



Ελληνική Δημοκρατία
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό
Ίδρυμα Ηπείρου

Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο

Ενότητα 13: Μη παρασιτικές &
μετασυλλεκτικές ασθένειες και μέθοδοι
εκτίμησης μικροβιακού πληθυσμού

Δρ Δήμητρα Ζωάκη-Μαλισιόβα
Καθηγήτρια Εντομολογίας



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Τμήμα: Τεχνολόγων Γεωπόνων

Τίτλος Μαθήματος: Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο

Ενότητα 13: Μη-παρασιτικές & μετασυλλεκτικές ασθένειες και μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακού πληθυσμού

Όνομα Καθηγητή: Δρ Δήμητρα Ζωάκη-Μαλισιόβα

Βαθμίδα Καθηγητή: Καθηγήτρια

Άρτα, 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

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



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

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Μη-παρασιτικές & μετασυλλεκτικές ασθένειες και μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακού πληθυσμού

Σκοποί ενότητας

- Διάκριση των μη-παρασιτικών ασθενειών.
- Διάκριση των μετασυλλεκτικών ασθενειών.
- Αναφορά έννοιας μυκοτοξινών και ειδών των μυκήτων, που τις παράγουν.
- Ικανότητα μέτρησης μικροβιακών πληθυσμών στο εργαστήριο.

Περιεχόμενα ενότητας

- Μη-παρασιτικές ασθένειες (τροφοπενίες).
- Μετασυλλεκτικές ασθένειες.
- Μυκοτοξίνες.
- Μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακού πληθυσμού.



Μη-παρασιτικές ασθένειες



Ορισμοί

- **Παρασιτικές ασθένειες (ή μεταδοτικές ή μολυσματικές ή βιοτικές):** προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς (μύκητες, βακτήρια, φυτοπλάσματα, φύκη κ.λπ.), φανερόγαμα παράσιτα, ιοί και ιοειδή
- **Μη παρασιτικές ασθένειες (ή μη μεταδοτικές ή αβιοτικές):** προκαλούνται από δυσμενείς για το φυτό φυσικοχημικές συνθήκες περιβάλλοντος ή από γενετικής φύσεως αίτια **χωρίς** τη μεσολάβηση παρασίτου



Αίτια μη-παρασιτικών ασθενειών (1)

- Διαταραχές ανόργανης θρέψης
- Ακραίες τιμές θερμοκρασίας
- Έλλειψη ή περίσσεια εδαφικής υγρασίας
- Έλλειψη οξυγόνου
- Δυσμενείς συνθήκες φωτισμού
- Ακραίες καιρικές συνθήκες (βροχή, άνεμος, χιόνι, ηλεκτρικές εκκενώσεις)
- Τοξική επίδραση φυτοπροστατευτικών προϊόντων
- Μηχανικά τραύματα
- Φυτοτοξικές ουσίες στην ατμόσφαιρα
- Γενετικές ανωμαλίες



Αίτια μη-παρασιτικών ασθενειών (2)

- Φυσικοχημικά αίτια δεν δρουν μεμονωμένα, αλλά σε συνδυασμό και πολλές φορές είναι δύσκολος ο διαχωρισμός της επίδρασης του καθενός
- Βλάβη από μη παρασιτικά αίτια «ανοίγει» το δρόμο στη μόλυνση των φυτών από μικροοργανισμούς, π.χ. αρχική ζημιά σε λεμονιά από παγετό ευνοεί την είσοδο στο παθογόνο *Phoma tracheiphila* (κορυφοξήρα)
- Σημαντικότερες μη-παρασιτικές ασθένειες οι **τροποφενίες**: έλλειψη θρεπτικών στοιχείων



Θρέψη φυτών (1)

- Απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία, για την ομαλή ανάπτυξη των φυτών
 - **C, O, H:** παραλαμβάνονται από τον αέρα
 - **Μακροστοιχεία:** N, P, K, Ca, Mg (παραλαμβάνονται από το έδαφος)
 - **Μικροστοιχεία:** Mn, B, Cu, Zn, Mo, Cl, Fe (απαιτούνται σε ίχνη, δηλαδή σε μικρή ποσότητα)



Θρέψη φυτών (2)

- Για τα θρεπτικά στοιχεία πρέπει:
 - Να υπάρχουν στο έδαφος σε αφομοιώσιμη μορφή και σε αναλογία ανταποκρινόμενη στη φυσιολογία του φυτού
 - Να υφίστανται κατάλληλες περιβαλλοντικές και καλλιεργητικές συνθήκες, για την απορρόφηση και μεταφορά τους από το έδαφος στα φυτικά κύτταρα



Διαταραχές ανόργανης θρέψης

- Επικράτηση ανισορροπίας της σχετικής αναλογίας των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού
- **Τροφοπενίες:** όταν ο εφοδιασμός του φυτού σε ανόργανα θρεπτικά στοιχεία είναι **ανεπαρκής**
- **Τοξικότητες:** όταν ο εφοδιασμός του φυτού σε ανόργανα θρεπτικά στοιχεία είναι **σε περίσσεια**



Παράγοντες που επιδρούν στη διαθεσιμότητα ανόργανης θρέψης

- Αντίδραση pH στο έδαφος
- Οξειδοαναγωγική ικανότητα
- Παρουσία ανόργανων (CO_3 , PO_4 , SO_4) ή οργανικών ουσιών που τα ανόργανα στοιχεία αντιδρούν προς σχηματισμό δυσδιάλυτων ενώσεων
- Παρουσία μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων



Παράγοντες που επιδρούν στη διαθεσιμότητα ανόργανης θρέψης

- Δυσμενείς καιρικές συνθήκες (ξηρασία, έντονο ηλιακό φως, υπερβολική υγρασία, υψηλή θερμοκρασία)
- Μη ορθολογική χρήση λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων
 - Κακή κατεργασία εδάφους
 - Παρασιτικές προσβολές
 - Χρήση ποικιλιών υψηλών αποδόσεων



Διάγνωση διαταραχών ανόργανης θρέψης

- Μακροσκοπική παρατήρηση συμπτωμάτων
- Έλεγχος της αντίδρασης των φυτών στη χορήγηση θρεπτικών στοιχείων
- Χημική ανάλυση εδάφους και φυτικών ιστών
 - Κυρίως φύλλων (**φυλλοδιαγνωστική**), γιατί τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία συσσωρεύονται κυρίως στα φύλλα



Παραδείγματα μη-παρασιτικών ασθενειών

- **Τροφοπενίες εσπεριδοειδών**
 - Σχετικά εύκολη διάγνωση, λόγω της «τυποποιημένης» εμφάνισης των ειδικών συμπτωμάτων τους στα φύλλα

Τροφοπενία Fe



Εμφανίζεται στα νεαρά φύλλα της κορυφής των βλαστών, τα οποία παρουσιάζουν λεπτό δίκτυο πράσινων νευρώσεων εντός κίτρινου ελάσματος





