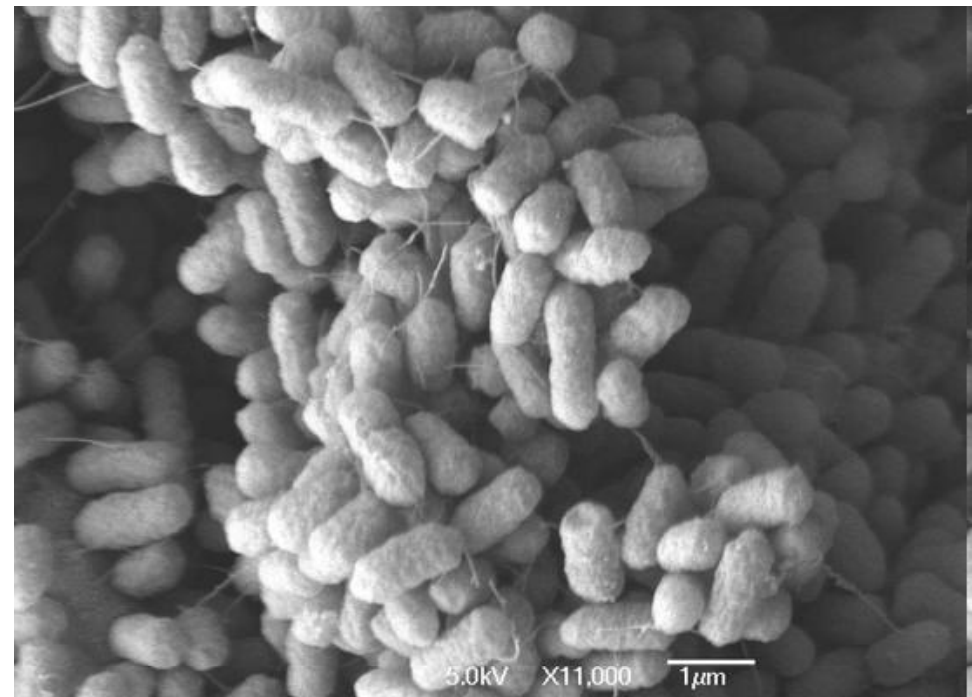
- Οι υποχρεωτικά αερόβιοι χρειάζονται ελεύθερο οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας, δεδομένου πως αυτό αποτελεί τον τελικό δέκτη e^- κατά την **αερόβια αναπνοή** (aerobic respiration).
- Οι περισσότερες μούχλες, ζύμες και τα βακτηριακά γένη: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acetobacter*, *Alteromonas* και *Micrococcus* είναι μερικά παραδείγματα υποχρεωτικά αερόβιων μικροοργανισμών.



Pseudomonas fluorescens

Προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί

- Οι προαιρετικά αναερόβιοι μπορεί να παράγουν ενέργεια μέσω **αερόβιας αναπνοής** αν υπάρχει οξυγόνο, και μέσω **αναερόβιας αναπνοής** (anaerobic respiration) ή **ζύμωσης** (fermentation) αν δεν υπάρχει οξυγόνο.
- Προαιρετικά αναερόβια είναι τα βακτήρια της οικογένειας **Enterobacteriaceae** (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Serratia*, *Proteus* κτλ) καθώς και τα *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*.



