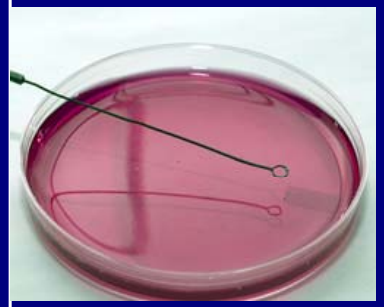
Πανεπιστήμιο Αιγαίου

Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα



ΓΕΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΣΧΟΛΗ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΣ: ΔΡ. ΓΚΙΑΟΥΡΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ

6η θεματική ενότητα:

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης (με φυσικά και χημικά μέσα)

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

ΕΣΠΑ 2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

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.

ανοικτάμαθήματα
opencourses

- 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

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

ΕΣΠΑ 2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- Παρόλο που η **μικροβιακή αύξηση** είναι μια **αυτοπεριοριζόμενη πορεία**, ο **έλεγχος** της:

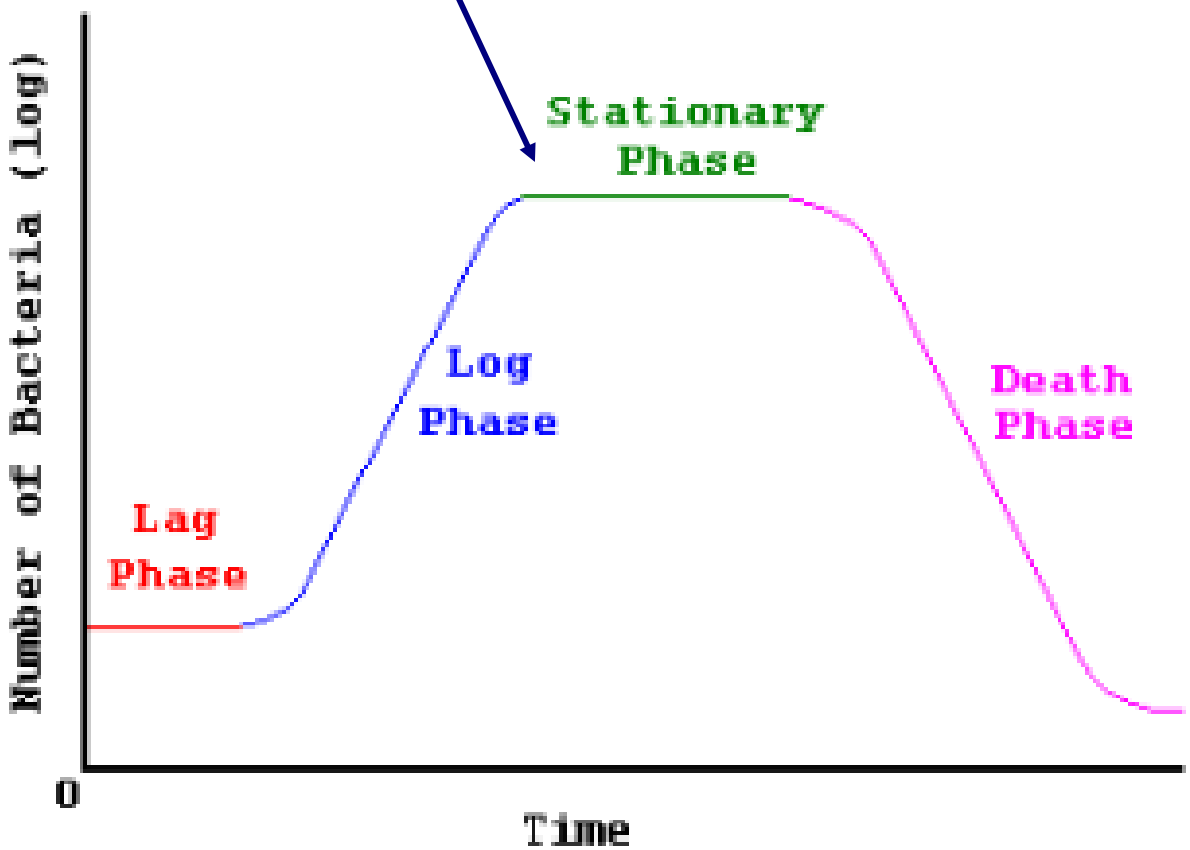
είσοδος στη στάσιμη φάση λόγω εξάντλησης ενός απαραίτητου θρεπτικού υλικού ή / και παραγωγής τοξικών παρα-προϊόντων

- ✓ σε υλικά, όπως τα τρόφιμα

και

- ✓ σε χώρους, όπως τα νοσοκομεία, τις βιομηχανίες τροφίμων κτλ

→ συνιστά μια **απαραίτητη διαδικασία**.



Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης: παρεμπόδιση / αποστείρωση

- **Ο έλεγχος της μικροβιακής αύξησης μπορεί να επιτευχθεί:**

✓ είτε με **παρεμπόδιση** (αναστολή, περιορισμός της αύξησης)

✓ είτε με **αποστείρωση** (πλήρης καταστροφή των μικροοργανισμών)

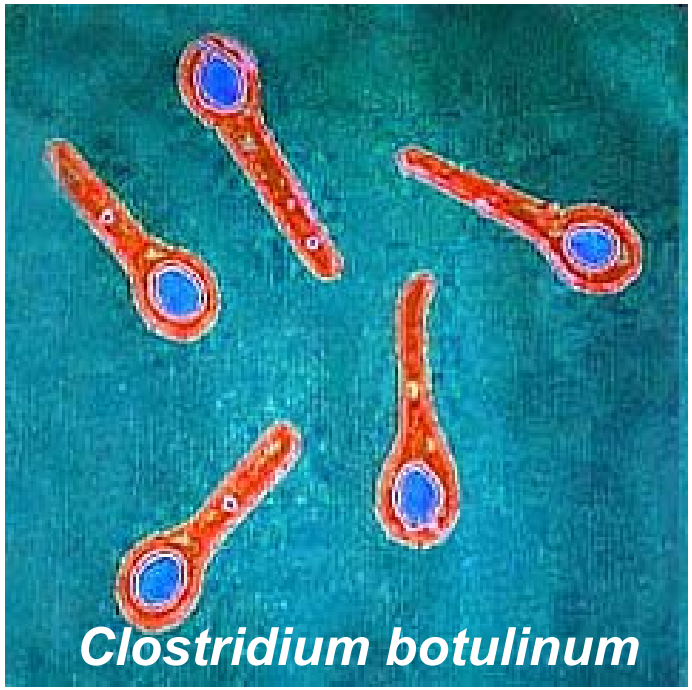
- **Παρεμπόδιση** (inhibition) είναι η **αναστολή** ή ο **περιορισμός της μικροβιακής αύξησης**, που συνήθως οφείλεται σε αλλαγή των φυσικοχημικών συνθηκών του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, pH, παρουσία αντιμικροβιακών κτλ).

- **Αποστείρωση** (sterilization) είναι η **θανάτωση** όλων των μορφών ζωής (βλαστικές μορφές, σπόρια, ιούς).

- Τα (μη όξινα) κονσερβοποιημένα τρόφιμα υποβάλλονται σε θερμική επεξεργασία (**121,1^{o}C για 2,76 λεπτά**) έτσι ώστε να καταστραφούν τα ενδοσπόρια του μεσόφιλου βακτηρίου ***Clostridium botulinum***, το οποίο παράγει μια θανατηφόρο νευροτοξίνη.

εμπορική αποστείρωση

- Τα **ενδοσπόρια διαφόρων θερμόφιλων βακτηρίων θα επιζήσουν**, αλλά η επιβίωσή τους δεν έχει συνήθως καμία πρακτική συνέπεια καθώς αυτά δεν μπορούν να αυξηθούν στις κανονικές θερμοκρασίες αποθήκευσης αυτών των τροφίμων.



Βακτηριοκτόνοι και βακτηριοστατικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες

- Οι παράγοντες που θανατώνουν τα βακτήρια λέγονται **βακτηριοκτόνοι** (bacteriocides).

- Οι παράγοντες εκείνοι που απλώς αναστέλλουν τη βακτηριακή αύξηση (χωρίς να θανατώνουν) λέγονται **βακτηριοστατικοί** (bacteriostatics).

- Μόλις απομακρυνθεί ο βακτηριοστατικός παράγοντας, η αύξηση των βακτηρίων επανέρχεται.

Τρόποι ελέγχου της μικροβιακής αύξησης

- **Ο έλεγχος της μικροβιακής αύξησης (περιορισμός μικροβιακού φορτίου, μέσω παρεμπόδισης ή αποστείρωσης) είναι δυνατόν να γίνει:**

- ✓ είτε με **φυσικά μέσα**
- ✓ είτε με **χημικά μέσα** (→ **αντιμικροβιακούς παράγοντες**)

- **Στους <u>φυσικούς τρόπους ελέγχου</u> της μικροβιακής αύξησης περιλαμβάνονται:**

- ✓ η θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ η διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ η αποξήρανση (αφυδάτωση) (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ η ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ η ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)
- ✓ η υψηλή πίεση

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικά μέσα

- ✓ θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ αποξήρανση (αφυδάτωση → μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)
- ✓ υψηλή υδροστατική πίεση

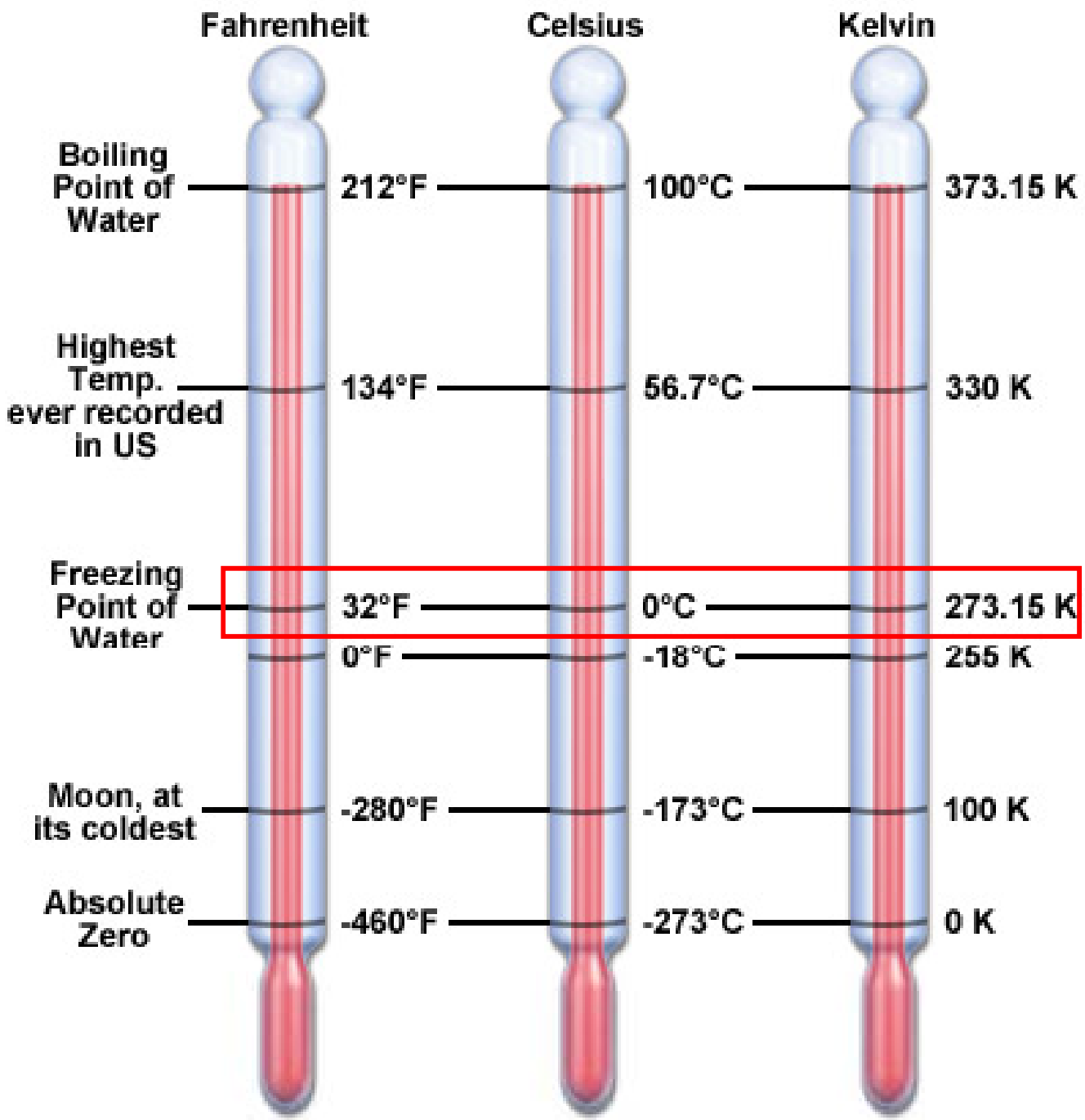
Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικά μέσα

- ✓ θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ αποξήρανση (αφυδάτωση → μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)
- ✓ υψηλή υδροστατική πίεση

- Η θέρμανση είναι η **ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος** για τον περιορισμό της μικροβιακής αύξησης.

- Για κάθε μικροοργανισμό υπάρχει ένα **ανώτατο όριο θερμοκρασίας ανάπτυξης**, ενώ η υπέρβαση αυτού του ορίου επιφέρει σταδιακά τον κυτταρικό θάνατο.

Θερμοκρασιακές κλίμακες



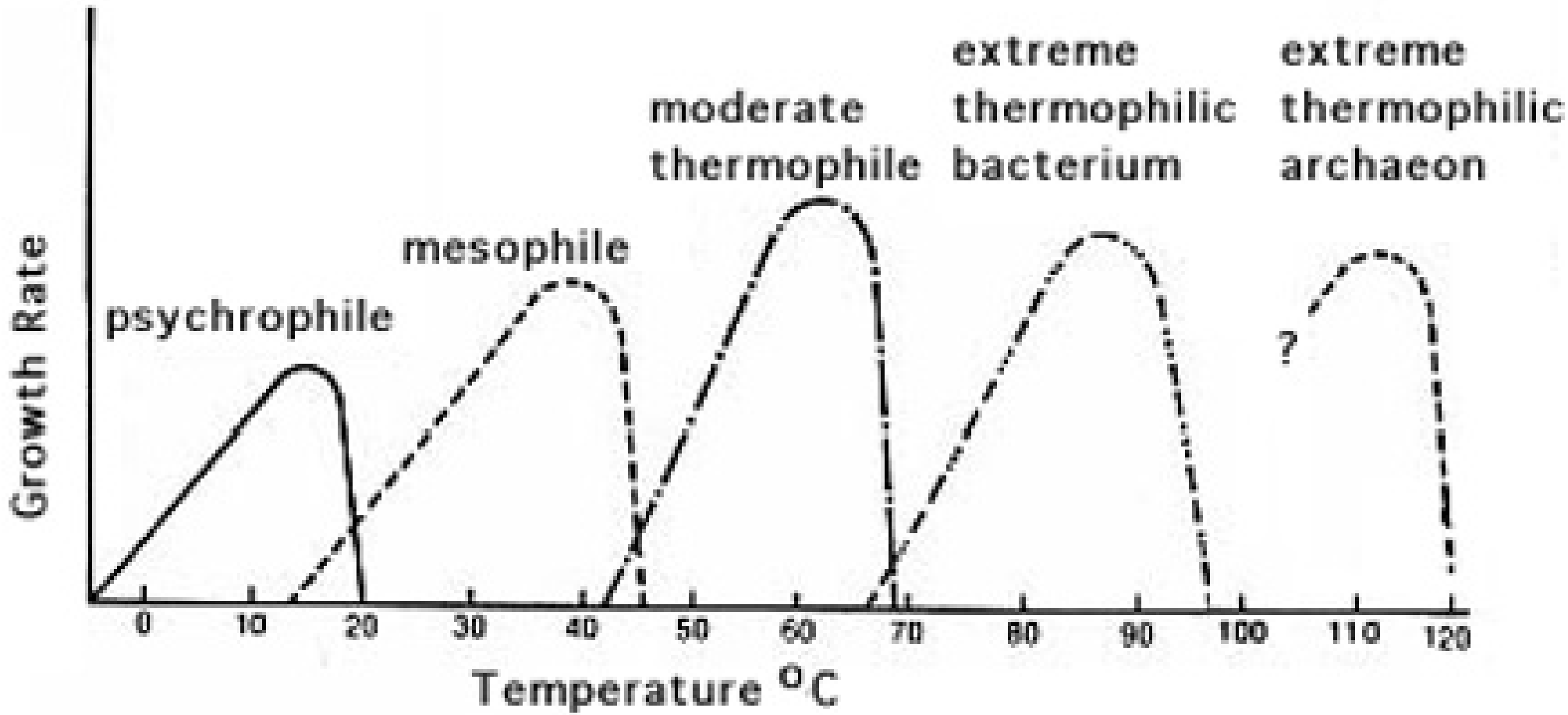
κατηγορίες μικροοργανισμών με βάση τις θεμελιώδεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

(ελάχιστη, άριστη και μέγιστη)

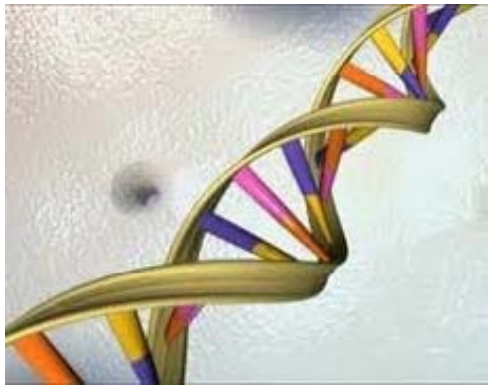
Κατηγορία μικροοργανισμού	Θερμοκρασίες ανάπτυξης (ºC)*		
	ελάχιστη	άριστη	μέγιστη
υπερθερμόφιλοι	65	80-100	120
θερμόφιλοι	45	55 - 65	80
μεσόφιλοι	10	30 - 40	45
ψυχρόφιλοι	-5	10 - 15	20
ψυχρότροφοι	0	20 - 30	40

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

τυπικοί ρυθμοί αύξησης διαφορετικών μικροβιακών ειδών σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία

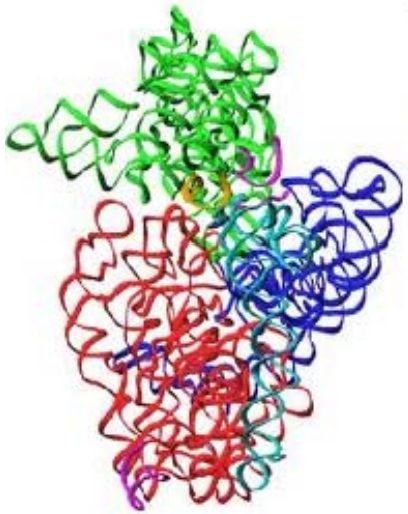


Βλάβες σε κύρια κυτταρικά μακρομόρια εξαιτίας υψηλής θερμοκρασίας



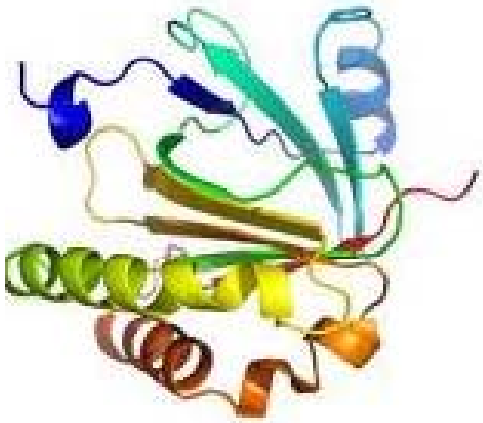
DNA

- Σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, όλα σχεδόν τα μακρομόρια ενός κυττάρου (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) υφίστανται **μετουσίωση** ή **αποδιάταξη** (denaturation).

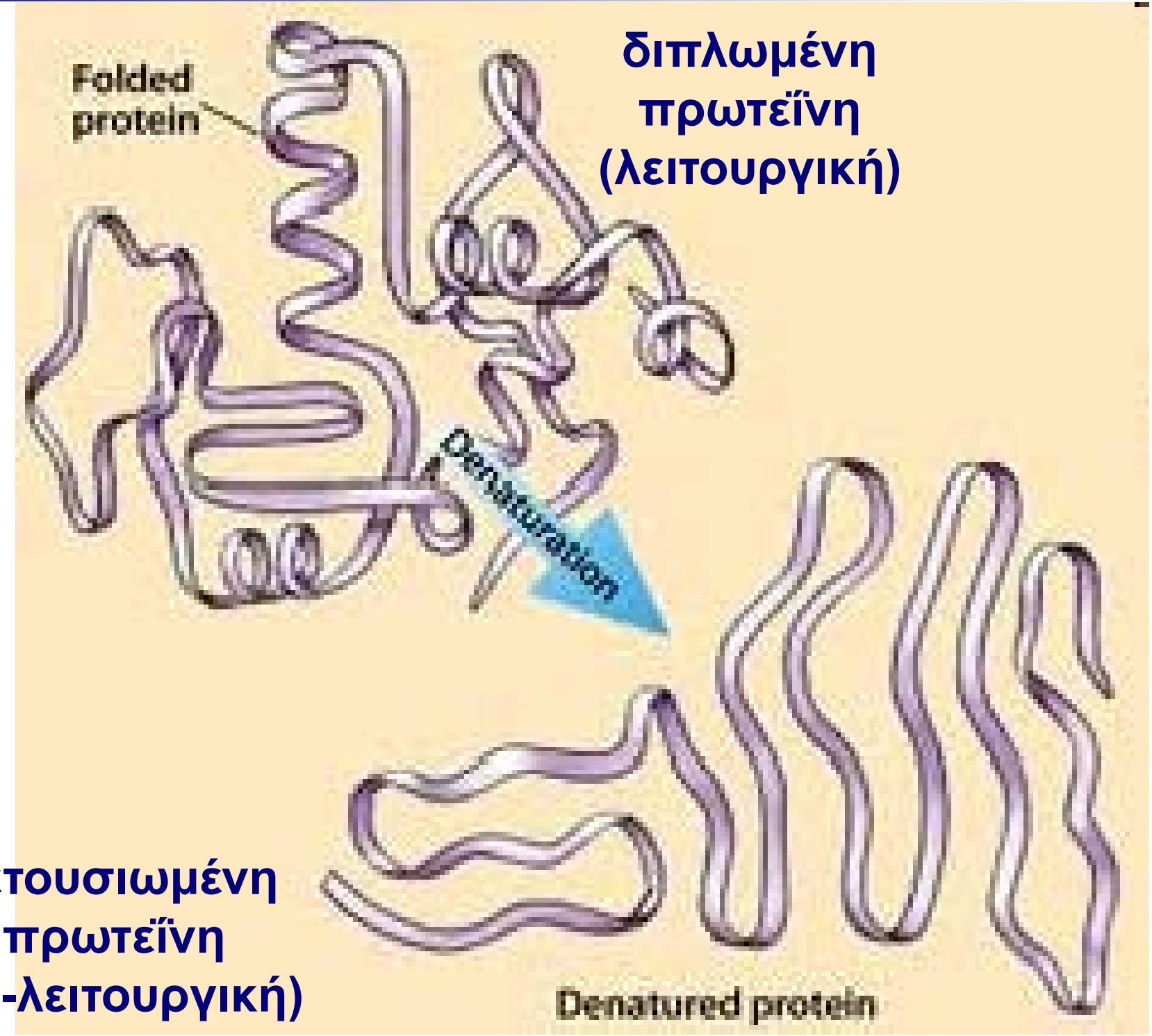


rRNA

- Με τον όρο **μετουσίωση** εννοούμε την αλλαγή της στερεοδομής μιας βιολογικής ένωσης που συνήθως επιφέρει απώλεια των λειτουργικών της ιδιοτήτων.