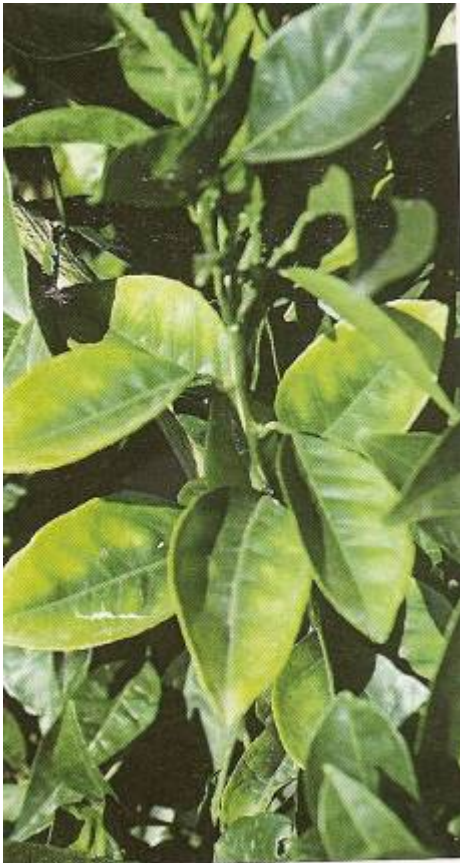
Τροφοπενία Ζη



Μικρά νεαρά φύλλα με ανορθωμένο έλασμα και εμφανίζουν μεσονεύρια χλώρωση («ψαροκόκκαλο»)



Τροφοπενία Mg



Στα παλαιότερα φύλλα, χλώρωση στο μεγαλύτερο μέρος του ελάσματος εκτός μίας περιοχής στη βάση του ελάσματος που παραμένει πράσινη («Σχήμα βέλους ή ανεστραμμένου V»)

Τροφοπενία Μη



Μεσονεύρια χλώρωση ακανόνιστου σχήματος (τα νεύρα και μία περιοχή γύρω από αυτά παραμένει πράσινη)



Μετασυλλεκτικές ασθένειες



Μετασυλλεκτικές ασθένειες (1)

- Καλούνται εκείνες που αναπτύσσονται και προκαλούν ζημιές κατά τη συγκομιδή, ταξινόμηση, συσκευασία, μεταφορά στην αποθήκη, αποθήκευση, μεταφορά πάλι για διάθεση και μέχρι την κατανάλωση
- Αναφέρεται ο όρος «ασθένεια», γιατί τα συγκομιζόμενα φυτικά προϊόντα αποτελούνται από ζωντανούς ιστούς
- Οι φυτικοί ιστοί των συγκομιζόμενων γεωργικών προϊόντων διαθέτουν μηχανισμούς αντοχής (έστω και μειωμένης) στα παθογόνα αίτια



Μετασυλλεκτικές ασθένειες (2)

- Αν και αυτές οι ασθένειες νοείται ότι αναπτύσσονται κυρίως μετά τη συγκομιδή, ωστόσο τα πρώτα στάδια (π.χ. μόλυνση ή πρώτη ανάπτυξη του παθογόνου μέσα στους ιστούς) της ασθένειας μπορεί να έχουν πραγματοποιηθεί στον αγρό
- **Αποφυγή δημιουργίας πληγών** κατά τους χειρισμούς βοηθά αρκετά στη μείωση εμφάνισης μετασυλλεκτικών προσβολών



Αίτια μετασυλλεκτικών ασθενειών

- Μετά τη συγκομιδή, τα νωπά φυτικά προϊόντα υπόκεινται σε ανεπιθύμητες αλλοιώσεις
- **Φυσικά αίτια:** για παράδειγμα οι ακατάλληλες θερμοκρασίες, η απουσία οξυγόνου κ.λπ.
- **Παρασιτικά αίτια:** μύκητες και βακτήρια
- **Φυσιολογικά αίτια:** για παράδειγμα η δράση ενζύμων του ιδίου του ιστού



Συμπτώματα μετασυλλεκτικών ασθενειών

- Μεταχρωματισμοί
- Εκκρίσεις
- Κηλίδες
- Υπερτροφίες
- Νεκρώσεις
- Ατροφίες
- Σήψεις
- Παραμορφώσεις
- Μαρασμός
- Πτώσεις οργάνων



Τρόπος αντιμετώπισης: Ψύξη (1)