Salmonella enterica

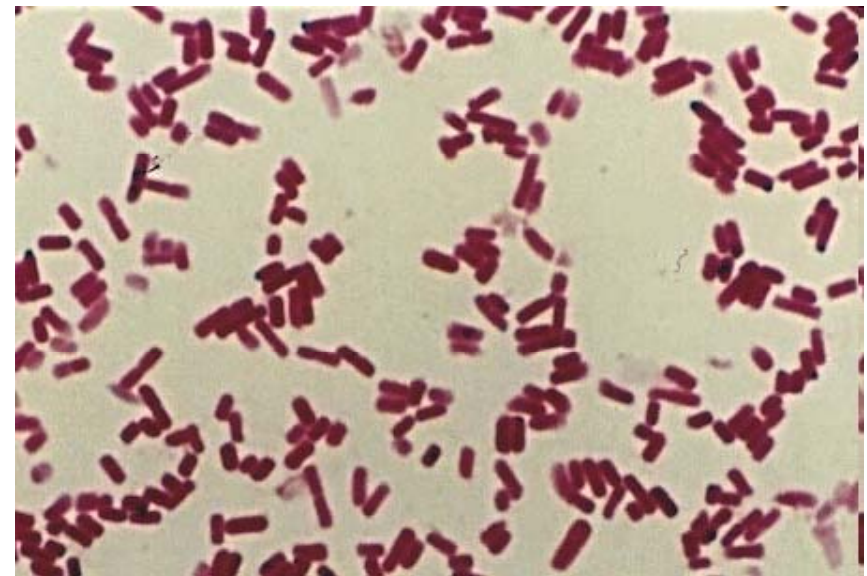
Υποχρεωτικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί

■ Οι υποχρεωτικά αναερόβιοι προμηθεύονται ενέργεια είτε μέσω αναερόβιας αναπνοής, είτε μέσω ζύμωσης.



■ Σ' αυτούς απουσιάζουν τα ένζυμα **υπεροξεική δισμουτάση** και **καταλάση** που καταστρέφουν τα τοξικά υπεροξειδία O_2^- .

■ Τα πιο σημαντικά αναερόβια βακτήρια στα τρόφιμα είναι τα κλωστρίδια (*Clostridium* spp.).



Clostridium perfringens

Μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί

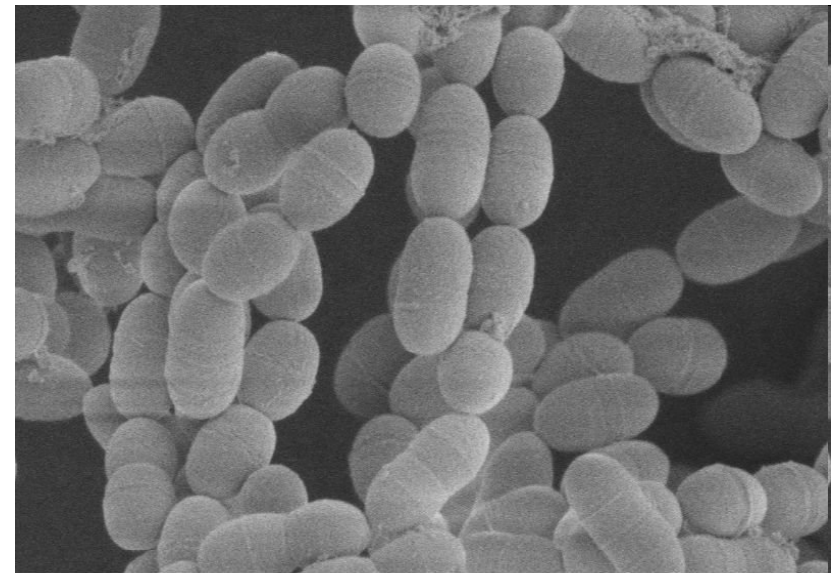
- Οι **μικροαερόφιλοι** προμηθεύονται ενέργεια αποκλειστικά μέσω αερόβιας αναπνοής, αλλά αναπτύσσονται καλύτερα σε περιβάλλοντα με μικρότερη συγκέντρωση οξυγόνου από εκείνη του ατμοσφαιρικού αέρα ($\approx 20\% \text{ O}_2$).
- Παράδειγμα **μικροαερόφιλων** είναι τα *Campylobacter* spp..