πρωτεΐνη



διπλωμένη πρωτεΐνη (λειτουργική)

μετουσιωμένη πρωτεΐνη (μη-λειτουργική)

- Ο θάνατος (νέκρωση) των βακτηρίων λόγω θέρμανσης είναι μια διαδικασία που ακολουθεί **εκθετικό ρυθμό**.

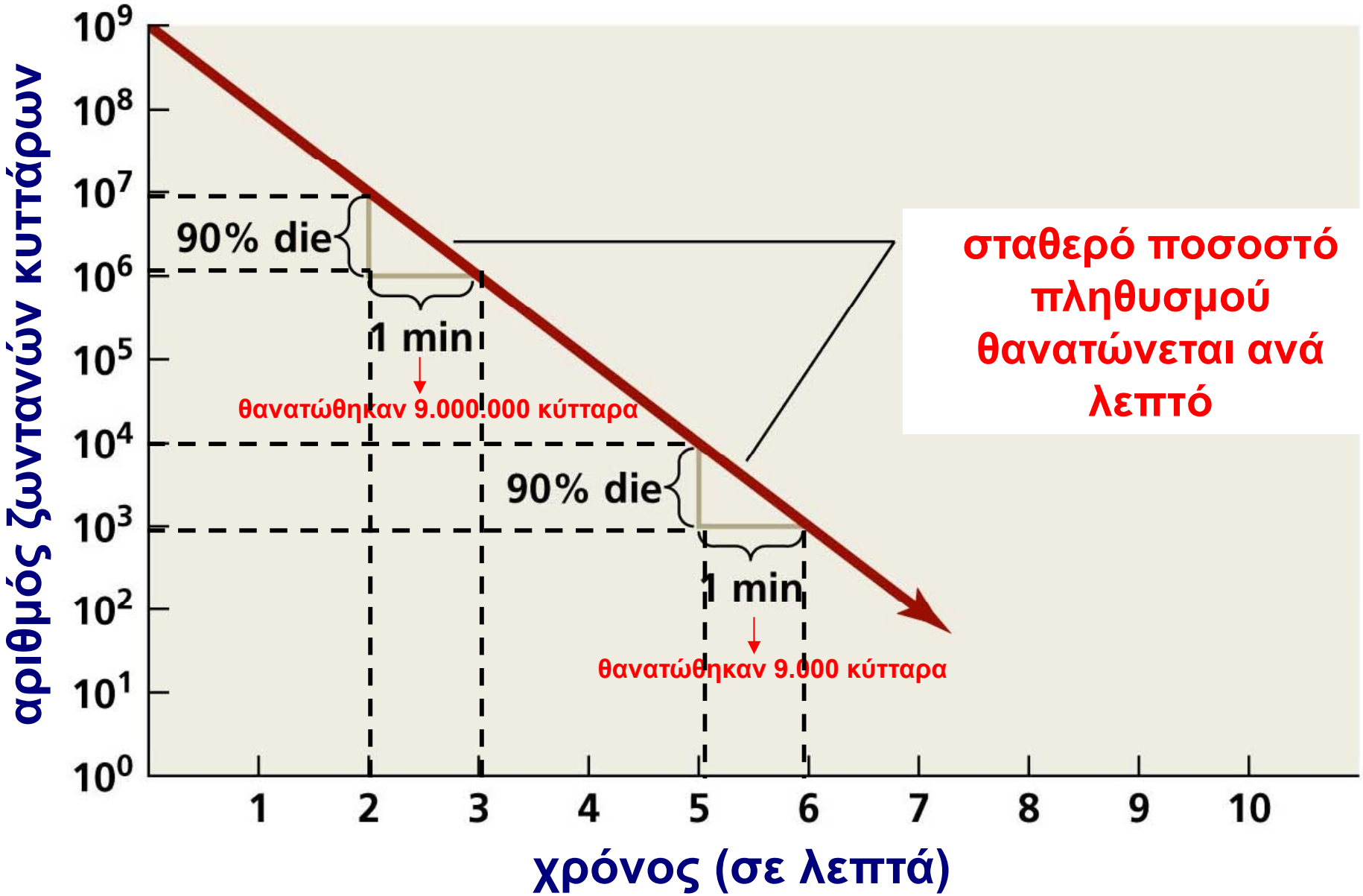
- Επέρχεται ολοένα και ταχύτερα όσο αυξάνεται η θερμοκρασία.

- **Ισχύουν:**

- ✓ Ο **ρυθμός θανάτωσης** (μείωση αριθμού βιώσιμων κυττάρων ανά μονάδα χρόνου) σε οιαδήποτε χρονική στιγμή είναι ανάλογος της συγκέντρωσης των κυττάρων στη δεδομένη χρονική στιγμή.

- ✓ **Ο χρόνος που απαιτείται για να θανατωθεί ένα συγκεκριμένο ποσοστό των κύττάρων (π.χ. 70%) σε μια ορισμένη θερμοκρασία είναι ανεξάρτητος από την αρχική συγκέντρωση τους.**

- **Για ένα δεδομένο μικροβιακό πληθυσμό (π.χ. *Escherichia coli*), μια συγκεκριμένη θερμική επεξεργασία (π.χ. 75ºC για 1 λεπτό) θανατώνει το ίδιο ποσοστό κυττάρων, <u>ανεξάρτητα από τον αρχικό αριθμό κυττάρων που υπάρχουν</u>.**



- **Η εκθετική θανάτωση των βακτηρίων λόγω θέρμανσης εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:**

$$N = N_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

<u>όπου:</u>

- ✓ *N* είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μετά από χρόνο θέρμανσης *t*
- ✓ N_0 είναι αρχικός αριθμός των ζωντανών κυττάρων
- ✓ *k* είναι η **σταθερά του ρυθμού καταστροφής** (χρόνος^{-1}) σε μια δεδομένη θερμοκρασία

- Επομένως, εάν τα N_0, ***k*** και ***t*** είναι γνωστά, το ***N*** μπορεί να υπολογιστεί.
- Ομοίως, αν τα N_0 και ***k*** είναι γνωστά μπορεί να προσδιοριστεί ο απαιτούμενος χρόνος ***t*** για τη μείωση ενός πληθυσμού σε ***N*** βακτήρια.

Χρόνος δεκαδικής μείωσης (τιμή D)

- Η τιμή D (**decimal reduction time**) είναι ο χρόνος σε λεπτά κατά τη διάρκεια του οποίου ο αριθμός ενός καθορισμένου μικροβιακού πληθυσμού που εκτίθεται σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία **μειώνεται κατά 90%** ή **κατά 1 λογάριθμο** (log).

➢ **Εκφράζεται σαν D_T=t λεπτά, όπου:**

✓ **T** είναι η θερμοκρασία (^oC) και
✓ **t** είναι ο χρόνος (σε λεπτά) για να επιτευχθεί μείωση 1 log για το συγκεκριμένο μικροβιακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε.

- Επομένως, είναι ένα **μέτρο της ευαισθησίας των μικροοργανισμών στη θέρμανση** (heat sensitivity) και **ποικίλλει ανάλογα με το**:

✓ μικροβιακό είδος (στέλεχος),
✓ τη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται
✓ τις υπόλοιπες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. σύσταση και δομή υλικού εναιώρησης, pH, ενεργότητα ύδατος, φάση ανάπτυξης μικροοργανισμών).

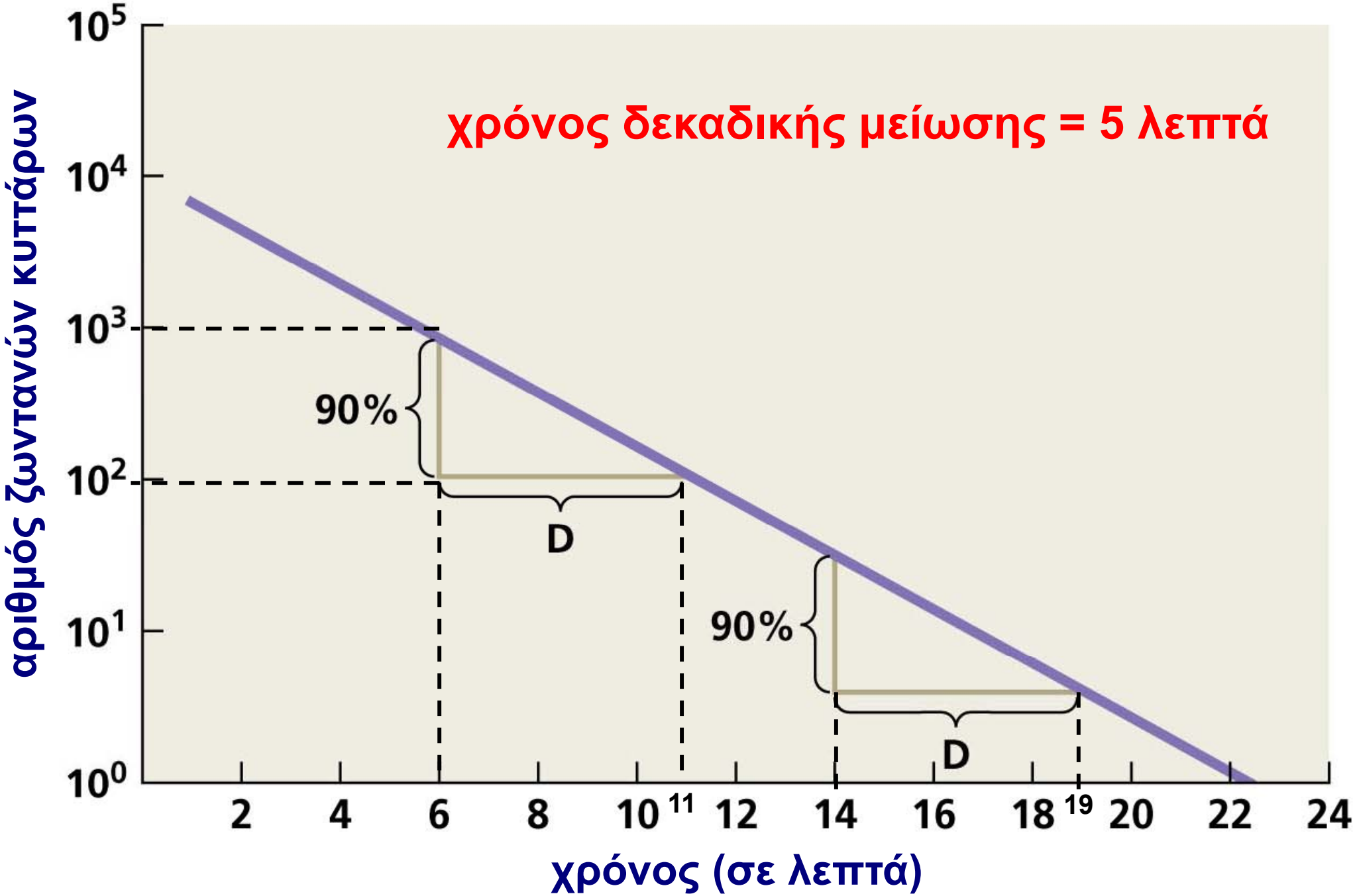
- **Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας την παρακάτω μαθηματική σχέση:**

$$D_T = \frac{t}{\log_{10}x - \log_{10}y}$$

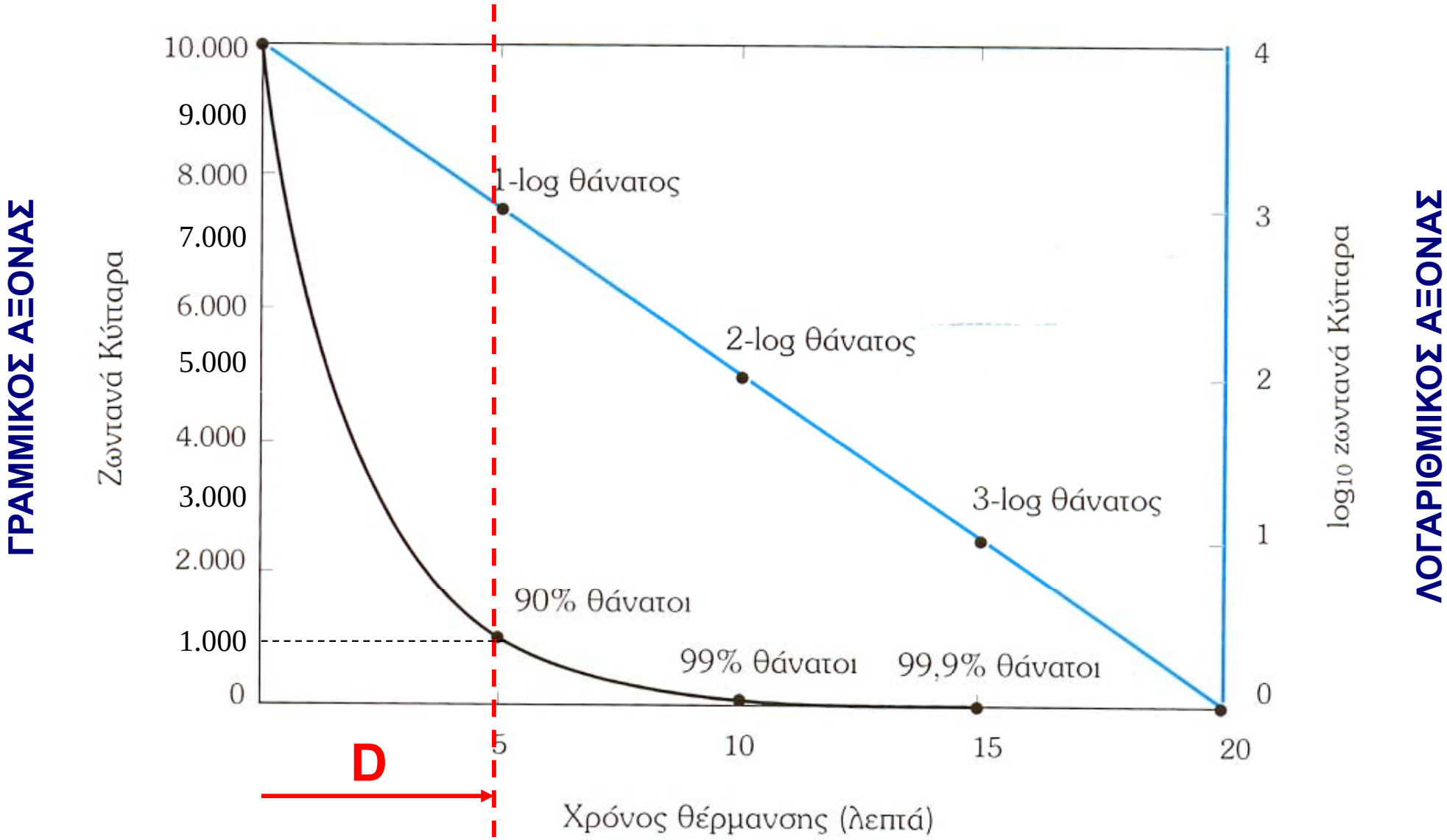
- Όπου ***x*** και ***y*** αντιπροσωπεύουν, αντίστοιχα, τον αριθμό των κυττάρων πριν και μετά την έκθεση σε θερμοκρασία ***T*** για ***t*** λεπτά (χρόνος για να επιτευχθεί μείωση 1 log).

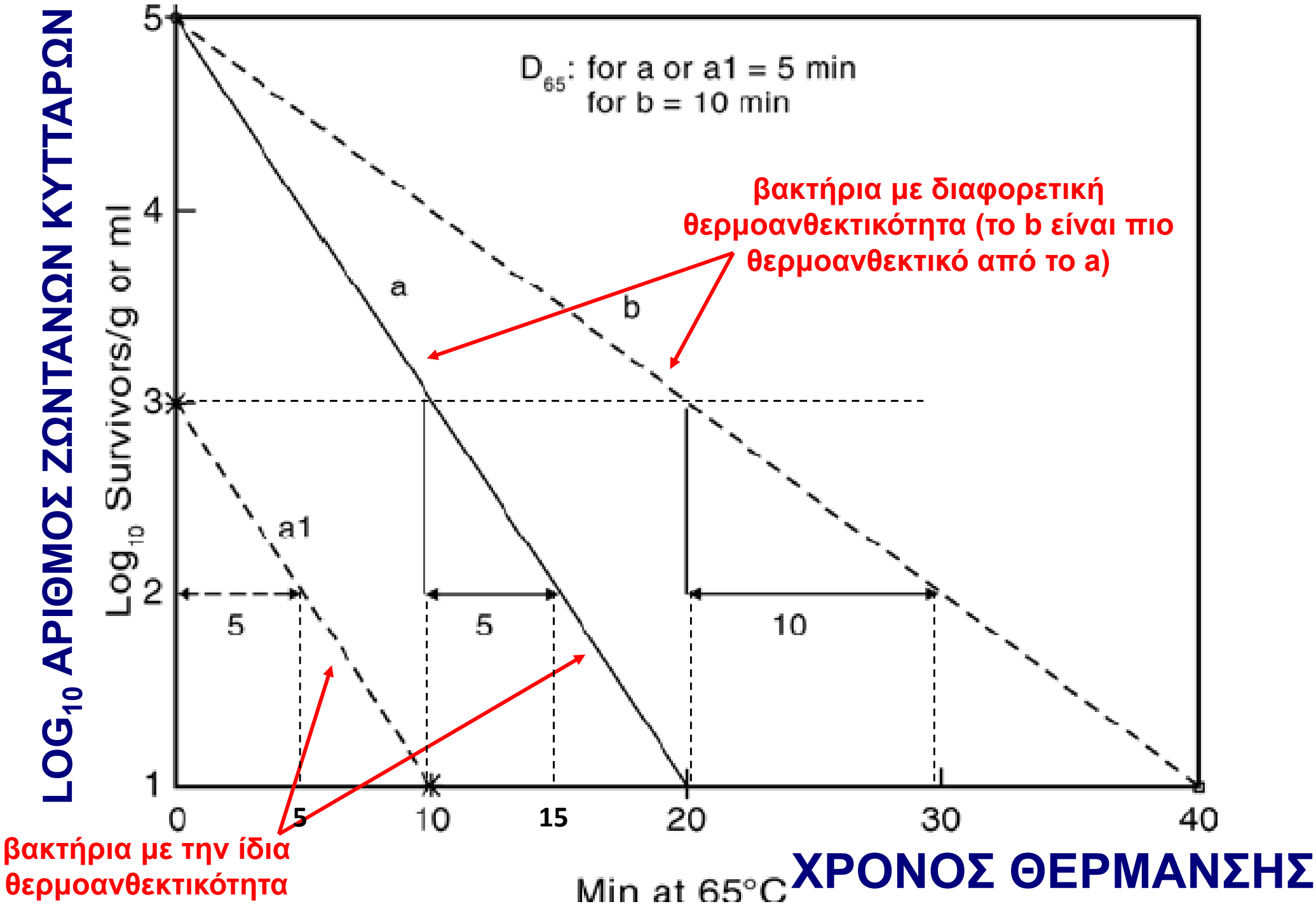
- Μπορεί επίσης να προσδιοριστεί καταγράφοντας (by plotting) τον **αριθμό των $\log_{10}$ επιζώντων κυττάρων** συναρτήσει του **χρόνου έκθεσης** (exposure time, σε λεπτά) για μια συγκεκριμένη θερμοκρασία.

- Ιδανικά, αυτό είναι ένα **γράφημα ευθείας γραμμής** και για συγκεκριμένο μικροοργανισμό στόχο και δεδομένες περιβαλλοντικές συνθήκες, αυτό είναι **ανεξάρτητο από τον αρχικό αριθμό των κυττάρων ενός μικροβιακού πληθυσμού**.


χρόνος δεκαδικής μείωσης = 5 λεπτά
αριθμός ζωντανών κυττάρων
χρόνος (σε λεπτά)
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
90%
D
90%
D
2
4
6
8
10
11
12
14
16
18
19
20
22
24

Διαγράμματα (γραμμικό και λογαριθμικό) θανάτωσης βακτηριακού πληθυσμού που θερμαίνεται σε μια σταθερή θερμοκρασία




LOG10 ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΝΤΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
Log10 Survivors/g or ml
D65: for a or a1 = 5 min
for b = 10 min
βακτήρια με διαφορετική θερμοανθεκτικότητα (το b είναι πιο θερμοανθεκτικό από το a)
a
b
a1
5
5
10
βακτήρια με την ίδια θερμοανθεκτικότητα
Min at 65°C
ΧΡΟΝΟΣ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ

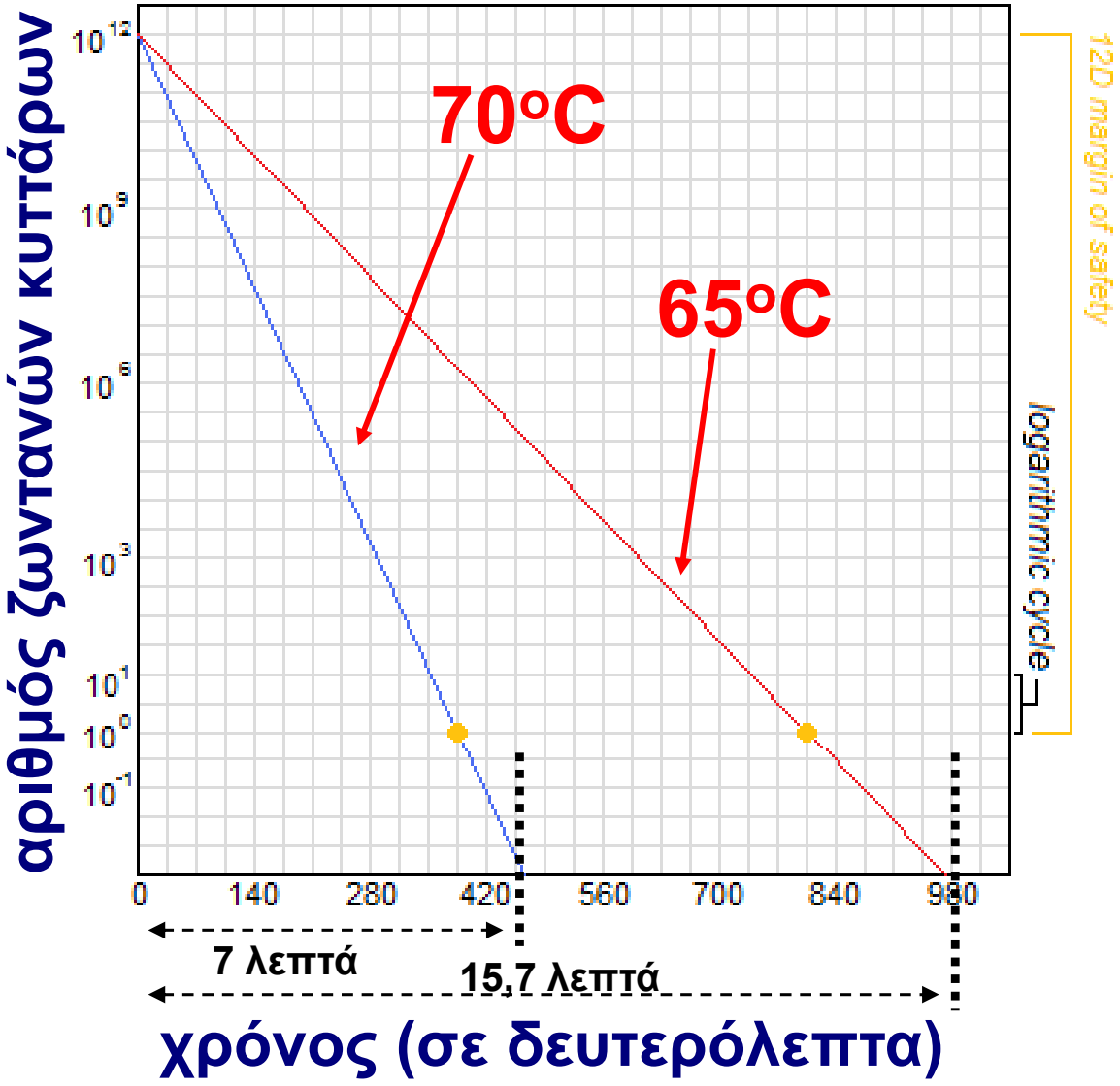
- Είναι προφανές από την προηγούμενη γραφική παράσταση πως:

<u>για να επιτευχθεί ένας επιθυμητός μικροβιακός πληθυσμός μετά από κάποια θερμική μεταχείριση</u>, χρειάζεται λιγότερο χρόνο (λιγότερα D) για κάποιον χαμηλό αρχικό πληθυσμό, σε σχέση με κάποιον υψηλότερο αρχικό πληθυσμό, σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία (π.χ. 65°C).