- Συντομότερη τοποθέτηση συγκομιζόμενων γεωργικών προϊόντων στην πιο χαμηλή θερμοκρασία κατά την οποία, ανάλογα με το προϊόν, δεν έχει δυσμενή επίδραση σε αυτό
- Αν και δεν είναι πάντα εφικτό, δεν μάς εξασφαλίζει απόλυτα από τις μετασυλλεκτικές ασθένειες, γιατί:
 - Οι τρέχουσες συνθήκες εμπορίας εκθέτουν το ακατέργαστο προϊόν σε συνθήκες περιβάλλοντος λίγο πριν την κατανάλωση
 - Στις χαμηλές θερμοκρασίες ίσως απουσία συμπτωμάτων, όταν εκτεθούν όμως για λίγες ώρες στη θερμοκρασία περιβάλλοντος μπορεί να αλλοιωθούν ολοκληρωτικά



Τρόπος αντιμετώπισης: Ψύξη

- Αν και δεν είναι πάντα εφικτό, δεν μάς εξασφαλίζει απόλυτα από τις μετασυλλεκτικές ασθένειες, γιατί:
 - Μερικά προϊόντα (π.χ. λεμόνια) δεν αντέχουν στις χαμηλές θερμοκρασίες
 - Προϊόντα (π.χ. μήλα, σταφύλια) αντέχουν στους 0-2°C (δεν επιτρέπεται ανάπτυξη μυκήτων), αλλά μπορεί να παραμείνουν για μήνες και έτσι κάποιοι μύκητες (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*) να αναπτύσσονται έστω και με βραδύ ρυθμό και να προκαλέσουν σημαντικές ζημιές



Παθογόνα

μετασυλλεκτικών ασθενειών

- **Παράσιτα πληγών:** εισέρχονται σε καρπούς μέσω πληγών που υπάρχουν στο φλοιό τους (π. χ. *Alternaria* spp, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia nigricans*)
- **Παράσιτα φυσιολογικής διείσδυσης:** αποικίζουν τους καρπούς μέσω των φυσικών ανοιγμάτων, όπως φακίδια, ποδίσκος κ.ά. (π. χ. *Botrytis cinerea*, *Gloeosporium album*, *Trichothecium roseum*)
- **Παράσιτα ενεργού διείσδυσης:** δύνανται να «τρυπήσουν» την επιδερμίδα των καρπών με μηχανικό ή ενζυματικό τρόπο



Σημαντικότερα παθογόνα μετασυλλεκτικών ασθενειών

- **Δευτερομύκητες:** *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus*
- **Ωομύκητες:** *Pythium*, *Phytophthora*
- **Ζυγομύκητες:** *Rhizopus*, *Mucor*
- **Ασκομύκητες:** *Venturia* (ατελής μορφή *Fusicladium*)
- **Βακτήρια:** *Erwinia*, *Pseudomonas*

Μερικά από τα παραπάνω παθογόνα δύνανται να προκαλέσουν σημαντικές ζημιές και στον αγρό (π.χ. *Botrytis cinerea* στα σταφύλια)

Alternaria

- Καστανόμαυρες σήψεις (και προσυλλεκτικά)
- Είσοδος παθογόνου μέσω πληγών, φυσικών ανοιγμάτων, απευθείας διάτρηση



Alternaria Rot





Fusarium



Figure 1.



Figure 2.



Figure 3.



Figure 4.

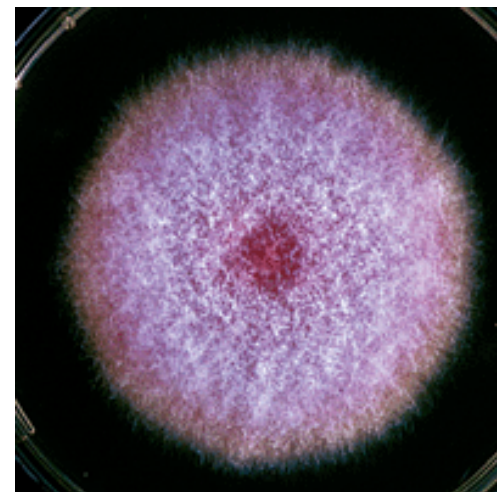


Figure 5.



Figure 6.