Campylobacter jejuni

Αεροανθεκτικοί μικροοργανισμοί

- Οι αεροανθεκτικοί προμηθεύονται ενέργεια μέσω **ζύμωσης** καθώς δεν μπορούν να εκτελέσουν αναπνοή.
- Το οξυγόνο όμως δεν τους βλάπτει.
- Γνωστά αεροανθεκτικά **βακτήρια** με σημασία στα τρόφιμα είναι τα γαλακτικά βακτήρια (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* κτλ.).



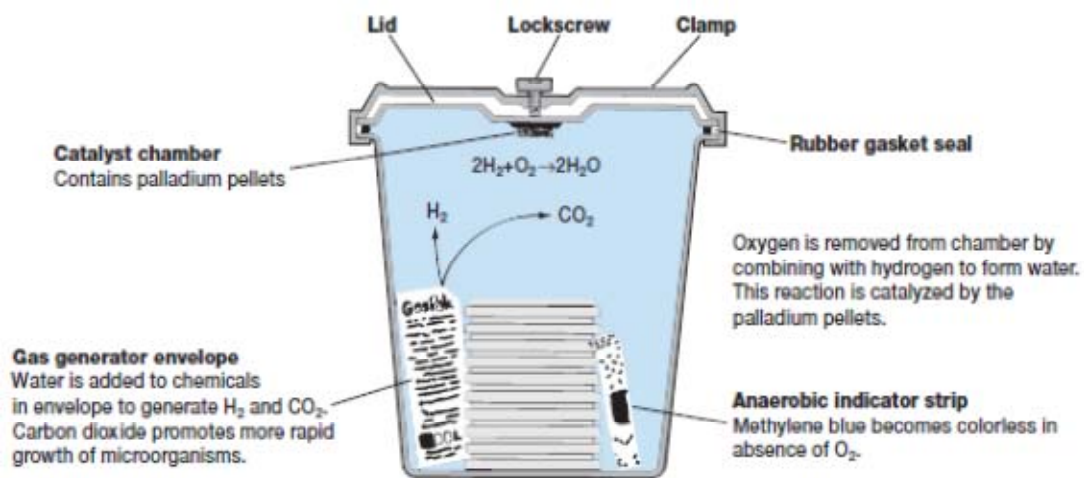
Lactococcus lactis

Σύστημα αναερόβιωσης GasPak (ανοξικό δοχείο)



- Ένας τρόπος καλλιέργειας υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών είναι να τοποθετήσουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες ή/και τα τρυβλία σε ένα **ειδικό δοχείο που κλείνει αεροστεγώς**.

- Ο αέρας του δοχείο αντικαθίσταται μ' ένα μείγμα H_2 και CO_2 .



- Το H_2 παρουσία ενός καταλύτη παλλαδίου αντιδρά με το O_2 που έχει απομείνει σχηματίζοντας H_2O .

- Για την καλλιέργεια των υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών, αντί του ανοξικού δοχείου, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν **ειδικές σακούλες αναεροβίωσης** (GasPak pouches).



καλλιέργεια υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών σε τρυβλία που επωάζονται μέσα σε ειδική σακούλα αναεροβίωσης

Αναερόβιοι θάλαμοι

- Για μερικούς υποχρεωτικά αναερόβιους μικροοργανισμούς (π.χ. μεθανιογόνα αρχαιοβακτήρια), είναι απαραίτητο όχι μόνο να απομακρυνθεί κάθε ίχνος οξυγόνου, αλλά **να διεξαχθούν όλοι οι εργαστηριακοί χειρισμοί σε ανοξική ατμόσφαιρα**, καθώς διατρέχουν κίνδυνο να νεκρωθούν ακόμη και με πολύ σύντομη έκθεση στο O_2 .



- Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται ειδικοί **αναερόβιοι ή ανοξικοί θάλαμοι** (anaerobic chambers), εφοδιασμένοι με γάντια, οι οποίοι επιτρέπουν την εύκολη εκτέλεση χειρισμών σε ανοικτές καλλιέργειες σε τελείως ανοξικό περιβάλλον.