- Η γραφική αυτή παράσταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον **προσδιορισμό της ευαισθησίας στη θέρμανση** δύο ή περισσότερων μικροβιακών ειδών ή στελεχών.

Χρόνος θερμικού θανάτου

- Ο **χρόνος θερμικού θανάτου** (**thermal death time**, TDT) είναι ο χρόνος που είναι απαραίτητος για να **θανατωθεί ολοκληρωτικά** ένας συγκεκριμένος πληθυσμός μικροβιακών κυττάρων **σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία**.

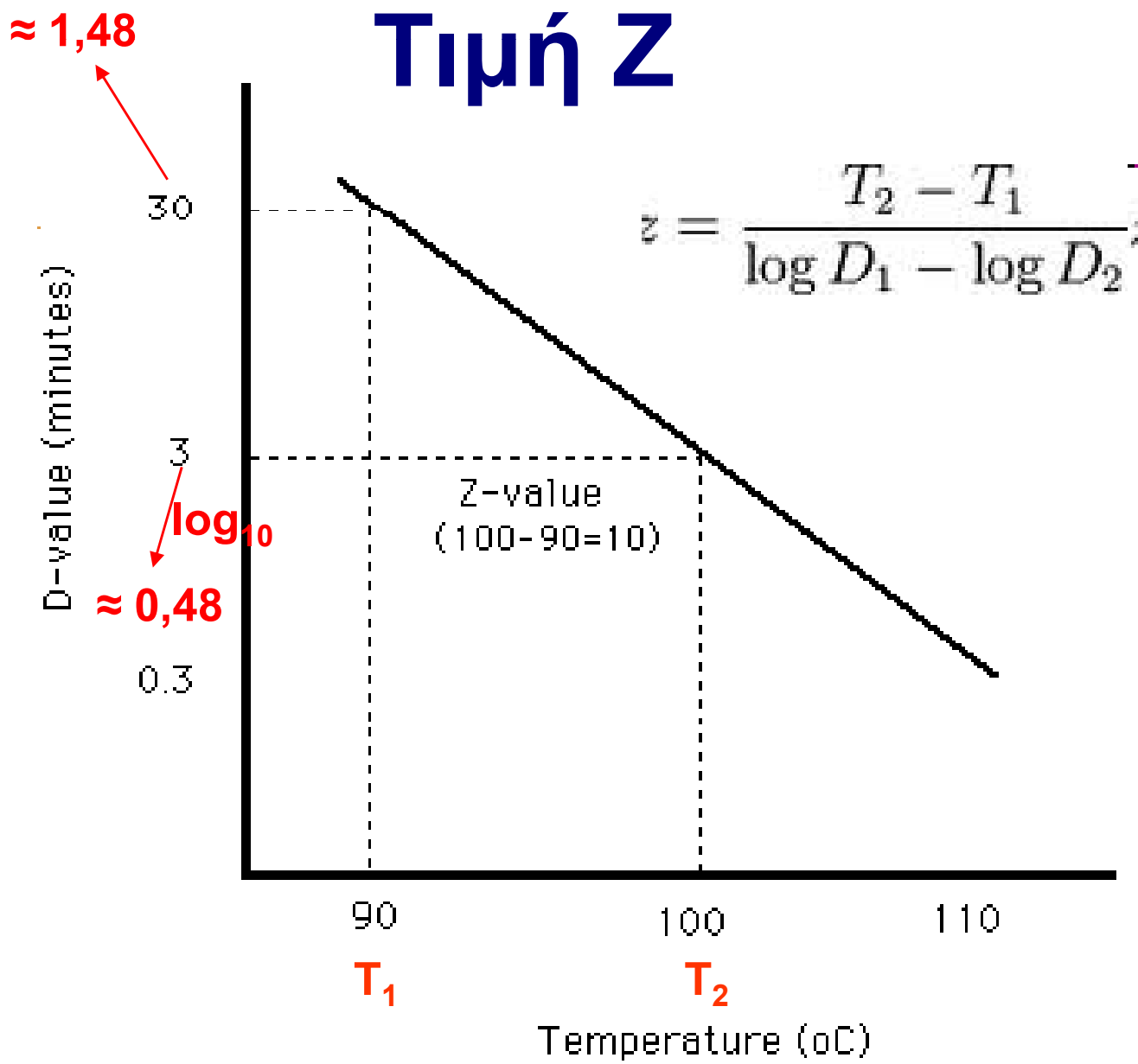


- **Δείχνει τη σχετική ευαισθησία ενός μικροοργανισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες.**

Τιμή Z

- Για κάποιον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, μια ευθεία γραμμή μπορεί να κατασκευαστεί καταγράφοντας (σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα) τις τιμές D συναρτήσει της θερμοκρασίας.

- Η κλίση αυτής της καμπύλης εκφράζει την τιμή Z, που δείχνει **τη θερμοκρασία (ºC) που απαιτείται για να αλλάξει η τιμή D κατά 1 λογάριθμο**.



✓ **Για παράδειγμα όταν έχουμε τιμή Z = 10ºC αυτό σημαίνει πως αν η τιμή D των βακτηριακών σπόρων στους 100ºC είναι 50 λεπτά, στους 110ºC θα είναι 5 λεπτά και στους 120ºC θα είναι 0,5 λεπτά.**

Αποστείρωση

- Ως **αποστείρωση** (sterilization) ενός αντικειμένου ορίζεται η διαδικασία η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τον αποκλεισμό απ' αυτό (**θανάτωση**) **όλων των μορφών ζωής**, συμπεριλαμβανομένων και των πιο θερμοανθεκτικών σπορίων των βακτηρίων.

✓ **Κατά την αποστείρωση δεν καταστρέφονται πάντοτε όλα τα ένζυμα ή άλλα προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού (π.χ. τοξίνες).**

- Για τις συνήθεις περιπτώσεις αποστείρωσης χρησιμοποιείται το **αυτόκαυστο** (autoclave).

- Στο αυτόκαυστο έχουμε θέρμανση των αντικειμένων (π.χ. θρεπτικών ζωμών) **μέσω υδρατμών υπό πίεση** (1,1 kg/cm^2 ή 1,1 Atm ή 15 lb/in^2), κάτι που επιτυγχάνει θερμοκρασία **121°C**

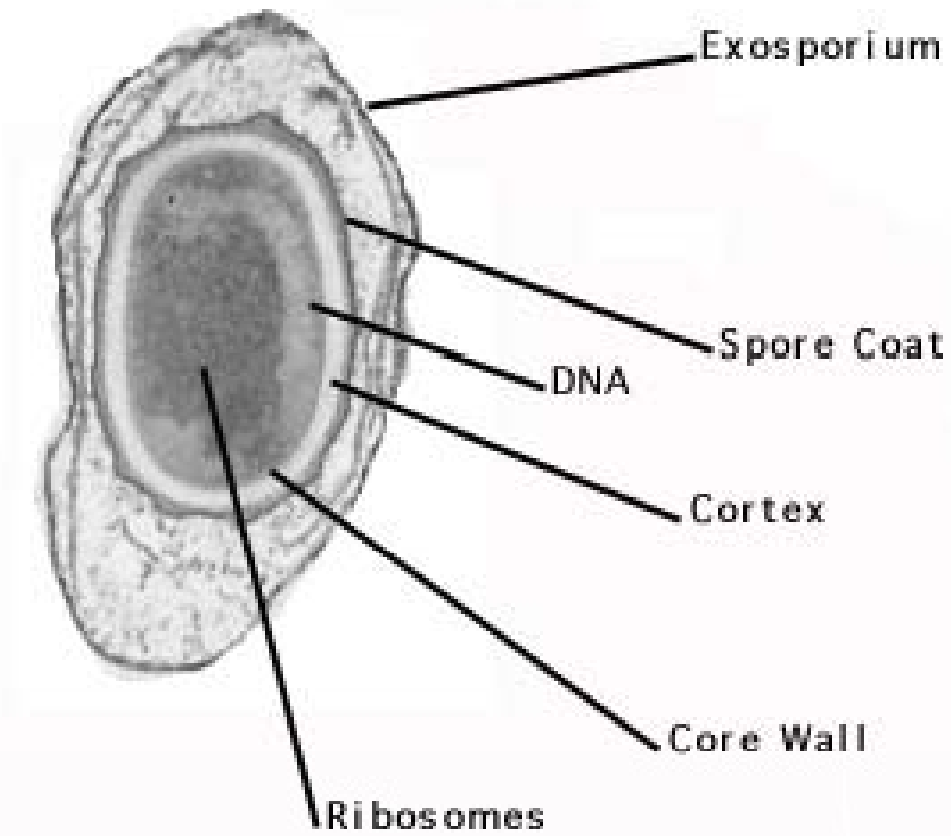
Θερμοανθεκτικότητα ενδοσπορίων

- Για να είναι αποτελεσματική μια διαδικασία αποστείρωσης πρέπει να εξασφαλίζεται η **θανάτωση των ενδοσπορίων** (τα οποία είναι ικανά να επιβιώνουν σε θερμοκρασίες που θα θανάτωναν γρήγορα τα βλαστικά κύτταρα του ίδιου μικροοργανισμού).

➢ **Η αυξημένη θερμοανθεκτικότητα των ενδοσπορίων οφείλεται:**

✓ στην **μειωμένη υδατοπεριεκτικότητα** τους (10-30% του βλαστικού κυττάρου) και

✓ στις μικρές **οξεοδιαλυτές σποριοπρωτεΐνες** (SASP).



Ξηρή και υγρή θέρμανση

κλίβανος ξηρής αποστείρωσης
(170°C για 2 ώρες)

- Η ξηρή θέρμανση είναι λιγότερο καταστροφική σε σχέση με την υγρή θέρμανση και θανατώνει τους μικροοργανισμούς μέσω **αφυδάτωσης** και **οξείδωσης**.

κλίβανος υγρής αποστείρωσης
(121°C για 15 λεπτά)

- **Επομένως, η <u>ξηρή θέρμανση</u> χρειάζεται υψηλότερες θερμοκρασίες και μεγαλύτερους χρόνους για να προκαλέσει την ίδια καταστροφή σε σχέση με την <u>υγρή θέρμανση</u>.**

Χαμηλή θερμική επεξεργασία ή παστερίωση

- Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για τη χαμηλή θερμική επεξεργασία (ή την παστερίωση) είναι **μικρότερη των 100ºC**.

- Ο **σκοπός της παστερίωσης** είναι **να θανατωθούν όλα τα βλαστικά κύτταρα των παθογόνων** και ένας μεγάλος αριθμός των υπολοίπων μικροοργανισμών (ζύμες, μούχλες, βακτήρια), πολλοί εκ των οποίων μπορούν να προκαλέσουν **αλλοίωση ενός τροφίμου**.

- **Η παστερίωση δεν ταυτίζεται με την αποστείρωση καθώς δεν θανατώνει το σύνολο των ζωντανών μικροοργανισμών και ενδοσπορίων.**

- Σε μερικά τρόφιμα, η παστερίωση επίσης αδρανοποιεί μερικά **φυσικά ενδογενή ένζυμα** (π.χ. φωσφατάση στο γάλα).

Παστερίωση του γάλακτος

- Η παστερίωση του γάλακτος χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια.

- Δύο μέθοδοι παστερίωσης, η θέρμανση:

χαμηλής θερμοκρασίας μακρύ χρόνου
(low temparature long time, **LTLT**)

- ✓ **στους 66ºC για 30 λεπτά**

ή

- ✓ **στους 72ºC για 15 δευτερόλεπτα**

υψηλής θερμοκρασίας σύντομου χρόνου
(high temperature short time, **HTST**)

χρησιμοποιούνται για να θανατώσουν το πιο θερμοανθεκτικό παθογόνο που προκαλεί τον πυρετό Q, το βακτήριο ***Coxiella burnetii***.

- Αμέσως μετά την παστερίωση **το γάλα ψύχεται στους 4ºC**, συσκευάζεται και διατηρείται σ' αυτή τη θερμοκρασία μέχρι να καταναλωθεί.

- Κατά κανόνα η παστερίωση του γάλακτος επιτυγχάνεται μέσω της διοχέτευσης αυτού από έναν **εναλλάκτη θερμότητας** (heat exchanger).

μονάδα παστερίωσης γάλακτος σε σύγχρονη γαλακτοκομική μονάδα

Επεξεργασία υπερυψηλής θερμοκρασίας (ultrahigh temperature processing, UHT)

- Εναλλακτικά, το γάλα μπορεί να υποστεί εντονότερη θερμική επεξεργασία (**εμπορική αποστείρωση**) ούτως ώστε να μην απαιτείται η συντήρηση του στο ψυγείο.

- **Αυτό επιτυγχάνεται μέσω θέρμανσης <u>στους 140ºC για 1-3 δευτερόλεπτα</u>.**

- Το **UHT γάλα δεν αλλοιώνεται σε θερμοκρασία δωματίου**, αλλά μπορεί να αλλοιωθεί αν εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία (**>40ºC**), γιατί **βλαστάνουν τα σπόρια των θερμόφιλων βακτηρίων**.

Χαμηλή θερμοκρασία (ψύξη, κατάψυξη)

- Σε αντίθεση με τη θέρμανση, η **ψύξη** (refrigeration) έχει μόνο **μικροβιοστατική επίδραση** (η μεταβολική δραστηριότητα μειώνεται και τα **κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται**).

➢ Υπάρχουν όμως και μικροοργανισμοί που συνεχίζουν να αναπτύσσονται ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (0ºC):

✓ **ψυχρόφιλοι**

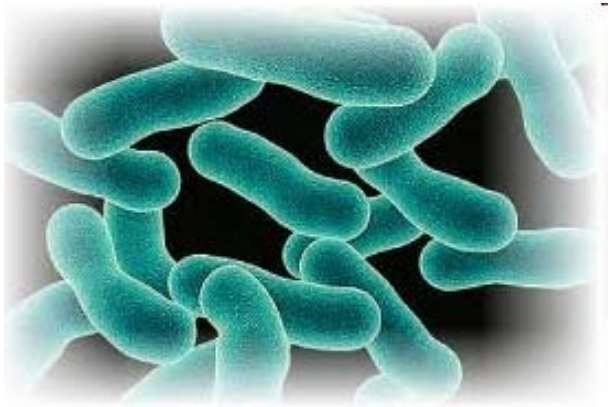
✓ **ψυχρότροφοι (ψυχροανεκτικοί**)

- Η αποθήκευση υπό χαμηλή θερμοκρασία, ιδιαιτέρως η **κατάψυξη** και η επακόλουθη **απόψυξη** (thawing) μπορεί να είναι επίσης θανατηφόρα (lethal) για τα μικροβιακά κύτταρα.

Μηχανισμός αδρανοποίησης μικροοργανισμών λόγω ψύξης

- Οι **μεταβολικές δραστηριότητες** (ενζυμικές αντιδράσεις) και οι **ρυθμοί ανάπτυξης** των μικροοργανισμών είναι μέγιστοι στην **άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης** (optimum growth temperature).

- **Καθώς η θερμοκρασία μειώνεται (ξεκινώντας από τη βέλτιστη), οι μικροβιακές δραστηριότητες που συνδέονται με την ανάπτυξη επιβραδύνονται.**



- **Συνήθως, ο χρόνος γενεάς, μέσα σε κάποιο εύρος, διπλασιάζεται για κάθε μείωση της θερμοκρασίας κατά 10°C.**

- Έτσι, ένα είδος που διαιρείται κάθε **60 λεπτά** σε κάποιο τρόφιμο στους **22°C**, θα χρειαστεί **120 λεπτά** για να διαιρεθεί αν η θερμοκρασία μειωθεί στους **12°C**.

- Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ο χρόνος γενεάς μπορεί να είναι ακόμα μεγαλύτερος από το διπλάσιο.

- Για παράδειγμα, αν η θερμοκρασία μειωθεί από τους 12°C στους **2°C** και το είδος μπορεί να αναπτύσσεται στους 2°C, ο χρόνος γενεάς για το είδος μπορεί να γίνει μεγαλύτερος από **240 λεπτά**.

Κρυοπροστατευτικές ουσίες

- Τα κύτταρα σχεδόν όλων των μικροοργανισμών είναι δυνατόν να διατηρηθούν στην κατάψυξη (-80°C) για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

- Σ' αυτές τις παγωμένες καλλιέργειες μικροοργανισμών **προσθέτουμε κρυοπροστατευτικές ουσίες** (cryoprotectants) (σε τελική συγκέντρωση ≈ 15%) για την προστασία των κυττάρων.

- Οι κρυοπροστατευτικές ουσίες στο θρεπτικό μέσο, διεισδύουν μέσα στα κύτταρα και τα **προστατεύουν από το σχηματισμό παγοκρυστάλλων**.

✓ Παραδείγματα τέτοιων ουσιών αποτελούν η **γλυκερόλη** και το **διμεθυλοσουλφοξείδιο** (dimethyl sulfoxide, DMSO)

κρυοφιαλίδια (cryovials) για τη συντήρηση των κυττάρων στους -80°C

■ Η **κατάψυξη** (freezing, στους -80ºC ή -196ºC) χρησιμοποιείται συχνά για τη **διατήρηση των μικροβιακών καλλιεργειών**.

THE PRESERVATION OF BACTERIA BY FREEZING IN GLYCEROL BROTH[1, 2]

DEXTER H. HOWARD

Department of Infectious Diseases, School of Medicine, University of Californi a, Los Angeles 24, California

Received for publication December 30, 1955

Hollander and Nell (Applied Microbiol., **2**, 164, 1954) reported that the presence of 15 per cent glycerol protected *Escherichia coli*, *Diplococcus pneumoniae*, and *Treponema pallidum* from the damage of freezing and thawing. Furthermore, *T. pallidum* could be preserved in 15 per cent glycerol at −70 C for 2 months without any detectable loss of virulence. On the basis of their findings, these authors suggest that dilute glycerol solutions might be employed in the preservation of other fragile biological materials. The present report indicates the potential usefulness of this technique for the preservation of a variety of microorganisms.

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικά μέσα

- ✓ θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ αποξήρανση (αφυδάτωση → μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)
- ✓ υψηλή υδροστατική πίεση

- Η διήθηση είναι μια **διαδιακασία διέλευσης υγρού ή αέριου δείγματος διαμέσου ενός φίλτρου (ηθμού)**, το οποίο έχει πόρους τόσο μικρούς ώστε να εμποδίζεται η διέλευση των μικροοργανισμών μέσω αυτού.

- Συνήθως για την **κατακράτηση βακτηρίων** χρησιμοποιούνται φίλτρα διαμέτρου πόρων (οπών) **0,22 – 0,45 *μ*m**.

➢ **Τα φίλτρα είναι συνήθως κατασκευασμένα από μεμβράνες:**

✓ κυτταρίνης (cellulose) ή
✓ πολυανθρακικού (polycarbonate, πολυκαρβονικά).

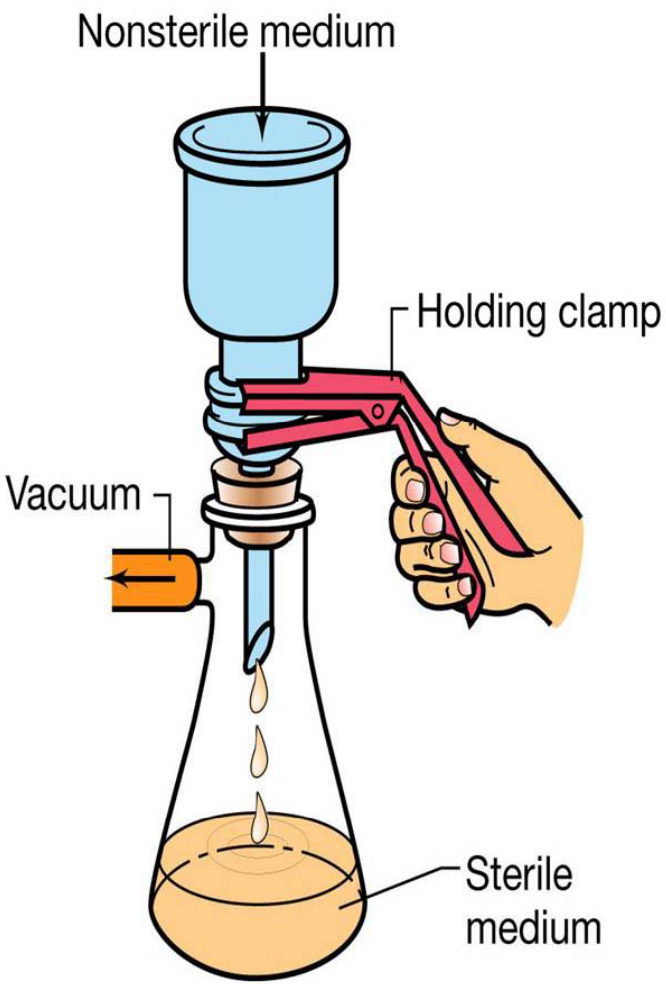
- Η μέθοδος της διήθησης χρησιμοποιείται για υγρά υλικά τα οποία είναι ευαίσθητα στη θερμότητα.

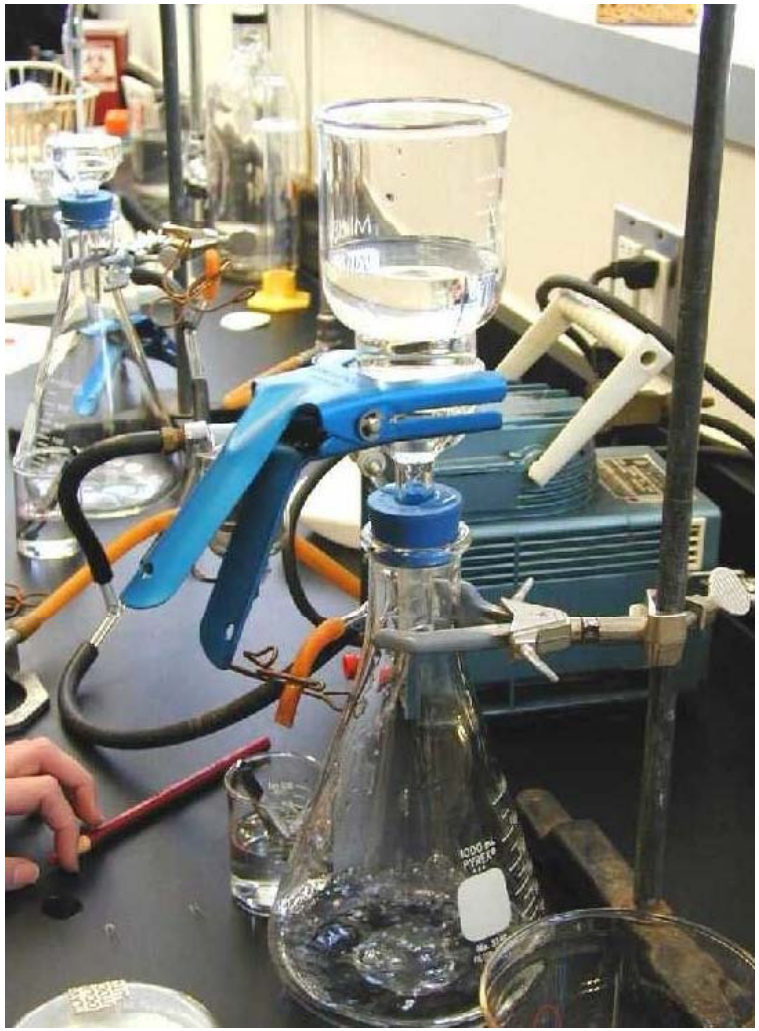
✓ π.χ. ορισμένα θρεπτικά υλικά, διάφορα ένζυμα, αντιβιοτικά κτλ

- Ένας μεγάλος αριθμός συσκευών (τύποι ηθμών) είναι διαθέσιμος στο εμπόριο για την αποστείρωση υγρών διαλυμάτων διαφόρων όγκων.