- Ροζ ή κίτρινες κηλιδώσεις σε λαχανικά
- Μόλυνση πριν τη συγκομιδή, αλλά ορατά συμπτώματα στην αποθήκη
- Γνωστή ως **ξηρή σήψη κονδύλων πατάτας**





Botrytis



- Γκριζοκάστανες σήψεις
- Προσβάλλει σχεδόν όλους τους νωπούς καρπούς (αχλάδια, μήλα, σταφύλια), λαχανικά (τομάτα, αγγούρι, μαρούλι) και βολβούς (κρεμμύδι, καρότο, σκόρδο)

Geotrichum

- Ξινή σήψη σε καρπούς εσπεριδοειδών και διάφορα λαχανικά (τομάτα, καρότο κ.ά.
- Σχίσσιμο φλοιού με αποκάλυψη λευκού-χνουδωτού μυκηλίου



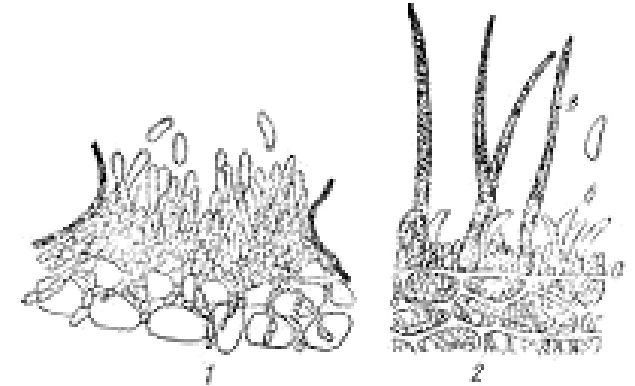
Sclerotinia



- Μαλακές και υδαρείς σήψεις σε λεμόνια, λαχανικά
- Λευκό βαμβακώδες μυκήλιο

Gloeosporium

- Φακιδιακή σήψη, κυρίως στα μήλα



Rhizopus

- Μαύρη σήψη σε λαχανικά
- Λευκή εξάνθιση με μαύρες καρποφορίες



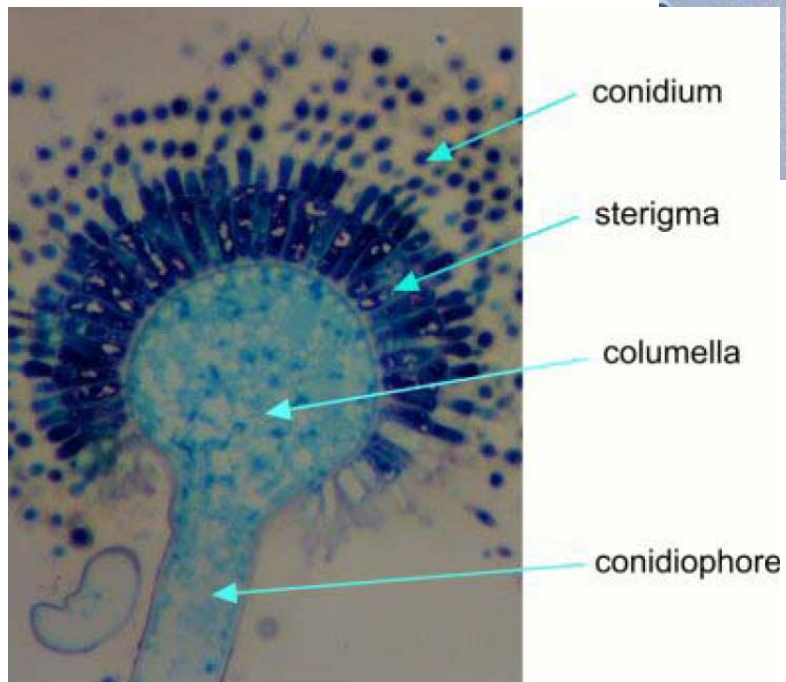
Aspergillus (1)