φίλτρο κυτταρίνης (συνήθως διάμετρος πόρων: 0,22 *μ*m)

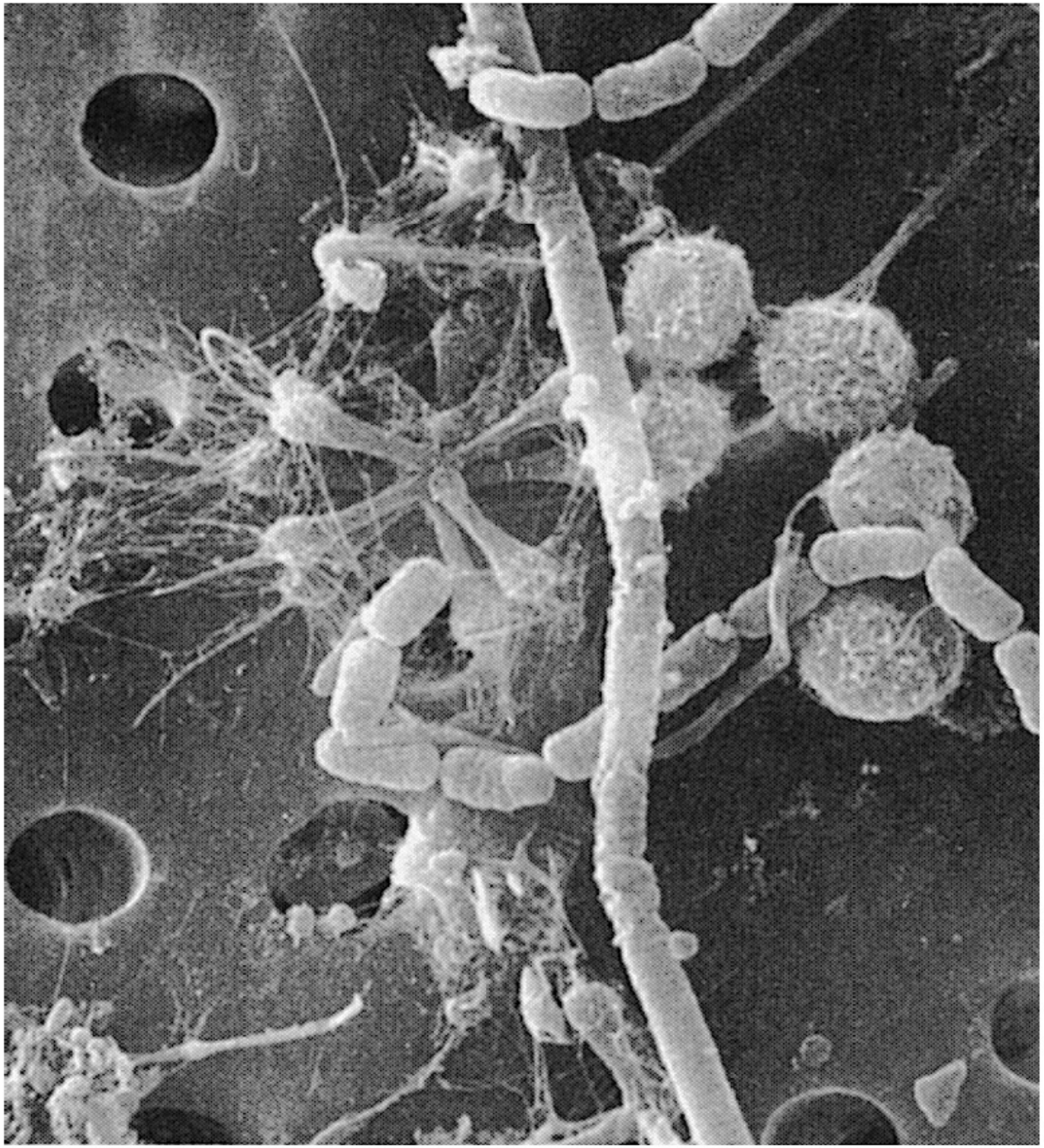
αποστείρωση θερμοευαίσθητου διαλύματος μέσω διήθησης από κατάλληλο φίλτρο (ηθμό)



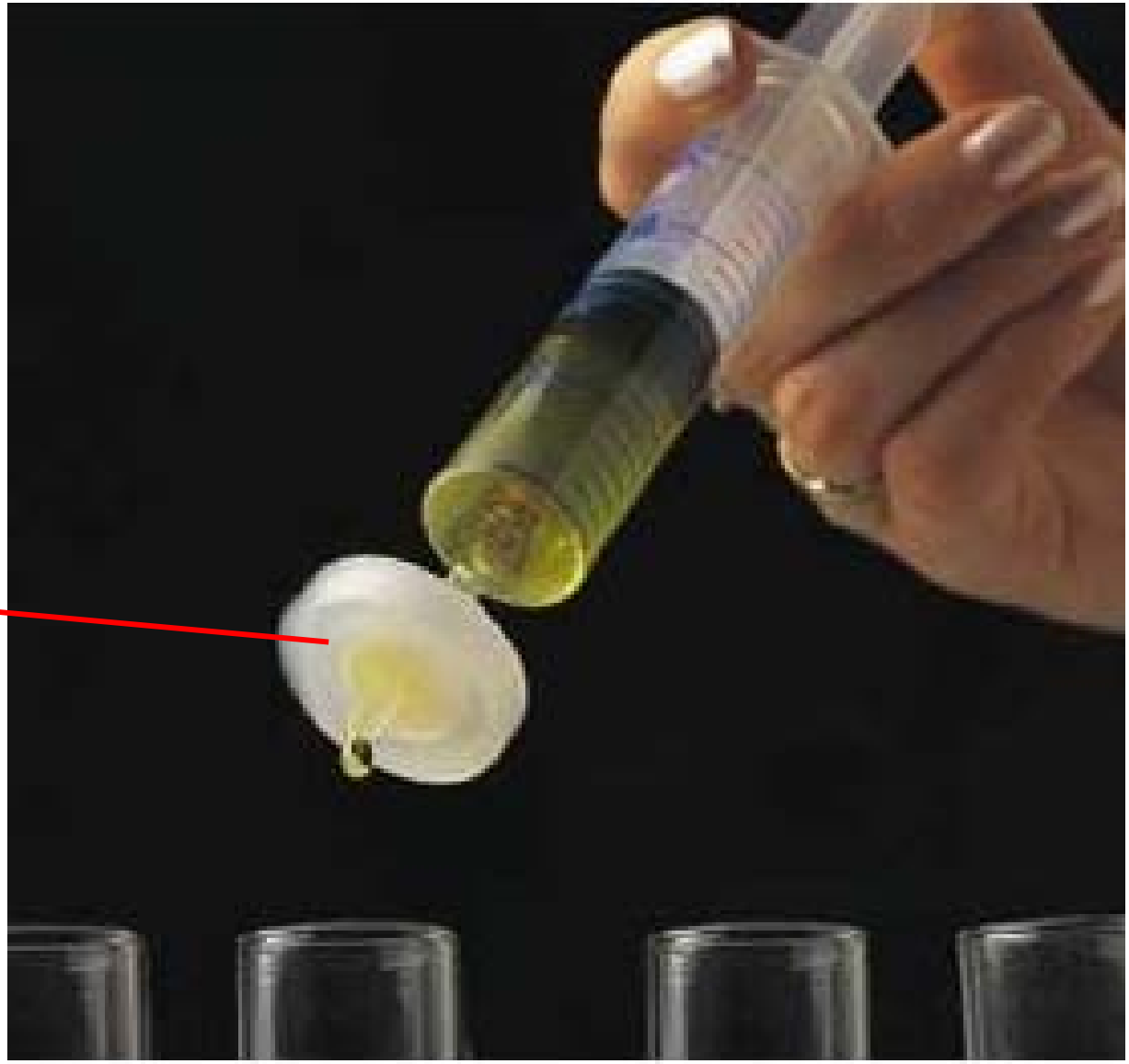


φωτογραφία ηλεκτρονιακού μικροσκοπίου σάρωσης βακτηρίων και φυκών που έχουν παγιδευτεί σε φίλτρο Nuclepore

(διάμετρος οπών 5 μm)



φίλτρα διαφορετικών διαμέτρων οπών



αποστείρωση μικρού όγκου θερμοευαίσθητου διαλύματος μέσω διήθησης από κατάλληλο φίλτρο (ηθμό), με τη βοήθεια σύριγγας

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικά μέσα

- ✓ θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ **αποξήρανση (αφυδάτωση → μεταβολή ενεργότητας νερού)**
- ✓ ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)
- ✓ υψηλή υδροστατική πίεση

- Κατά την αφυδάτωση (desiccation, drying) οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν, αλλά μπορεί να παραμείνουν βιώσιμοι ακόμη και για χρόνια (**μικροβιοστατική επίδραση**).

➢ **Όταν το νερό γίνει πάλι διαθέσιμο οι μικροοργανισμοί ανακτούν την αύξηση τους.**

- Η **ανθεκτικότητα των κυττάρων στην αφυδάτωση** διαφέρει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού.

✓ τα **ενδοσπόρια** και οι **ιοί** είναι οι πλέον ανθεκτικοί στην αφυδάτωση μικροβιακοί παράγοντες.

ξήρανση χταποδιών → αποτροπή μικροβιακής αλλοίωσης

- Τα τελευταία χρόνια, σύγχρονες μέθοδοι ξήρανσης τροφίνων όπως η **λυοφυλίωση** έχουν βοηθήσει στην παραγωγή τροφίμων με **υψηλή διάρκεια συντήρησης** και **ταυτόχρονα υψηλή ποιότητα** (π.χ. γεύση, θρεπτικά συστατικά).

πιλοτική μονάδα λυοφιλίωσης

λυοφιλιοποιημένες φράουλες

Λυοφυλίωση ή κρυοξήρανση
(lyophilization, freeze drying, cryodessication)

- Αποτελεί συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τη μακροχρόνια διατήρηση μικροβιακών κυττάρων (σχεδόν απεριόριστα!).

➢ **Σ' αυτή τη μέθοδο:**

✓ τα κύτταρα (π.χ. βακτήρια) αιωρούνται σ' ένα αποστειρωμένο **προστατευτικό θρεπτικό μέσο** (π.χ. γάλα, 3% λακτόζη, ορός αίματος κτλ) μέσα σ' ένα μικρό φιαλίδιο (vial)

✓ τα κύτταρα υφίστανται γρήγορη **κατάψυξη** (-40°C ή και λιγότερο)

✓ το παγωμένο εναιώρημα (frozen suspension) υφίσταται **ξήρανση υπό συνθήκες κενού** (under vacuum), κατά την οποία το νερό απομακρύνεται μέσω **εξάχνωσης** (δηλαδή μετάβαση από τη στερεά κατευθείαν στην αέρια φάση).

✓ το φιαλίδιο σφραγίζεται ερμητικά και οι μικροοργανισμοί (κύτταρα υπό τη μορφή σκόνης) μπορούν να διατηρηθούν για πολλά χρόνια

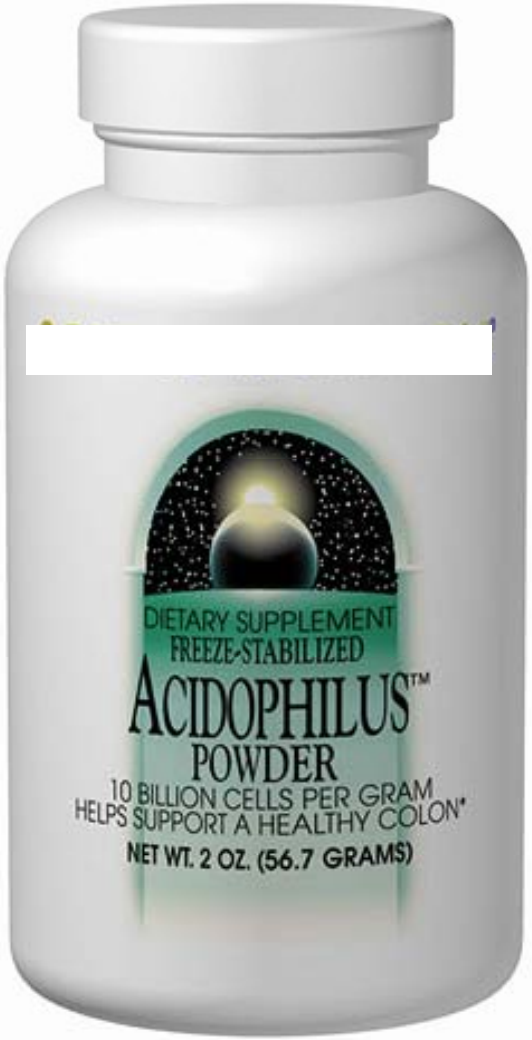
βήματα μεθόδου λυοφυλίωσης (κρυοξήρανσης) μικροβιακών κυττάρων

κύτταρα μέσα σε υγρό προστατευτικό μέσο

→ **κατάψυξη (-40°C)** → **κενό (εξάχνωση)** →

λυοφυλιοποιημένα κύτταρα (υπό μορφή σκόνης)

σύγχρονη συσκευή λυοφυλίωσης μικροοργανισμών



λυοφυλιοποιημένη καλλιέργεια (σκόνη) κυττάρων του προβιοτικού βακτηρίου ***Lactobacillus acidophilus*** το οποίο χορηγείται σαν διαιτητικό συμπλήρωμα

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικά μέσα

- ✓ θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ αποξήρανση (αφυδάτωση → μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ **ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)**
- ✓ ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)
- ✓ υψηλή υδροστατική πίεση

Ενεργότητα νερού και μικροβιακά κύτταρα

- **Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται νερό για:**

✓ τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών

✓ το μεταβολισμό των θρεπτικών στοιχείων

✓ την απομάκρυνση των αχρήστων προϊόντων (cellular wastes)

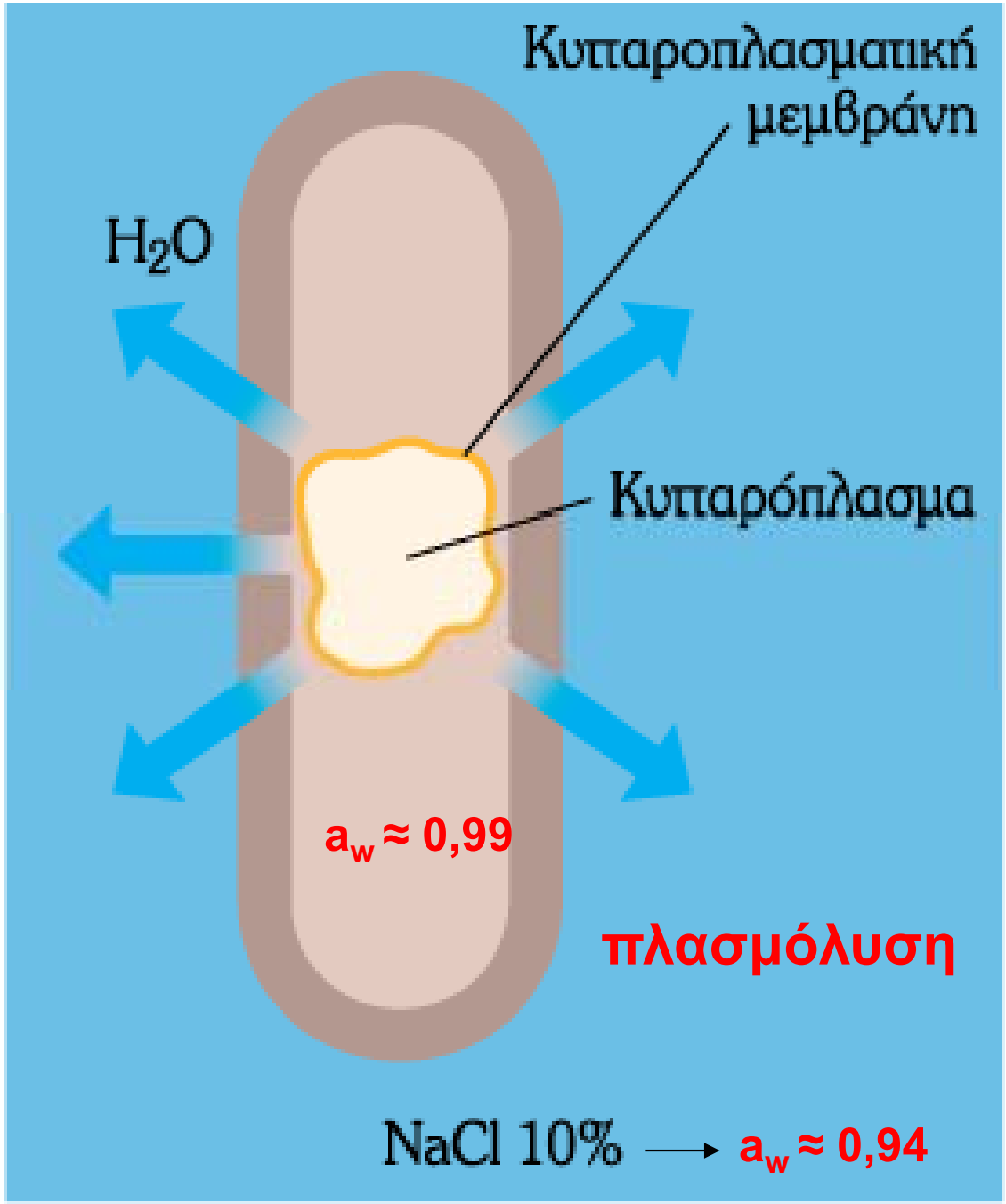
- Σ' ένα τρόφιμο, το συνολικό νερό (υγρασία) είναι παρών σαν **ελεύθερο νερό** και σαν **δεσμευμένο νερό**.

- Το **δεσμευμένο νερό** παραμένει συνδεδεμένο σε υδρόφιλα κολλοειδή και διαλυμένες ουσίες (μπορεί επίσης να παραμένει σαν τριχοειδές νερό ή σε παγωμένη κατάσταση σαν παγοκρύσταλλοι) και **δεν είναι διαθέσιμο για βιολογικές λειτουργίες**.

- **Έτσι, μόνο το ελεύθερο νερό (και το οποίο σχετίζεται με την ενεργότητα νερού) είναι σημαντικό για μικροβιακή αύξηση.**

υπερτονικό διάλυμα

- Στα τρόφιμα, συχνά χρησιμοποιούνται **υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων** ή **σακχάρων** με σκοπό τη δημιουργία υπερτονικών διαλυμάτων (που έχουν **μειωμένη τιμή ενεργότητας νερού**) και το χάσιμο νερού από τα κύτταρα λόγω **ωσμωτικής πίεσης**.



- **Το νερό μετακινείται από την περιοχή με υψηλότερο a_w προς την περιοχή με χαμηλότερο a_w.**

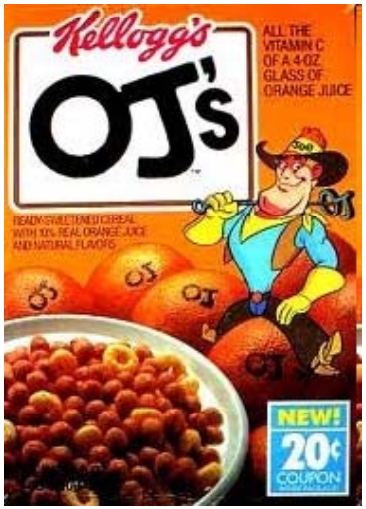
μερικά τρόφιμα με χαμηλή ενεργότητα νερού τα οποία δεν αλλοιώνονται από βακτήρια

αλατισμένα ψάρια

προϊόντα αρτοποιίας

σκόνη γάλακτος

προϊόντα ζαχαροπλαστικής



δημητριακά

ζυμώμενο σαλάμι

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικά μέσα

- ✓ θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ αποξήρανση (αφυδάτωση → μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ **ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)**
- ✓ υψηλή υδροστατική πίεση

- Ένας αποτελεσματικός τρόπος αποστείρωσης (ή μείωσης του μικροβιακού φορτίου) είναι η **χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας** (π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία, ακτίνες γ).

- **Για ένα συγκεκριμένο μικροβιακό στέλεχος, η <u>αντιμικροβιακή δράση της ακτινοβολίας</u> εξαρτάται από:**

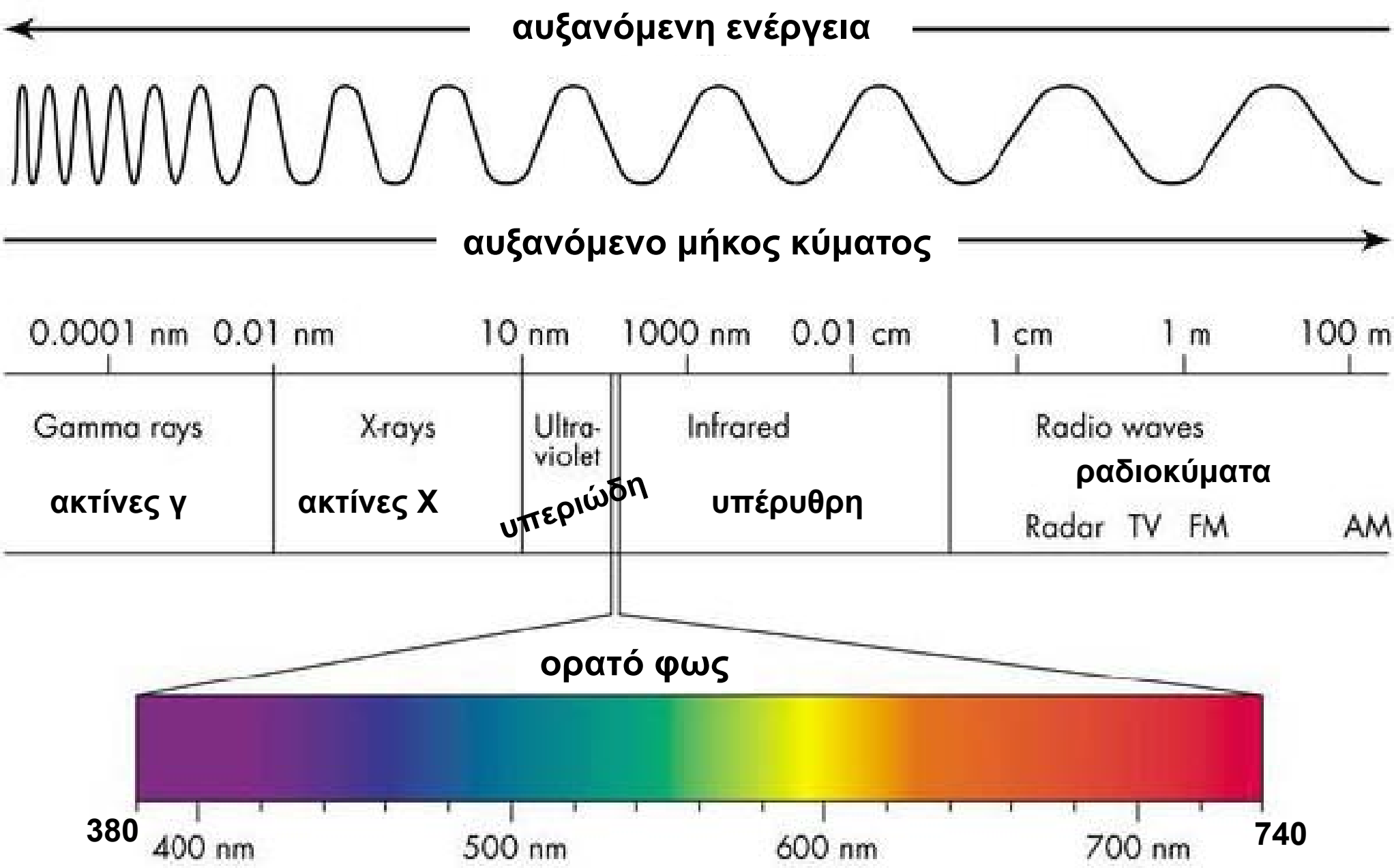
- τη **δόση** (ένταση και διάρκεια)
  και
- **περιβαλλοντικούς παράγοντες** (π.χ. pH, θερμοκρασία, $α_w$)

- **Η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για τη θανάτωση των μικροοργανισμών διακρίνεται σε 2 τύπους:**

- στην **ιοντίζουσα ακτινοβολία**

- στην **μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία**

ηλεκτρομαγνητικό φάσμα



Ιοντίζουσα ακτινοβολία

- Η ιοντίζουσα ακτινοβολία (ionizing radiation) είναι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία της οποίας τα σωμάτια (φωτόνια) έχουν **αρκετή ενέργεια** και επομένως όταν συγκρούονται με διάφορα μόρια **προκαλούν την παραγωγή ιόντων και άλλων δραστικών μορίων** (π.χ. ρίζες υδροξυλίου και υδρογόνου).

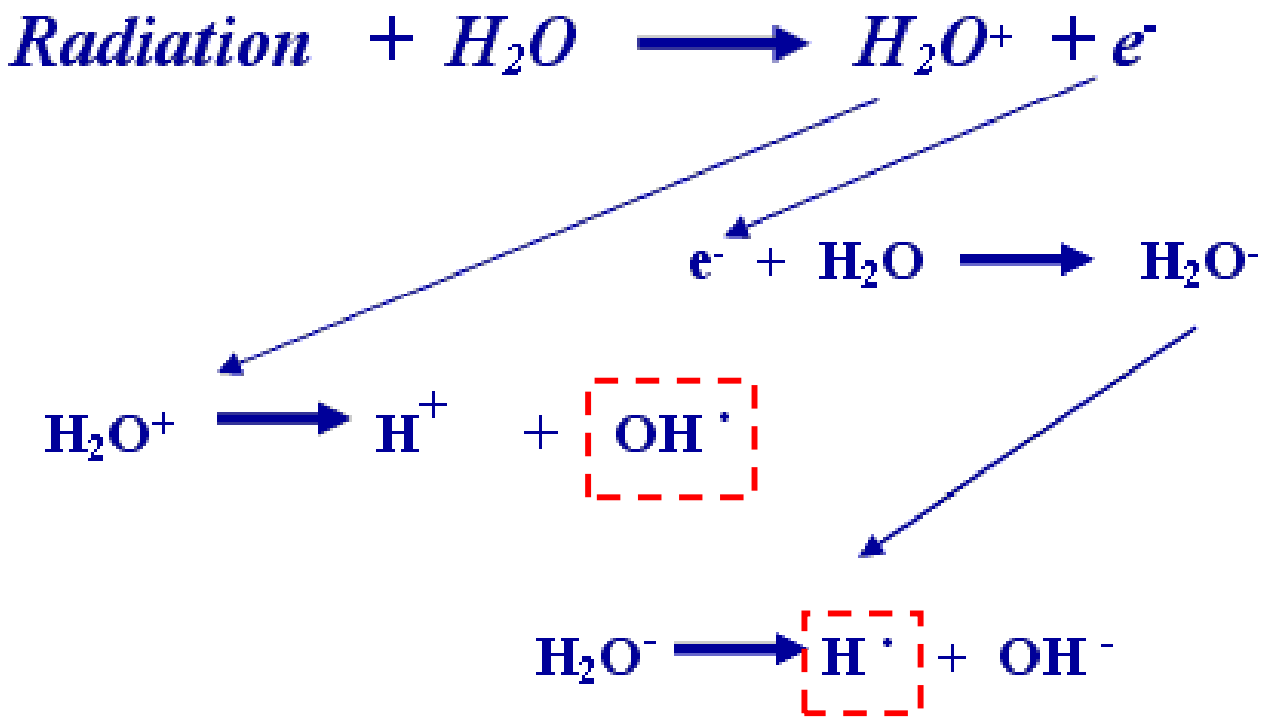
- Τα **μήκη κύματος** (wave lengths) αυτής της ακτινοβολίας είναι μικρά, ενώ οι **συχνότητες** (frequencies) τους είναι υψηλές.

- Για παράδειγμα, σε αυτήν ανήκουν οι **ακτίνες γ** και οι **ακτίνες Χ**.

- Οι **ακτίνες γ** παράγονται συνήθως από τα ραδιενεργά κοβάλτιο και καίσιο (ισότοπα ^{60}**Co** και ^{137}**Cs**, αντίστοιχα).

- Οι **ακτίνες Χ** (ή Roentgen) παράγονται με τη βοήθεια επιταχυντών ηλεκτρονίων.

- Η ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί **ιοντισμό των μορίων του νερού** που είναι παρόντα στα κύτταρα.



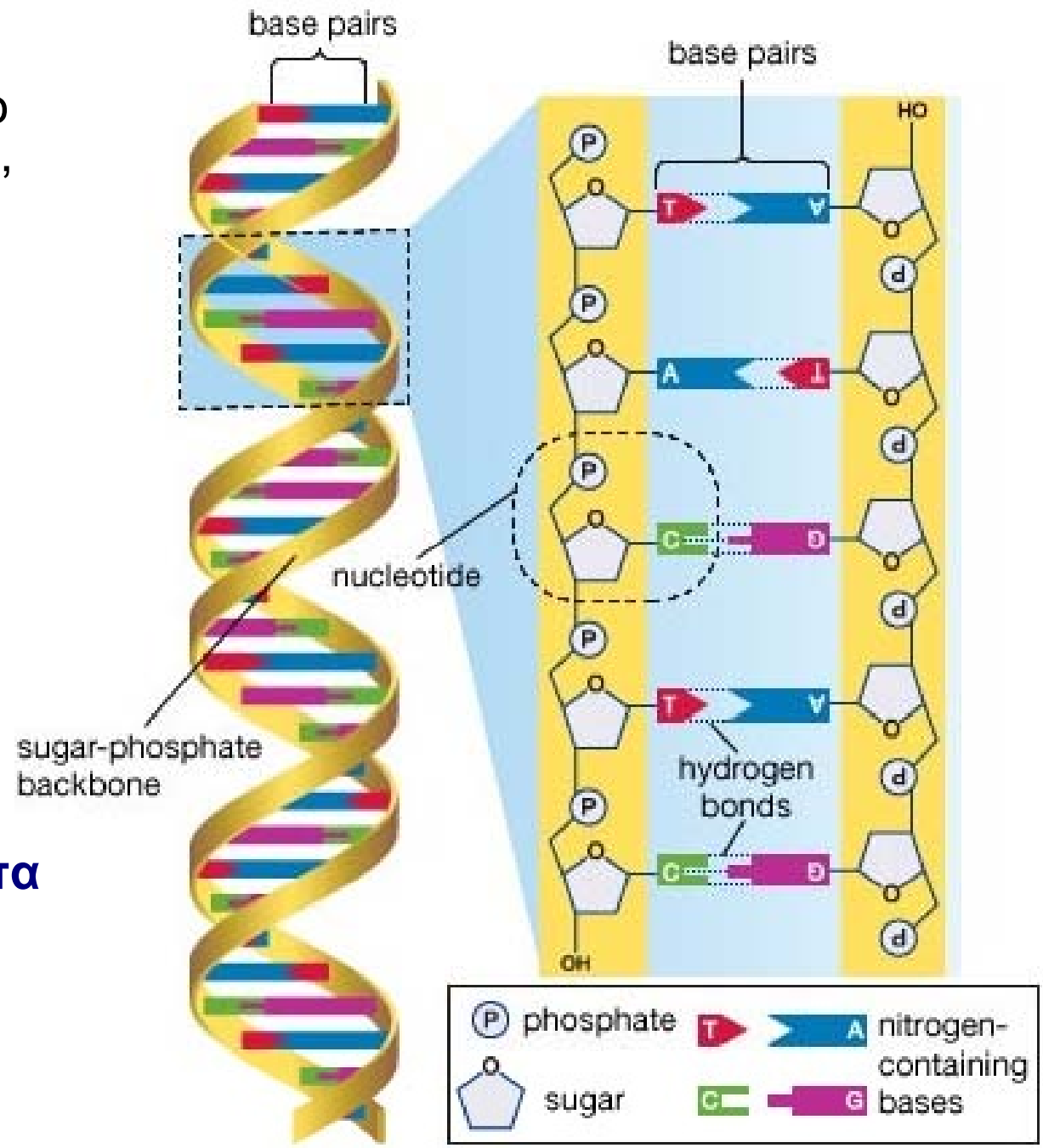
- **Οι ελεύθερες ρίζες (free radicals) υδρογόνου ($H^{\cdot}$) και υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$) που σχηματίζονται σ' αυτή τη διαδικασία, είναι πολύ δραστικές και προκαλούν οξείδωση, αναγωγή και το σπάσιμο των δεσμών C-C πολλών μορίων.**

- Βιοπολυμερή όπως το DNA, RNA και πρωτεΐνες **αποικοδομούνται υπό τη δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας** με αποτέλεσμα το θάνατο των μικροβιακών κυττάρων.

- Μελέτες έχουν δείξει πως οι **υδροξυλικές ρίζες** μπορούν να διασπούν τόσο τη μία, όσο και τις δύο αλυσίδες του DNA, στο σακχαρο-φωσφορικό σκελετό (sugar-phosphate backbone).

- Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να τροποποιούν τις αζωτούχες βάσεις του DNA, όπως για παράδειγμα τη **θυμίνη** σε **διυδροξυδιυδροθυμίνη** (dihydroxydihydrothymine).

- **Οι συνέπειες αυτών των αλλαγών είναι η ανικανότητα των μικροοργανισμών να αντιγράφουν και να μεταγράφουν το DNA και έτσι δεν μπορούν πια να αναπαραχθούν και τελικά πεθαίνουν.**



Μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία

- Στη **μη-ιοντίζουσα ακτινοβολία** ανήκουν οι μορφές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας των οποίων τα φωτόνια δεν μεταφέρουν αρκετή ενέργεια ώστε να μπορούν να προκαλούν ιοντισμό ατόμων ή μορίων.

➢ **Για παράδειγμα, σ' αυτήν ανήκουν:**

✓ το **υπεριώδες φως** (ultraviolet, 10-400nm)

→ **χρησιμοποιείται για αντιμικροβιακή δράση** (με δραστικότερο μήκος κύματος τα 260 nm)

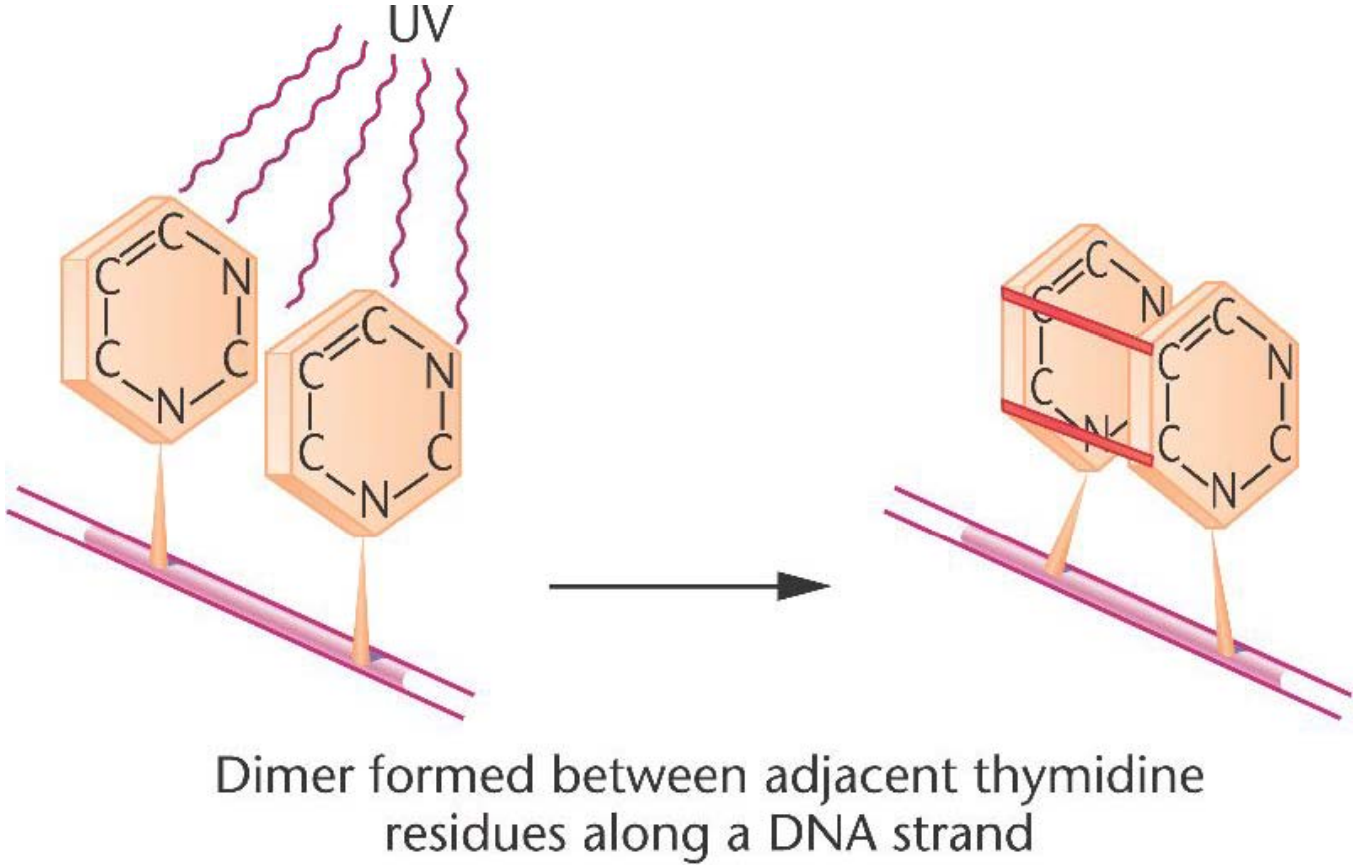
✓ το **ορατό φως** (visible)

✓ το **υπέρυθρο** (infrared)

✓ τα **ραδιοκύματα** (radiowaves)

✓ τα **μικροκύματα** (microwaves)

- Το **υπεριώδες φως (UV)** καταστρέφει το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σ' αυτό δημιουργώντας **διμερή θυμίνης**, τα οποία παρεμποδίζουν το σωστό διπλασιασμό (αντιγραφή) του DNA κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής του κυττάρου.



σχηματισμός διμερών θυμίνης στο DNA εξαιτίας της υπεριώδους ακτινοβολίας

Ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία

- Οι μικροοργανισμοί είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στο υπεριώδες φως (UV light) ανάμεσα στα **200 και στα 280 nm**.

***Legionella* spp.**

- **Εξαιτίας της χαμηλής διεισδυτικής ικανότητας (penetration power), η UV ακτινοβολία συνήθως χρησιμοποιείται:**

  - ✓ για την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια των τροφίμων (π.χ. κρέας, ψάρι, ψωμί)
  - ✓ την αποστείρωση του αέρα
  - ✓ την απολύμανση του εξοπλισμού στους χώρους παραγωγής / επεξεργασίας τροφίμων.

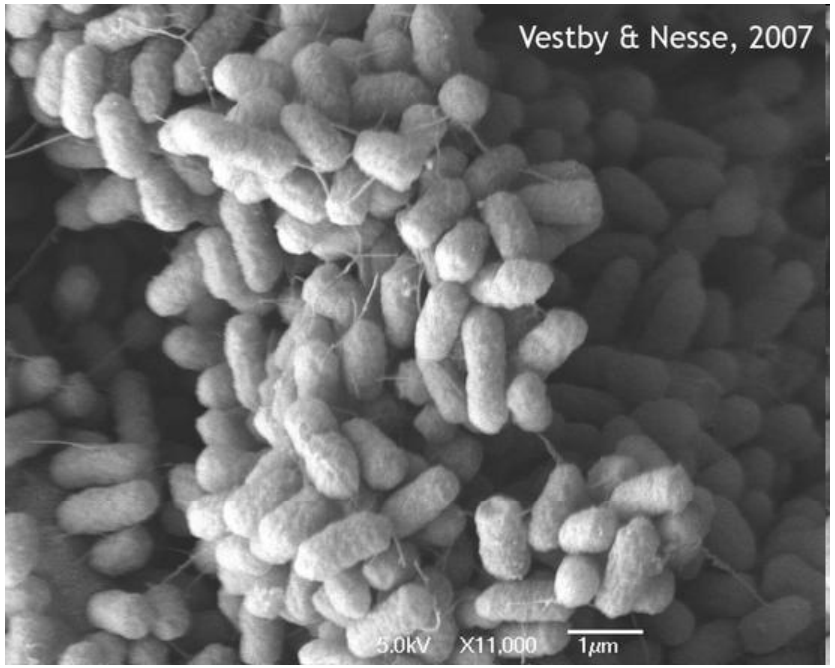
θάλαμος νηματικής ροής βιολογικού εργαστηρίου εφοδιασμένος με πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (λυχνία ατμών υδραργύρου)

Δόση ακτινοβόλησης

- Σαν μονάδα απορροφούμενης δόσης ακτινοβολίας χρησιμοποιείται το **rad** ή το **gray** (ισχύει: **1 Gy = 100 rad**).

➢ **Κατά κανόνα, οι μικροοργανισμοί είναι πολύ πιο ανθεκτικοί στην ακτινοβολία απ' ότι οι πολυκύτταροι οργανισμοί.**

✓ Για παράδειγμα, η ποσότητα ενέργειας (ακτινοβολίας) που απαιτείται για να μειωθεί ο πληθυσμός της ***Salmonella* Typhimurium** κατά 10 φορές (δηλ. κατά μια λογαριθμική μονάδα, D_{10}) είναι **200 Gy**, ενώ η θανατηφόρος δόση για τον άνθρωπο εκτιμάται σε λιγότερο από **10 Gy**.



***Salmonella* Typhimurium**

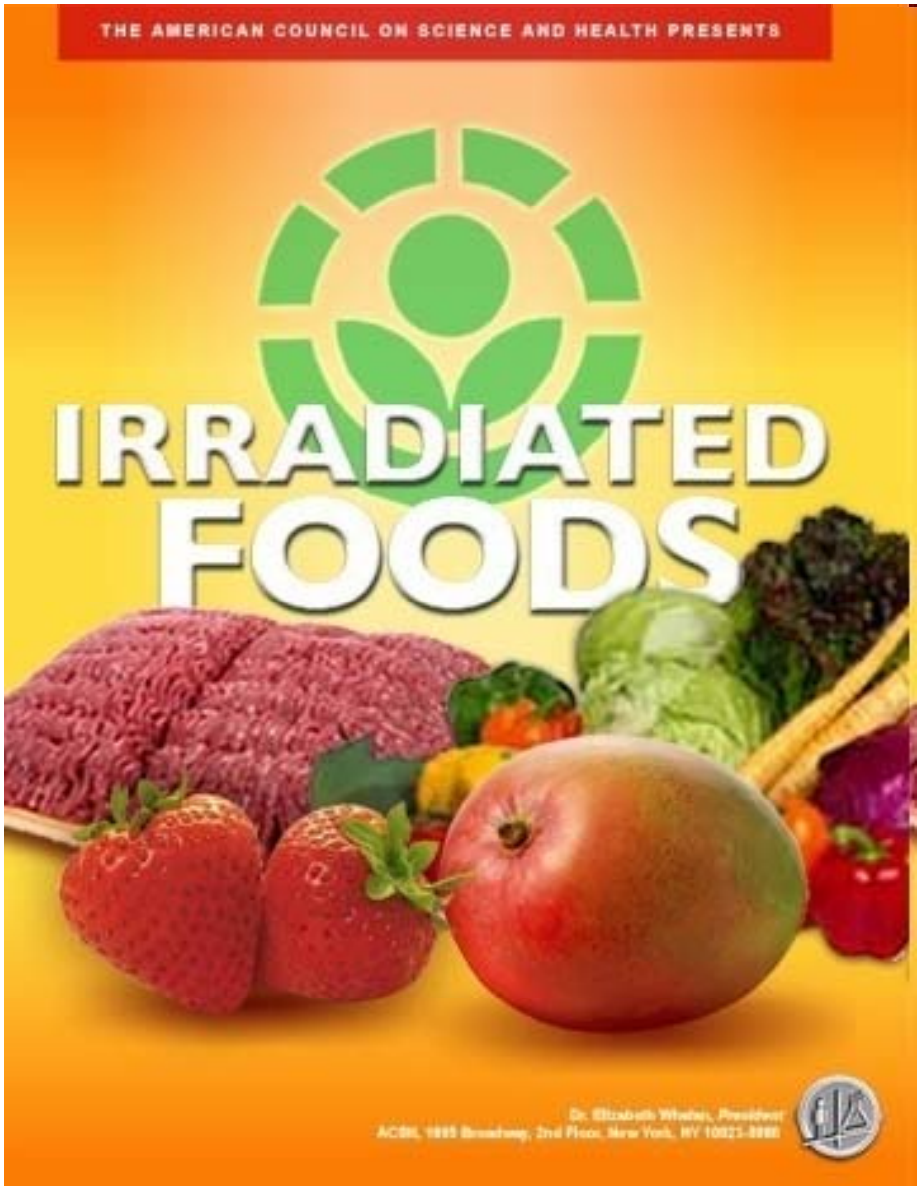
- Ο **Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (W.H.O.)** έχει εγκρίνει τη χρήση της ακτινοβολίας για τρόφιμα **μέχρι 10000 Gy** (**10 kGy**) τα οποία είναι υπερβολικά ευαίσθητα στη μικροβιακή μόλυνση (π.χ. κιμάς).

World Health Organization

- Στις Η.Π.Α., η **Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων** (Food and Drug Administration) FDA) έχει εγκρίνει τη χρήση της για αποστείρωση:

- ✓ χειρουργικών υλικών
- ✓ αναλώσιμων εργαστηρίων
- ✓ φαρμάκων
- ✓ ιατρικών μοσχευμάτων κτλ.