- Μετασυλλεκτικές σήψεις σπόρων σιτηρών & ψυχανθών
- Μεταχρωματισμός, θάνατος εμβρύου, παραγωγή μυκοτοξινών





Aspergillus (2)





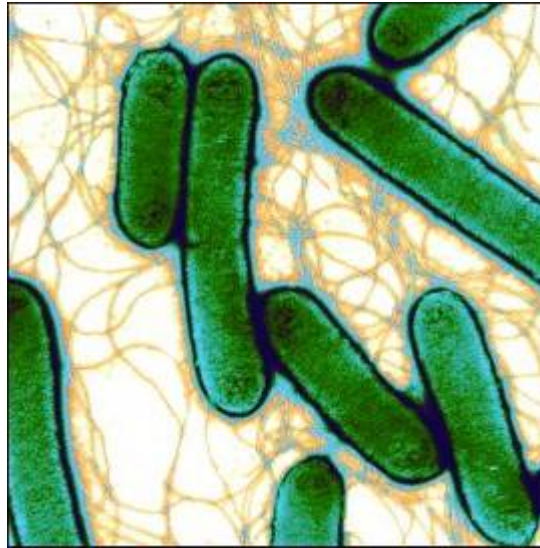
Υγρές βακτηριακές σήψεις

- Βακτηριακά γένη: *Erwinia* & *Pseudomonas*
- Προσβολή ξεκινά από τον αγρό
- Προσβολή εκδηλώνεται με **μικρές υδατώδεις κηλίδες**, που μεγαλώνουν γρήγορα
- Προσβεβλημένοι ιστοί καθίστανται υδαρείς και πολτώδεις
- Προσβάλλονται σχεδόν **όλα τα κηπευτικά**
- Διασπορά βακτηριακών κυττάρων με τα εργαλεία, ρούχα, προσβεβλημένο φυτικό ιστό

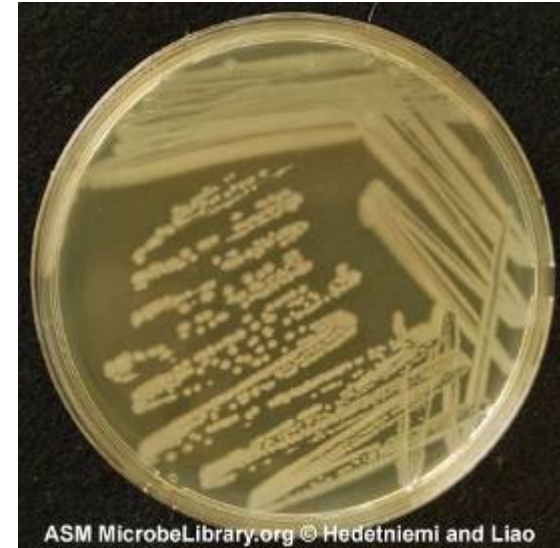


Υγρές βακτηριακές σήψεις

πατάτα



Erwinia



Καθαρή καλλιέργεια
Pseudomonas



Μυκοτοξίνες

Μυκοτοξίνες (1)

- Τοξικές ουσίες, που παράγονται από μύκητες και προκαλούν **μυκοτοξινώσεις**
- Πρόκληση δηλητηριάσεων μετά από κατανάλωση προσβεβλημένων προϊόντων από ορισμένους μύκητες
- Ανίχνευση μυκοτοξινών σε αποθηκευμένα προϊόντα είναι συχνή, αλλά τις περισσότερες φορές δεν ξεπερνά τα επιτρεπόμενα όρια
- Σημαντικοί μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*



Μυκοτοξίνες (2)