U.S. Food and Drug Administration
Protecting and Promoting *Your* Health



- Σε αρκετές χώρες, η **χρήση της ακτινοβολίας** για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου των τροφίμων **δεν είναι αποδεκτή**, εξαιτίας των φόβων για:

  - ✓ ραδιενεργό μόλυνση (radioative contamination)
  - ✓ αλλοίωση της διατροφικής αξίας και της γευστικότητας
  - ✓ παραγωγής τοξικών ή καρκινογόνων προϊόντων

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με φυσικά μέσα

- ✓ θερμότητα (θερμική επεξεργασία)
- ✓ διήθηση (φιλτράρισμα)
- ✓ αποξήρανση (αφυδάτωση → μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ωσμωτική πίεση (μεταβολή ενεργότητας νερού)
- ✓ ακτινοβολία (ιοντίζουσα, μη-ιοντίζουσα)
- ✓ υψηλή υδροστατική πίεση

1 atm = 14,5 psi = 0,1 MPa

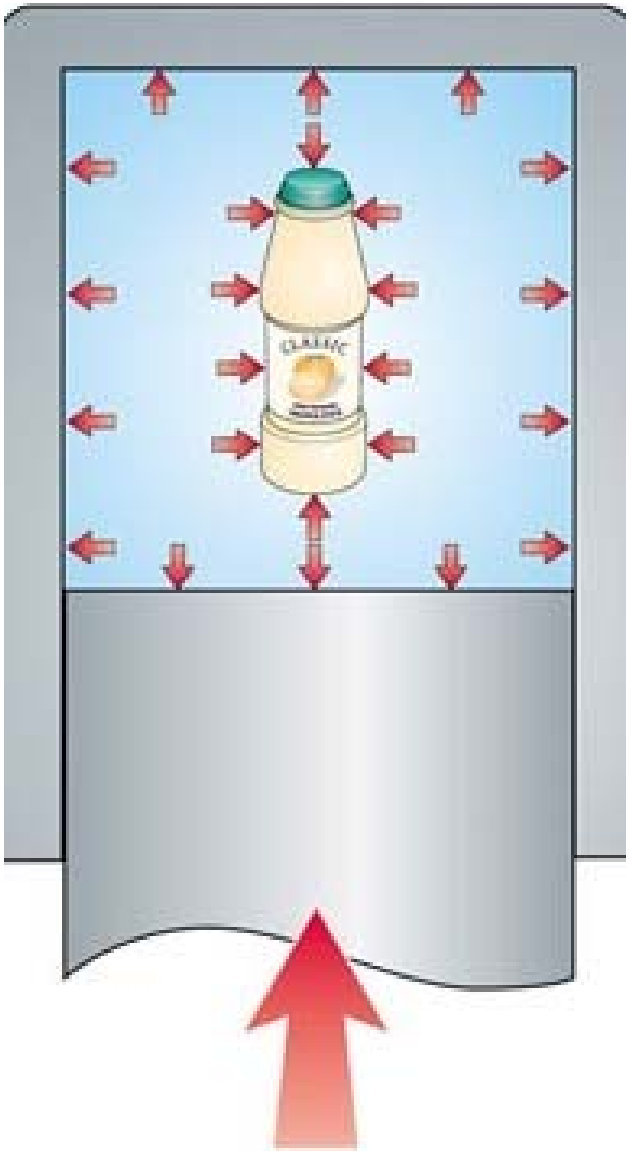
- Τα μικροβιακά κύτταρα που εκτίθενται σε **υψηλή υδροστατική πίεση** (high hydrostatic pressure, HHP) (**100 – 800 MPa** ή και περισσότερο) σ' ένα γεμισμένο με νερό κλειστό διαμέρισμα θανατώνονται.

➢ **Η υψηλή πίεση προκαλεί διάσπαση:**

✓ των ιοντικών δεσμών
✓ των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων
✓ των δεσμών υδρογόνου
των **μακρομορίων**

→ με αποτέλεσμα τη **μετουσίωσή** τους.

- Για την **αδρανοποίηση των σπορίων** απαιτούνται πιέσεις **≥ 700 MPa**. Σε μικρότερες πιέσεις (≈ 300 MPa) επάγεται η **εκβλάστηση των σπορίων** (spore germination).



η επεξεργασία υψηλής πίεσης χρησιμοποιείται κάποιες φορές για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου σε χυμούς φρούτων

Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης με χημικά μέσα
(χημικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες)

- **Αντιμικροβιακός παράγοντας** (antimicrobial agent) είναι κάθε χημική ένωση (φυσικής ή συνθετικής προέλευσης) που προκαλεί το θάνατο ή την παρεμπόδιση (αναστολή, καθυστέρηση) της αύξησης ενός μικροοργανισμού.

- **Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες χωρίζονται στα:**

  - ✓ αντισηπτικά (antiseptics)
  - ✓ απολυμαντικά (disinfectants)
  - ✓ χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (chemotherapeutic agents)

- **Αντισηπτικά** ονομάζονται οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που έχουν χαμηλή τοξικότητα έναντι των ζωικών κυττάρων, οπότε μπορούν να <u>επαλειφθούν σε ζωντανούς ιστούς</u> (στο δέρμα).

- **Απολυμαντικά** ονομάζονται οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που <u>εφαρμόζονται μόνο σε άψυχα (άβια) αντικείμενα</u> (π.χ. πάγκοι, δάπεδα, σωληνώσεις κτλ).

- **Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες** είναι εκείνοι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που μπορεί να χρησιμοποιηθούν <u>εσωτερικά του ανθρώπινου σώματος</u>.

Αποτελεσματικότητα απολυμαντικών

- Η **αποτελεσματικότητα** των διαφόρων απολυμαντικών που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων **επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες**, όπως:

✓ συγκέντρωση

✓ χρόνος έκθεσης

✓ παρουσία οργανικού υλικού

✓ θερμοκρασία

✓ pH

✓ σκληρότητα νερού (αλατότητα)

Κατηγορίες χημικών αντιμικροβιακών παραγόντων

- **Στους διάφορους χημικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες συγκαταλέγονται:**

- αλκοόλες (π.χ. αιθανόλη, ισοπροπανόλη)
- φαινολικές ενώσεις (π.χ. εξαχλωροφαίνιο, χλωροεξιδίνη)
- χλώριο (Cl_2) και ενώσεις χλωρίου (π.χ. υποχλωριώδες νάτριο, NaOCl)
- ιώδιο και ιωδιοφόρες ενώσεις (π.χ. Betadine®)
- βαρέα μέταλλα (π.χ. υδράργυρος, χαλκός, άργυρος, χρυσός)
- επιφανειοδραστικές ουσίες, απορρυπαντικά (surfactants, detergents, συχνά χρησιμοποιούνται ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, QACs, π.χ. χλωριούχο βενζαλκόνιο)
- οργανικά οξέα και παράγωγά τους (π.χ. σορβικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, προπιονικό ασβέστιο)
- αλδεΰδες (π.χ. φορμαλδεΰδη, γλουταραλδεΰδη)
- οξειδωτικοί παράγοντες (όζον O_3, H_2O_2, υπεροξικό οξύ)
- οξείδιο του αιθυλενίου (αέριο χημειοαποστειρωτικό)

Αντιμικροβιακοί παράγοντες χορηγούμενοι *in vivo* (χημειοθεραπευτικοί)

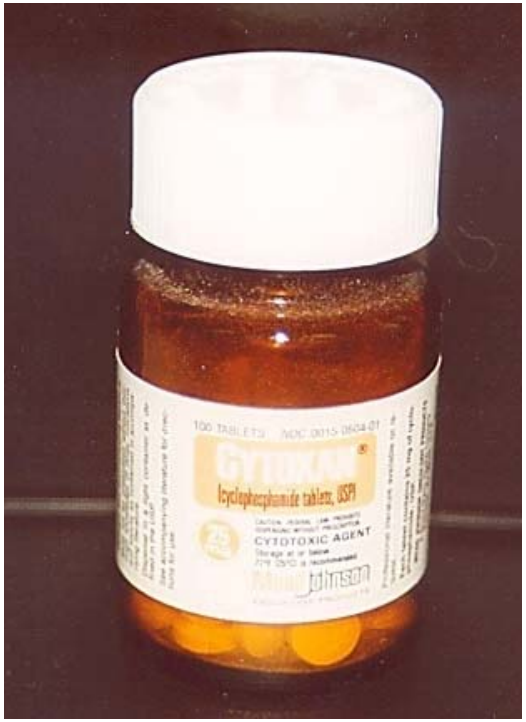
- Σημαντικό κριτήριο για να θεωρηθεί επιτυχημένος ένας χημειοθεραπευτικός αντιμικροβιακός παράγοντας είναι η **επιλεκτική τοξικότητα** του, η ικανότητα του δηλαδή να αναστέλλει τη δράση των παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς να βλάπτει τον ξενιστή.

- Κάθε χημειοθεραπευτικός παράγοντας έχει ένα χαρακτηριστικό **φάσμα αντιμικροβιακής δράσης**.

➢ **Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην <u>κλινική ιατρική</u> και στην <u>κτηνιατρική</u> και διακρίνονται:**

✓ στους **συνθετικούς παράγοντες** (ανάλογα αυξητικών παραγόντων και κινολόνες)

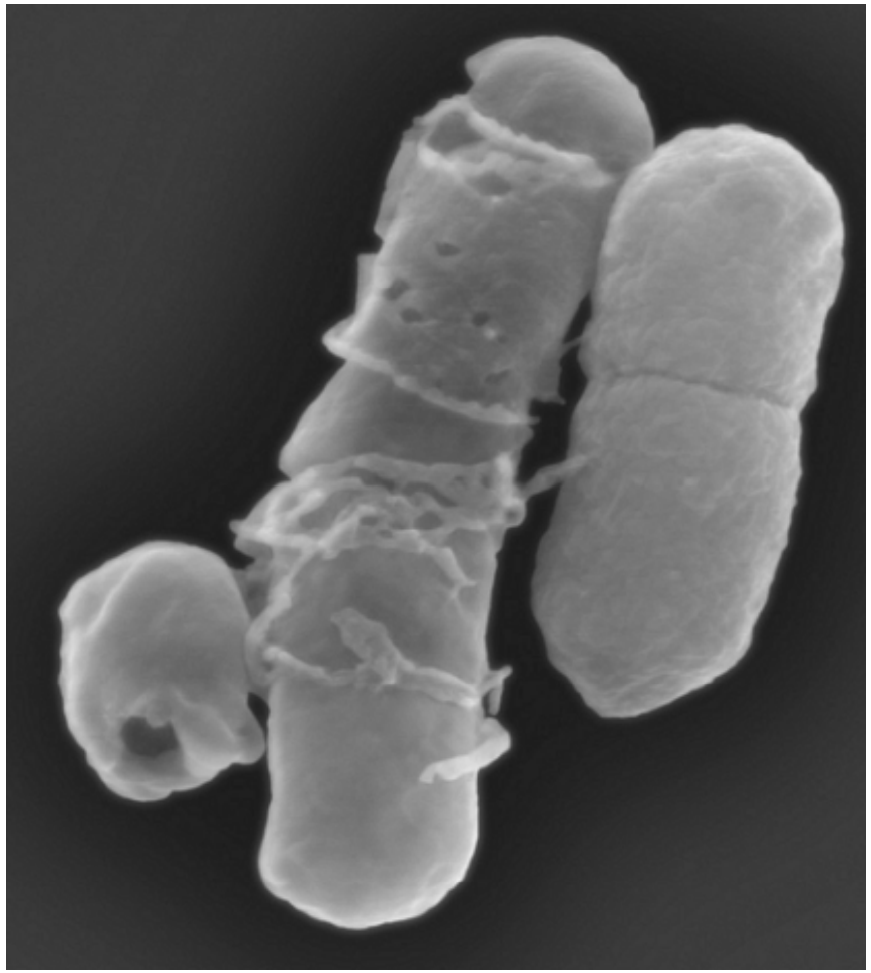
✓ στα **αντιβιοτικά**



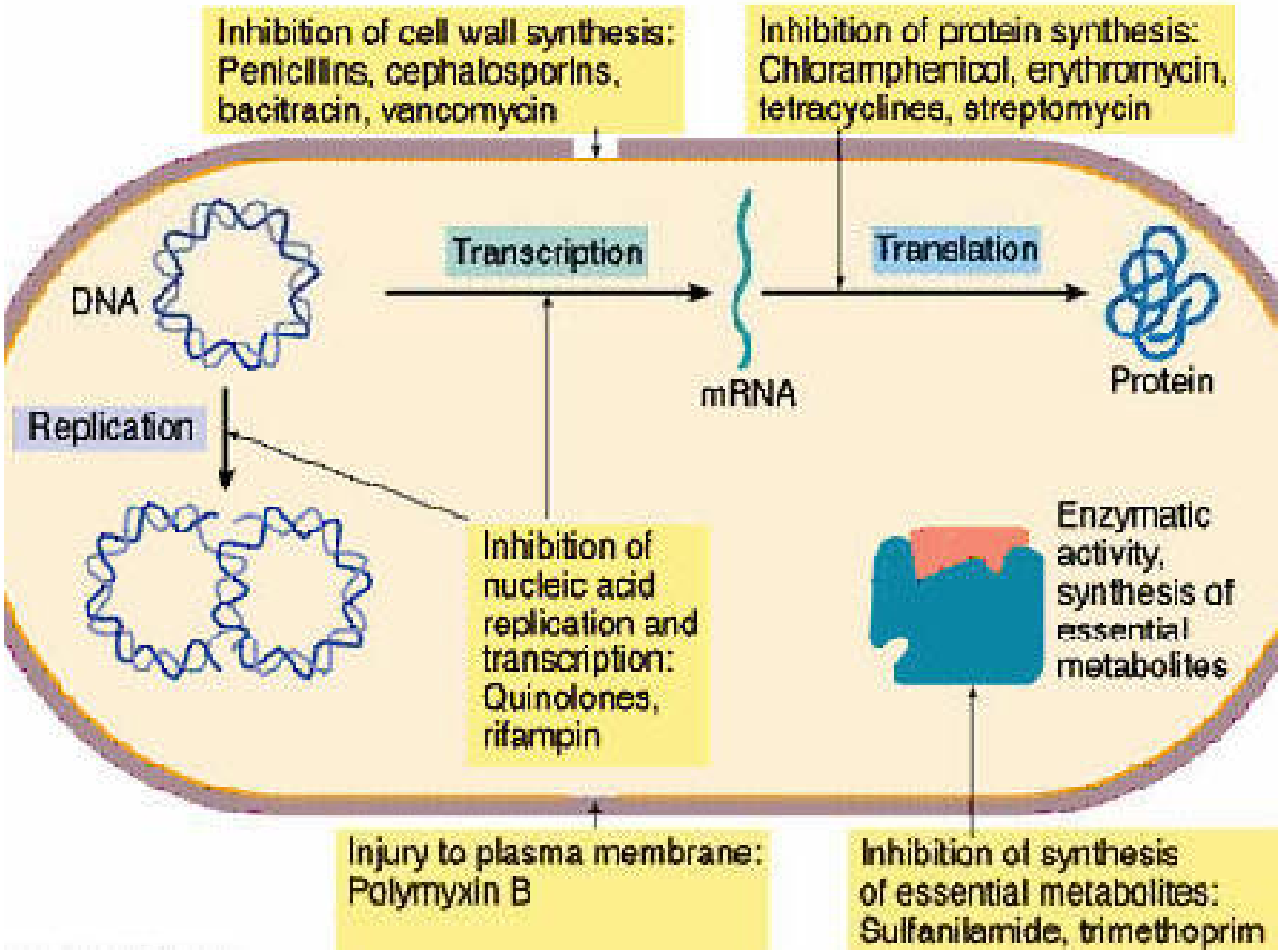
Δράση χημειοθεραπευτικών παραγόντων

- **Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να παρεμποδίζουν τους μικροοργανισμούς με τους εξής τρόπους:**

- ✓ αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
- ✓ αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση
- ✓ προκαλούν βλάβες στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη
- ✓ αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων (τις διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής)
- ✓ αναστέλλουν τη σύνθεση απαραίτητων μεταβολιτών (παρεμποδίζουν ένζυμα, μεταβολικές αντιδράσεις)



αποδόμηση κυτταρικού τοιχώματος στο *Escherichia coli* εξαιτίας της δράσης της αμοξυκιλλίνης (αντιβιοτικού)



μηχανισμοί δράσης αντιμικροβιακών χημειοθεραπευτικών παραγόντων

Συνθετικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες

- **Σ' αυτούς ανήκουν:**

✓ τα **ανάλογα αυξητικών παραγόντων**

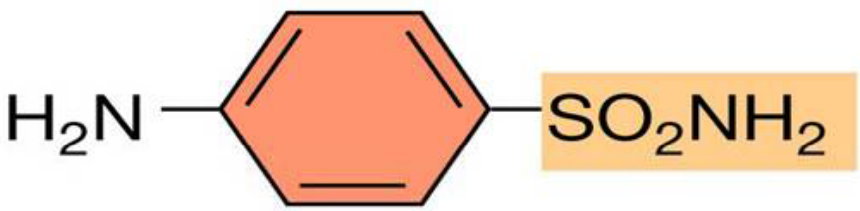
και

✓ οι **κινολόνες**

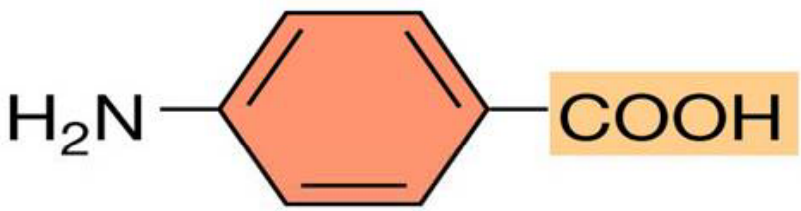
- **Ανάλογο αυξητικού παράγοντα** (growth factor analog) είναι κάθε χημική ουσία που έχει παραπλήσια χημική δομή με κάποιον αυξητικό παράγοντα (βιταμίνες, αμινοξέα, πουρίνες, πυριμιδίνες) και έτσι παρεμποδίζει την πρόσληψη του παράγοντα αυτού.

- Οι **κινολόνες** (quinolones) είναι συνθετικές **αντιβακτηριακές ενώσεις** που αλληλεπιδρούν με τη βακτηριακή DNA γυράση (τοποϊσομεράση ΙΙ), εμποδίζοντας την υπερελίκωση του βακτηριακού DNA, διαδικασία απαραίτητη για τη «συσκευασία» του DNA στο βακτηριακό κύτταρο.

αυξητικός παράγοντας (p-αμινοβενζοϊκό οξύ) και ανάλογο παραπλήσιας δομής (σουλφανιλαμίδη)

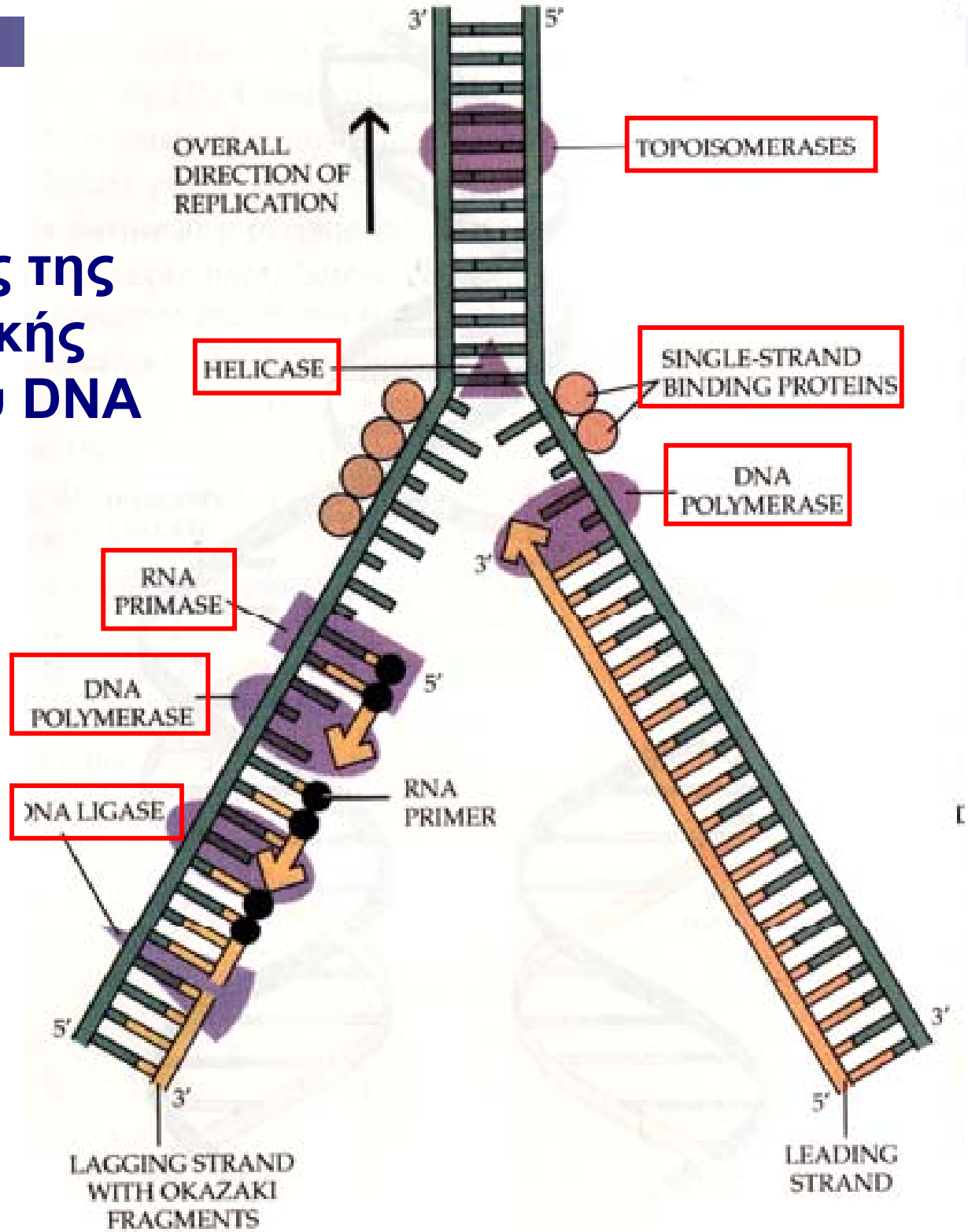


(a) Sulfanilamide



(b) p-Aminobenzoic acid

οι πρωτεΐνες της «αντιγραφικής μηχανής» του DNA



Αντιβιοτικά

- **Αντιβιοτικό (antibiotic) είναι κάθε χημική ουσία που παράγεται από έναν μικροοργανισμό (προϊόν μεταβολισμού) και προκαλεί το θάνατο ή αναστέλλει την ανάπτυξη ενός άλλου μικροοργανισμού (συνήθως βακτηρίου).**

- Πολλά αντιβιοτικά καθίστανται πιο αποτελεσματικά ύστερα από κάποια χημική τροποποίηση → **ημισυνθετικά αντιβιοτικά**.

- Τα **Gram$^+$ βακτήρια** είναι συνήθως πιο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά από τα **Gram$^-$ βακτήρια**.

- Αντιβιοτικά που δρουν τόσο έναντι θετικών, όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων λέγονται **αντιβιοτικά ευρέως φάσματος** (broad spectrum).

Αντιβιοτικά *β*-λακτάμης

- Μια από τις σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών είναι τα **αντιβιοτικά της *β*-λακτάμης** (*β*-lactam), τα οποία αποτελούν **ισχυρούς αναστολείς της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων**.

➢ **Σ' αυτά ανήκουν:**

✓ οι **πενικιλλίνες**

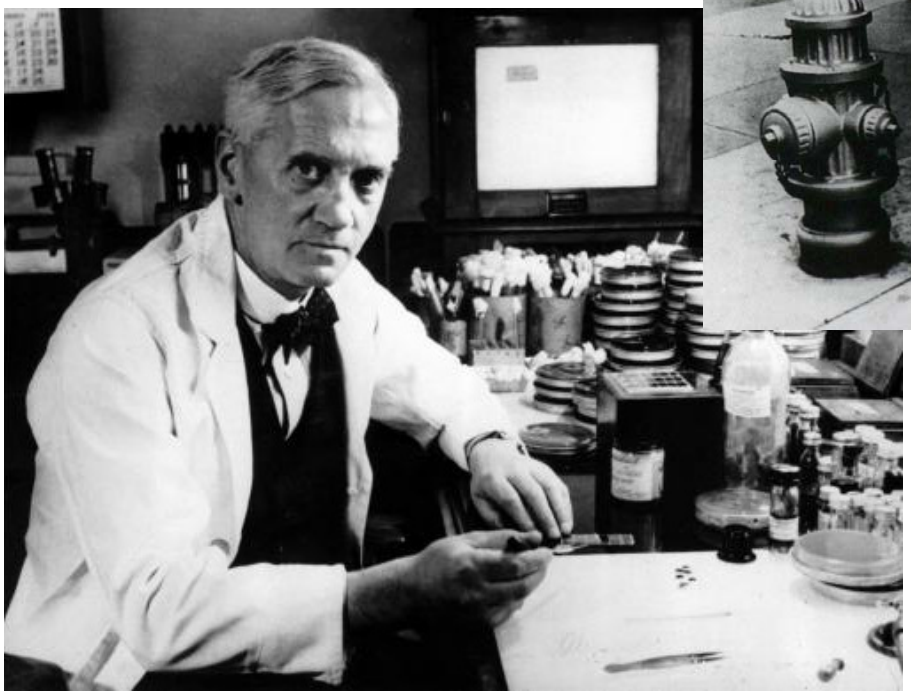
✓ οι **κεφαλοσπορίνες**

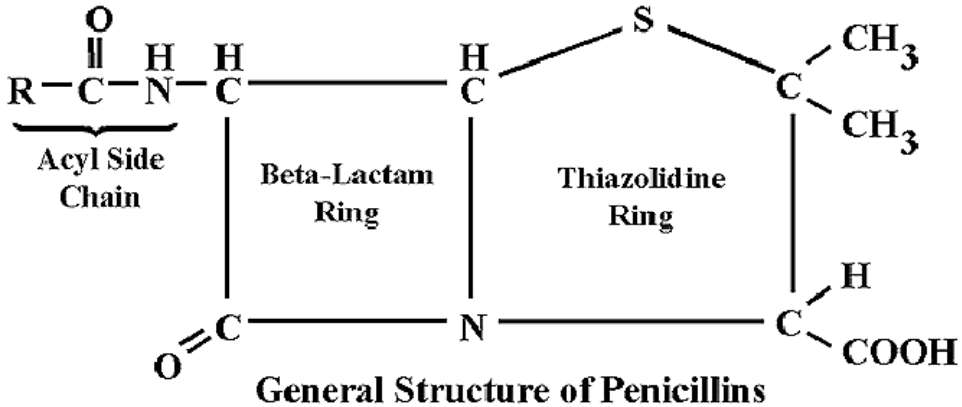
} **πάνω από το 50% του συνόλου των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως**

✓ οι **σεφαμυκίνες**

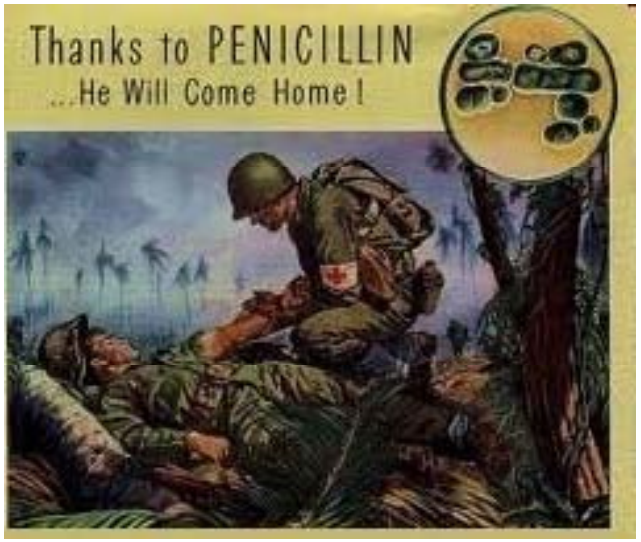
- Η **φυσική πενικιλλίνη** παράγεται από ορισμένα είδη του μύκητα ***Penicillium*** (ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Fleming).

- Η **φυσική κεφαλοσπορίνη** παράγεται από ορισμένα είδη του μύκητα ***Cephalosporium***.

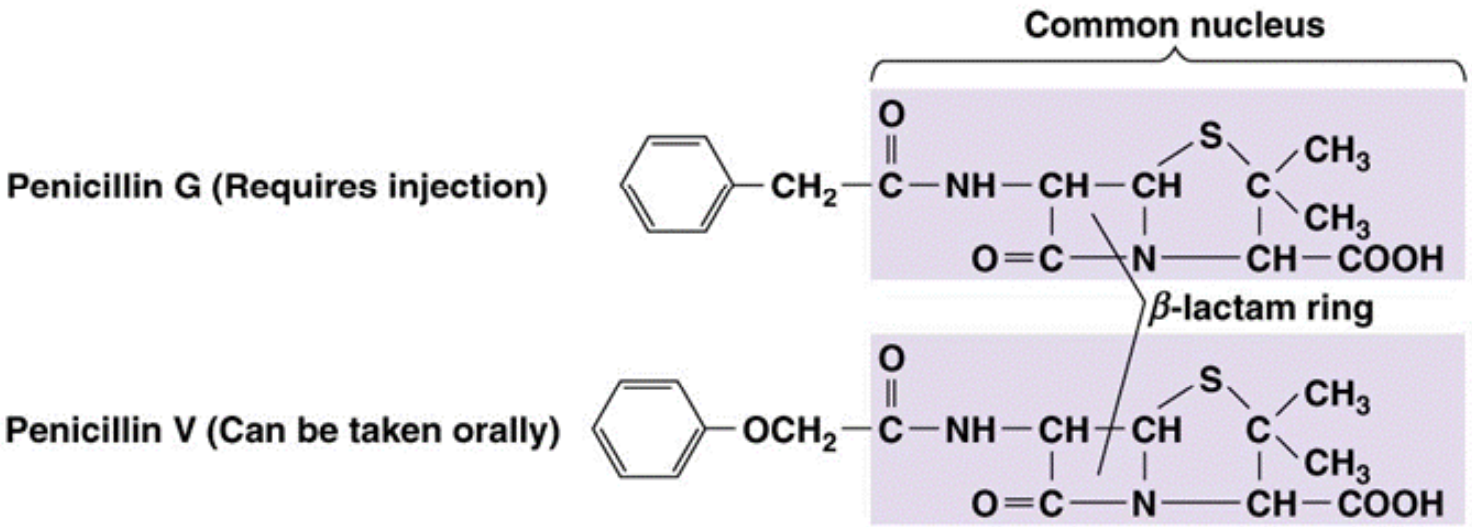




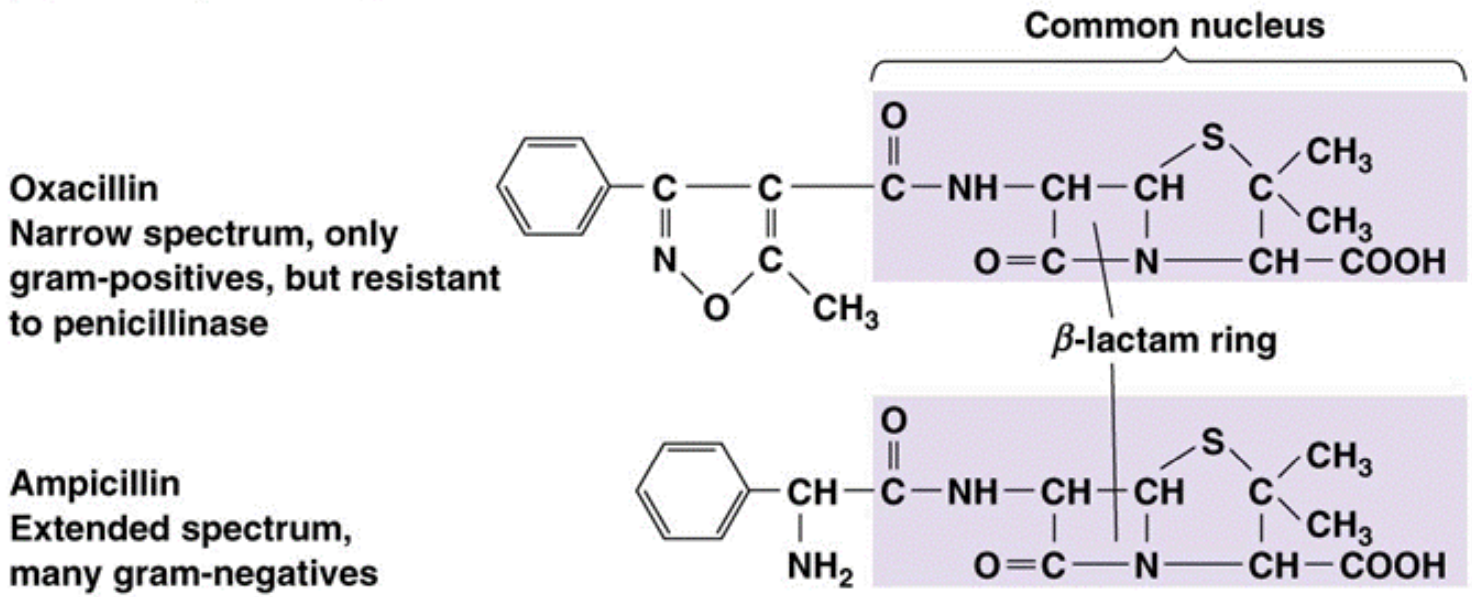
ο Alexander Fleming (1881-1955) απομόνωσε την πενικιλλίνη το 1928 από το μύκητα *Penicillium notatum* (τιμήθηκε με βραβείο Nobel το 1945)



(a) Natural penicillins



(b) Semisynthetic penicillins



Αντιβιοτικά που παράγονται από προκαρυώτες

- Πολλά από τα αντιβιοτικά παράγονται από προκαρυώτες (κυρίως είδη των βακτηριακών γενών ***Streptomyces*** και ***Bacillus***).

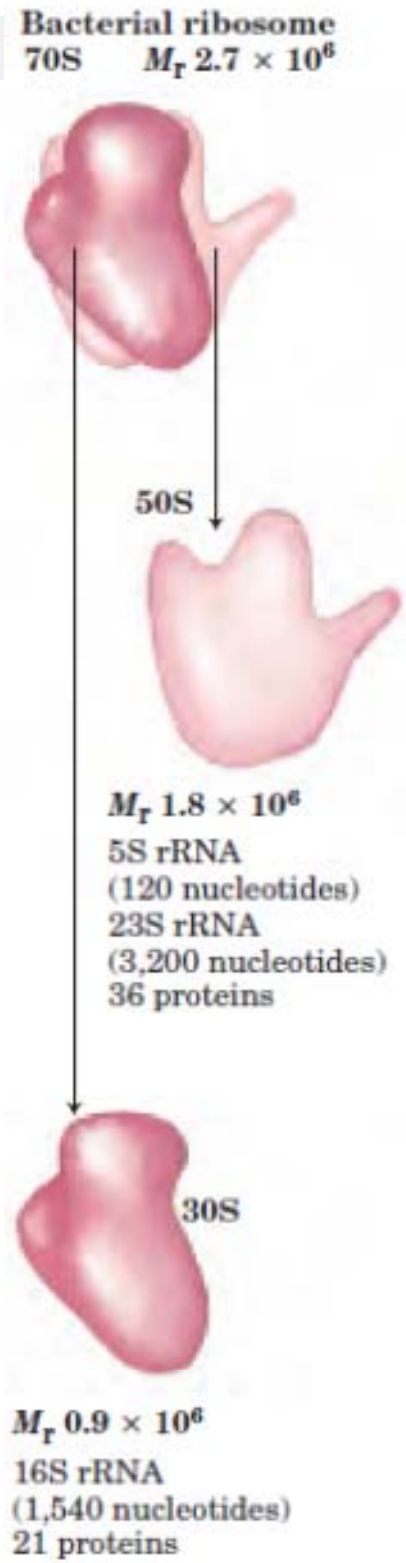
➢ **Σ' αυτά ανήκουν:**

✓ οι **αμινογλυκοζίτες** (aminoglycosides)
π.χ. στρεπτομυκίνη, καναμυκίνη, γενταμικίνη, νεομυκίνη

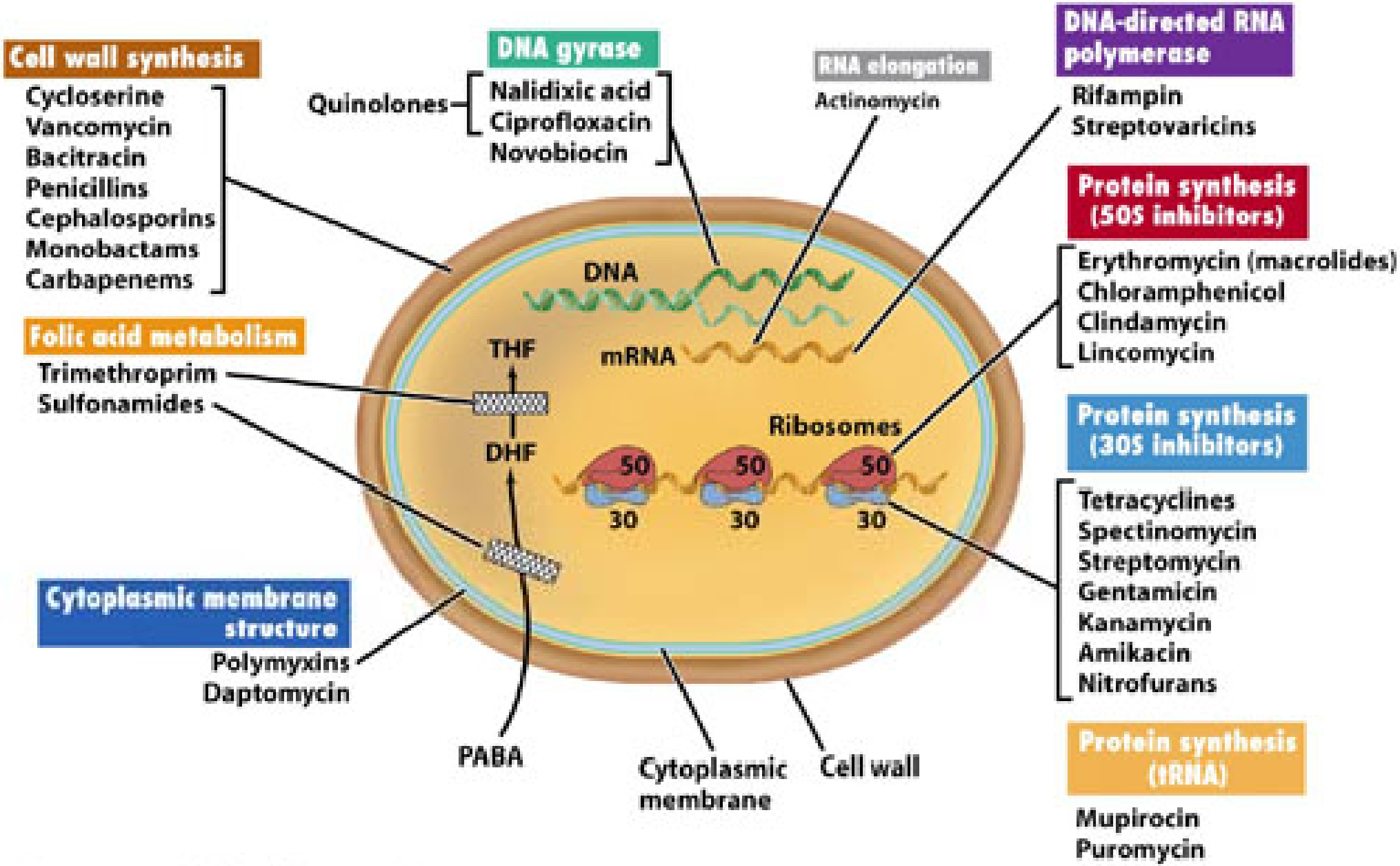
✓ τα **αντιβιοτικά μακρολιδίων** (macrolides)
π.χ. ερυθρομυκίνη

✓ οι **τετρακυκλίνες** (tetracyclines)
π.χ. χλωροτετρακυκλίνη

- Τα αντιβιοτικά αυτά είναι **<u>αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης</u>**, επιδρώντας στη λειτουργίας της είτε της μικρής (30S), είτε της μεγάλης υπομονάδας (50S) των βακτηριακών ριβοσωμάτων.



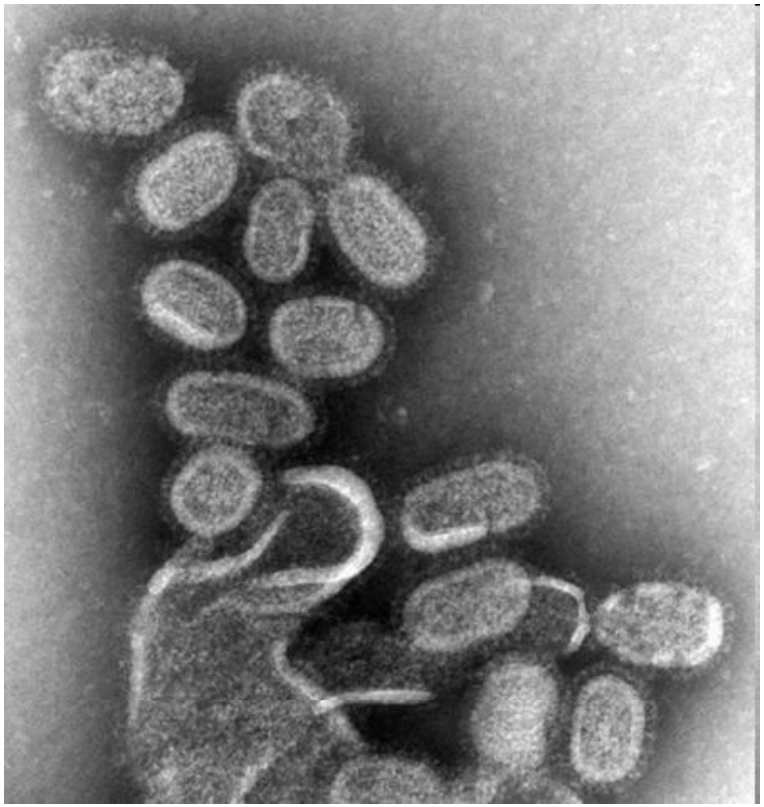
μηχανισμοί δράσης διαφόρων αντιβιοτικών



Έλεγχος ιών και παθογόνων μυκήτων

Επιλεκτική τοξικότητα

- Τα φάρμακα που προορίζονται να περιορίσουν την εξάπλωση των ιών και την ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων **δεν θα πρέπει να επηρεάζουν τη λειτουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων του ξενιστή**.



ιοσωμάτια του ιού της γρίππης όπως φαίνονται στο ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο

- **Επομένως, μόνο όσες ενώσεις επηρεάζουν επιλεκτικά:**

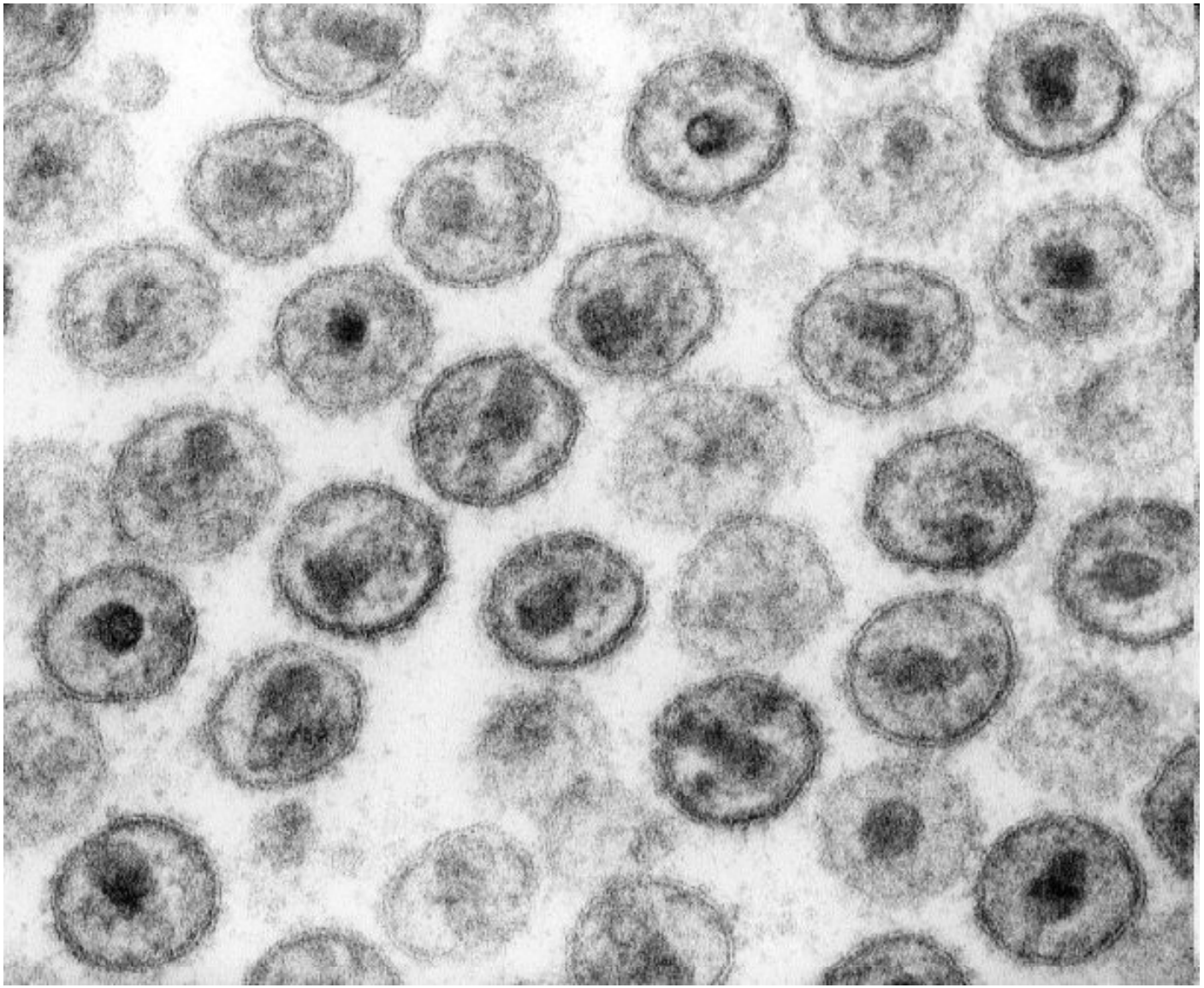
- τις **μεταβολικές οδούς**

ή / και

- τα **δομικά χαρακτηριστικά** (π.χ. κυτταρικό τοίχωμα) αυτών των παθογόνων

είναι χρήσιμες για τη θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων.

- Σήμερα έχουν γίνει σημαντικά βήματα προόδου όσον αφορά το **χημειοθεραπευτικό έλεγχο των ιών**, εξαιτίας κυρίως των προσπαθειών να καταπολεμηθεί ο **ιός του AIDS** (Human Immunodeficiency Virus, **HIV**).



ιοσωμάτια HIV

Αντιικά φάρμακα (antiviral agents)

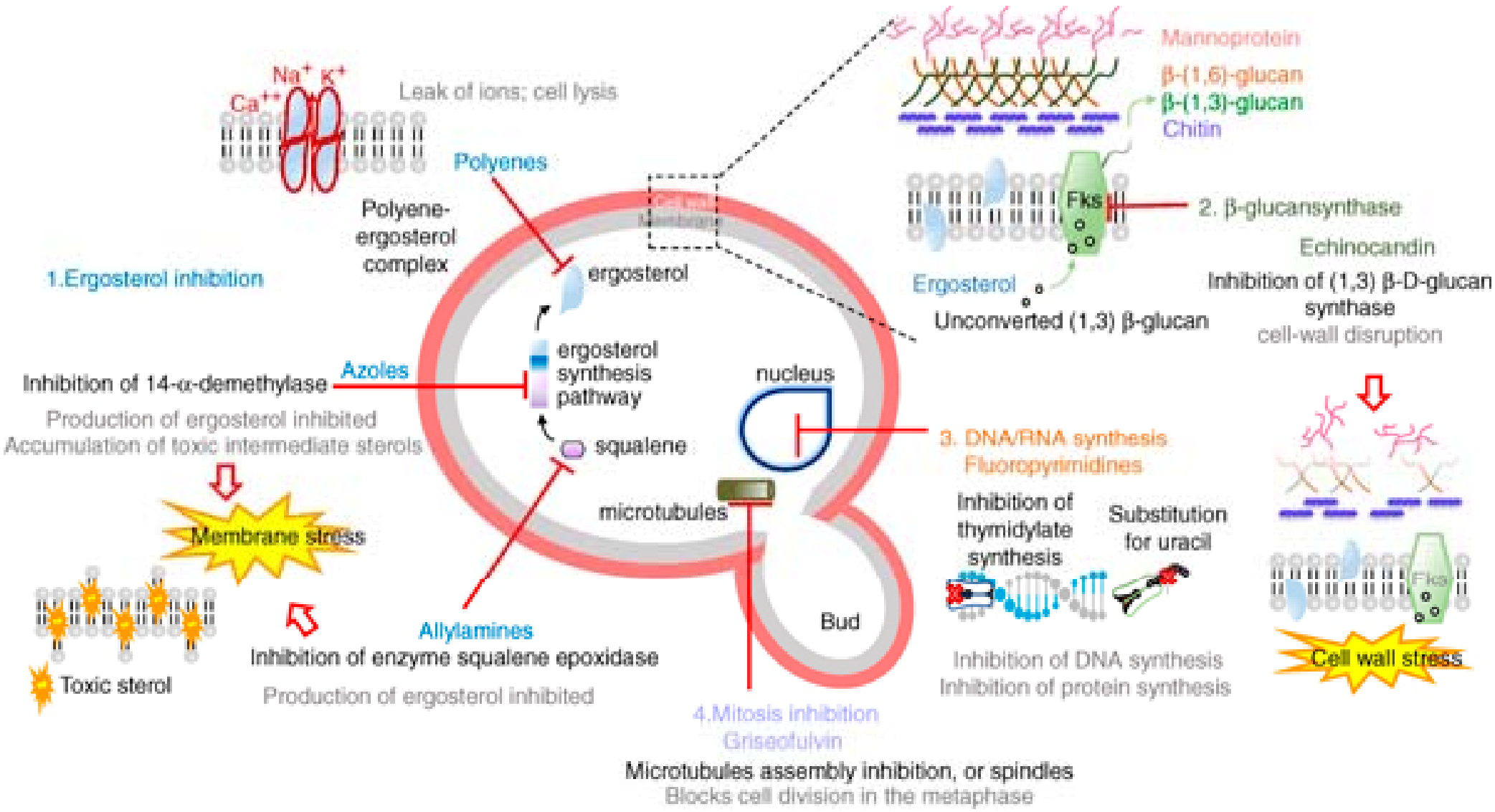
- **Στα κλινικά αποτελεσματικά φάρμακα κατά του ιικού πολλαπλασιασμού συγκαταλέγονται:**

- ✓ **τα ανάλογα νουκλεοσιδίων** (π.χ. αζιδοθυμιδίνη, AZT)
  αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, λέγονται και **αναστολείς της αντίστροφής νουκλεοζιτικής μεταγραφάσης** (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, **NRTI**).

- ✓ **οι αναστολείς πρωτεάσης (protease inhibitors)**
  αναστέλλουν την επεξεργασία των ιικών πολυπεπτιδίων και τη διαδικασία ωρίμανσης του ιού.

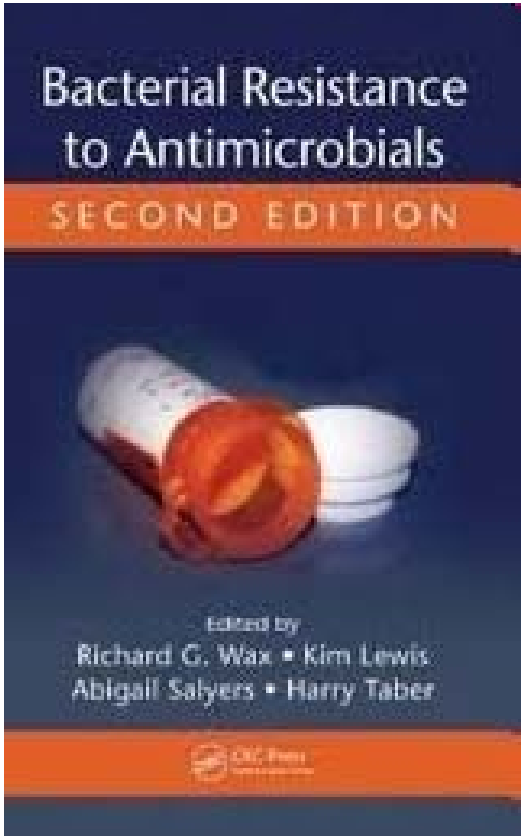
- ✓ **οι ιντερφερόνες (interferons)**
  πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (ΜΒ 17kDa) που παράγονται από πολλά ζωικά κύτταρα ως απόκριση στην ιική μόλυνση. Δεσμεύονται σε υποδοχείς μη-μολυσμένων κυττάρων επάγοντας τη **σύνθεση αντιικών πρωτεϊνών.**

τρόποι δράσης συνηθισμένων αντιμυκητιακών χημειοθεραπευτικών παραγόντων (antifungal agents)



Ανθεκτικότητα μικροοργανισμών σε χημικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες

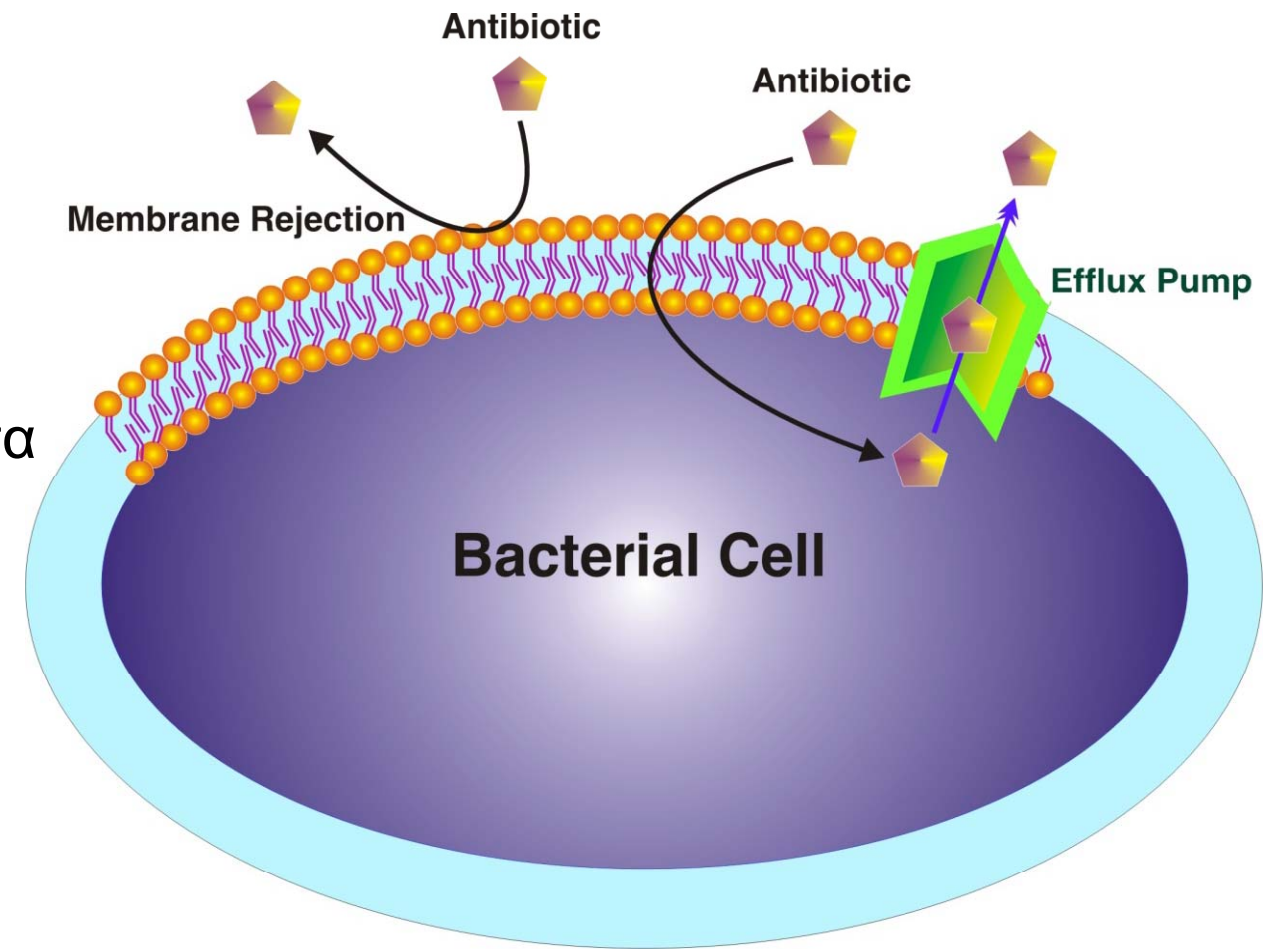
- **Ανθεκτικότητα, αντοχή** ή **αντίσταση** (resistance) είναι η <u>έμφυτη</u> ή <u>επίκτητη</u> ικανότητα ενός μικροοργανισμού να αντιστέκεται στην επιζήμια επίδραση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα.



Μηχανισμοί ανθεκτικότητας μικροοργανισμών σε χημικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες

- **Ένας μικροοργανισμός μπορεί να παρουσιάζει αντοχή σε κάποιο αντιμικροβιακό για τους εξής λόγους:**

- ✓ **μειωμένη διαπερατότητα**
- ✓ εξουδετέρωση του παράγοντα
- ✓ τροποποίηση στόχου
- ✓ ανάπτυξη ανθεκτικής βιοχημικής οδού
- ✓ **εκροή (μέσω αντλιών εκροής, efflux pumps)**



- **Σημαντική παρενέργεια της αλόγιστης χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων (π.χ. αντιβιοτικών) είναι η <u>ανάπτυξη ανθεκτικότητας</u> σε πολλούς μικροοργανισμούς.**

- **Σε πολλές περιπτώσεις η ανθεκτικότητα προκύπτει μέσω:**

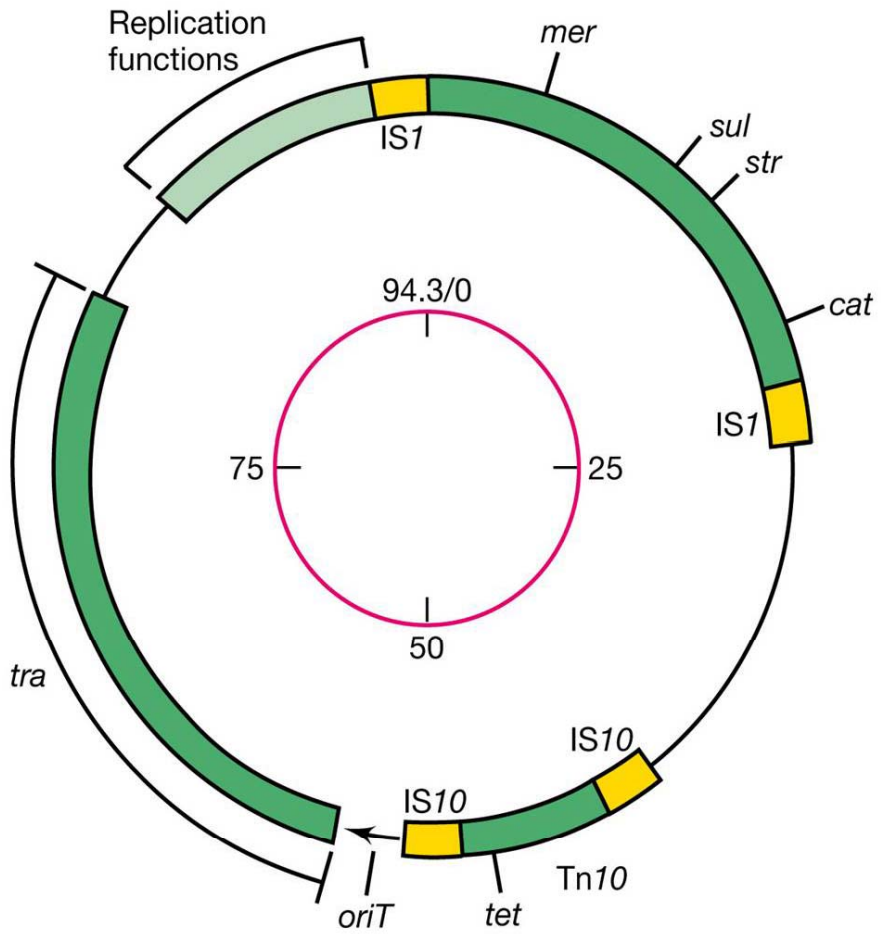
✓ της **προσαρμοστικής επιλογής συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας** (resistance genes)

ή / και

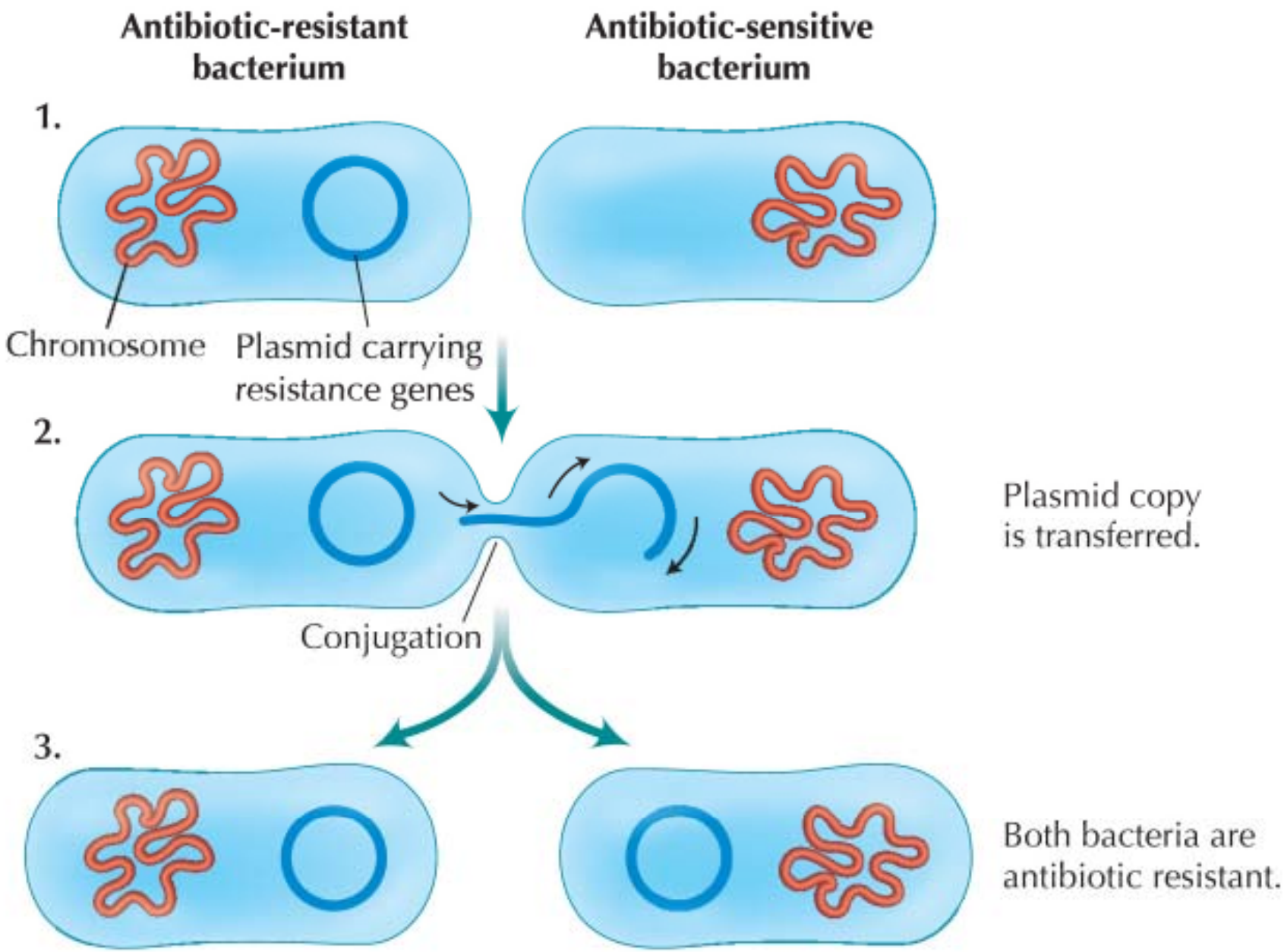
✓ **μεταλλάξεων** ήδη υπαρχόντων χρωμοσωμικών γονιδίων

Πλασμίδια ανθεκτικότητας

- Συχνά τα γονίδια ανθεκτικότητας εντοπίζονται σε πλασμίδια (**πλασμίδια R**) τα οποία μπορεί να μεταφέρονται εύκολα με μηχανισμούς γενετικής ανταλλαγής (π.χ. βακτηριακή σύζευξη).



Το πλασμίδιο ανθεκτικότητας **R100** αποτελούμενο από 94300 bp μπορεί να μεταφέρεται μεταξύ των εντεροβακτηρίων που ανήκουν στα γένη: ***Escherichia***, ***Klebsiella***, ***Proteus***, ***Salmonella*** και ***Shigella***, αλλά δεν μπορεί να μεταφερθεί σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas* για παράδειγμα που δεν είναι εντεροβακτήρια.



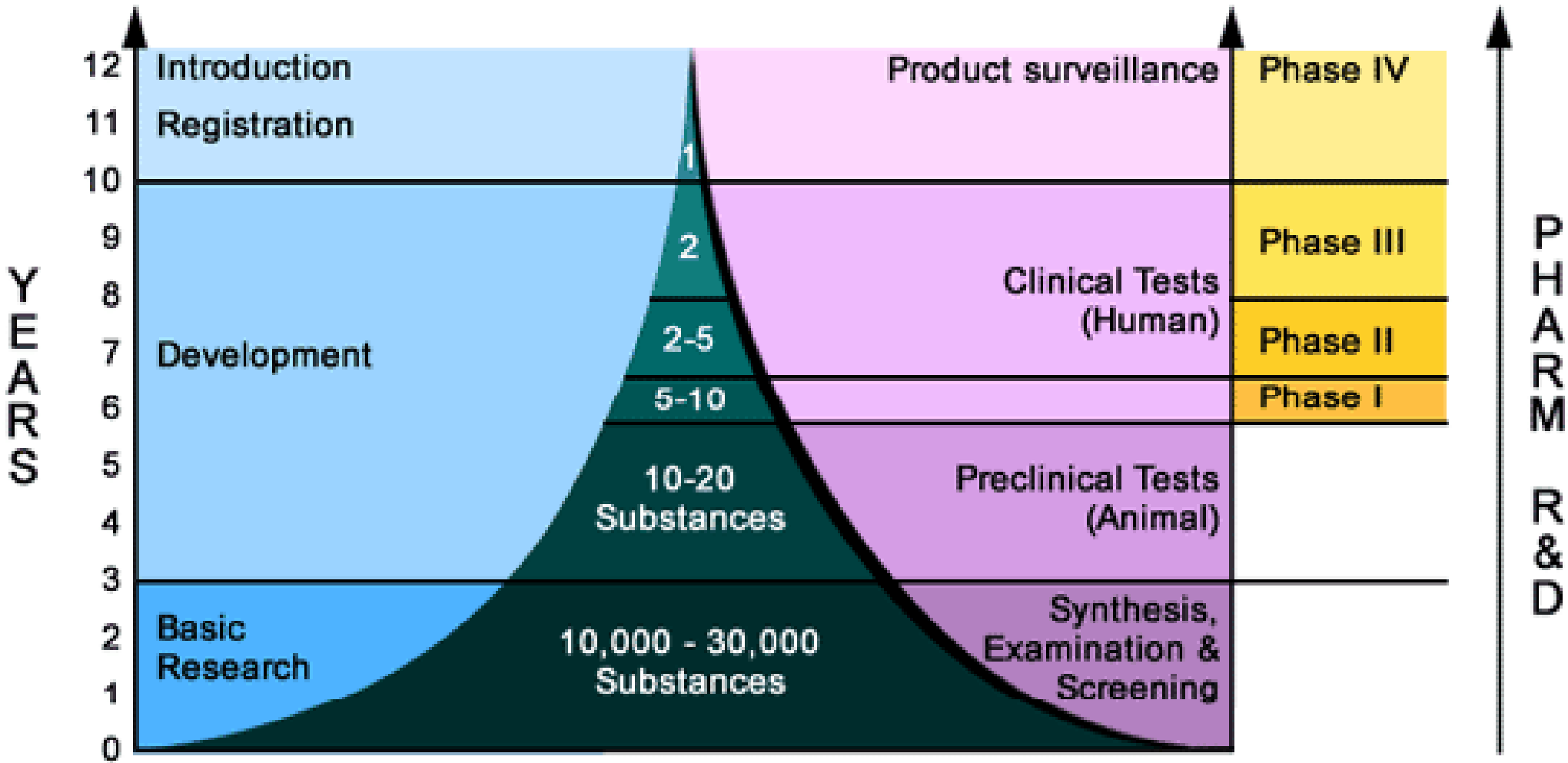
μεταφορά πλασμιδίου ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό από ένα ανθεκτικό στο αντιβιοτικό βακτήριο σ' ένα άλλο ευαίσθητο στο αντιβιοτικό βακτήριο, μέσω σύζευξης

- Η **εκτεταμένη και αλόγιστη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων** διαμορφώνει επιλεκτικές συνθήκες που ευνοούν την εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας, **δημιουργώντας φόβους** ότι θα επιστρέψουμε στην εποχή πριν την ανακάλυψη των χημειοθεραπευτικών παραγόντων (π.χ. αντιβιοτικών).

- Για το λόγο αυτό, **διαρκώς παρασκευάζονται νέες αντιμικροβιακές ουσίες** προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι ανθεκτικοί μικροοργανισμοί και να ενισχυθούν οι δυνατότητες θεραπείας των λοιμώξεων.

- Η ανακάλυψη και παρασκευή νέων φαρμάκων είναι **χρονοβόρος διαδικασία με τεράστιο κόστος**.

✓ 10-25 χρόνια και μέσο κόστος περίπου 500.000.000$ για κάθε νέο φάρμακο!



(χρονοβόρος) πορεία δημιουργίας ενός νέου φαρμάκου