- **Αφλατοξίνες:** Παράγονται από τους *Aspergillus*; ανιχνεύονται σε σπόρους σιτηρών και οσπρίων σε χαμηλές συνήθως συγκεντρώσεις (<50ppb)
- Μυκοτοξίνες φουζαρίου (π.χ. **φουμονισίνες, τριχοθηκίνες, ζεαραλόνη**): κυρίως σε αραβόσιτο
- Μυκοτοξίνες πενικιλλίου (π.χ. **πατουλίνη**): κυρίως σε ρύζι, μήλα



Μετασυλλεκτικές διαταραχές στη φυσιολογία του προϊόντος (1)

- «Αλλοιώσεις», **αποκλίσεις** δηλαδή από από την κανονική κατάσταση ποιότητας ως προς την **εμφάνιση, χρώμα, οργανοληπτικά**) του προϊόντος
- Μπορεί να οφείλονται:
 - **Περιβαλλοντικοί Παράγοντες:** θερμοκρασία, υγρασία, φωτισμός
 - **Προ-συλλεκτικοί χειρισμοί:** λίπανση, κλάδευμα, άρδευση

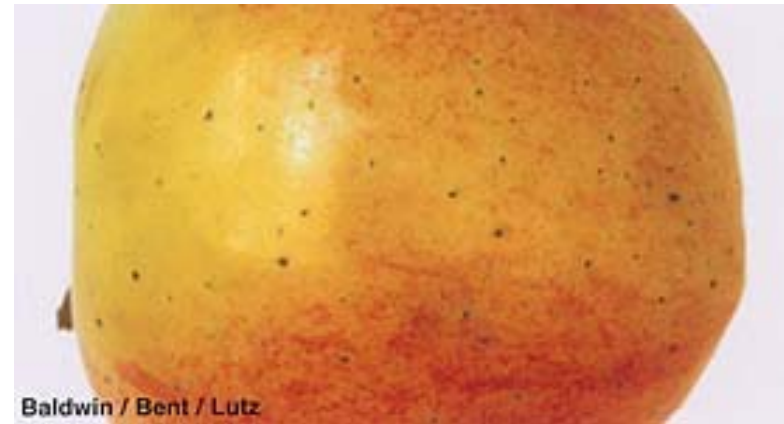


Μετασυλλεκτικές διαταραχές στη φυσιολογία του προϊόντος (2)

- Κατηγορίες καταπονήσεων
 - **Θερμική:** επίδραση υψηλών θερμοκρασιών, ζημιές από παγετό
 - **Ατμοσφαιρική:** μειωμένο O_2 , αυξημένο CO_2 , παρουσία αιθυλενίου
 - **Θρεπτική:** έλλειψη θρεπτικών στοιχείων
 - **Χημική:** διαφυγή αμμωνίας, διφαινυλαμίνη
 - **Άγνωστα αίτια:** εξωτερικές & εσωτερικές αλλοιώσεις καρπών

Μετασυλλεκτικές διαταραχές στη φυσιολογία του προϊόντος (3)

Ζημιά από φρέον



Ζημιά από χλωριούχο ασβέστιο

Ζημιά από αμμωνία





Μετασυλλεκτικές διαταραχές στη φυσιολογία του προϊόντος (4)



Υδαρής σήψη: οι εσωτερικοί χιτώνες παρουσιάζουν αλλοιωμένο χρώμα και κηλίδες, λόγω χαμηλών θερμοκρασιών και κακών συνθηκών αποθήκευσης



Μαύρη καρδιά: έντονη αναπνοή και το οξυγόνο δεν εισδύει στο κέντρο του κονδύλου



Μετασυλλεκτικές διαταραχές στη φυσιολογία του προϊόντος (5)



Επιφανειακό έγκαυμα: «ζεμάτισμα» επιδερμίδας του καρπού (π.χ. υψηλή θερμοκρασία και χαμηλή σχετική υγρασία), η οποία καφετιάζει

Πικρή κηλίδωση: «βρεγμένη» επιδερμίδα αρχικά, καστανή μεταγενέστερα. Κηλίδες ελαφρώς βυθισμένες (ίσως λόγω χαμηλής συγκέντρωσης Ca)





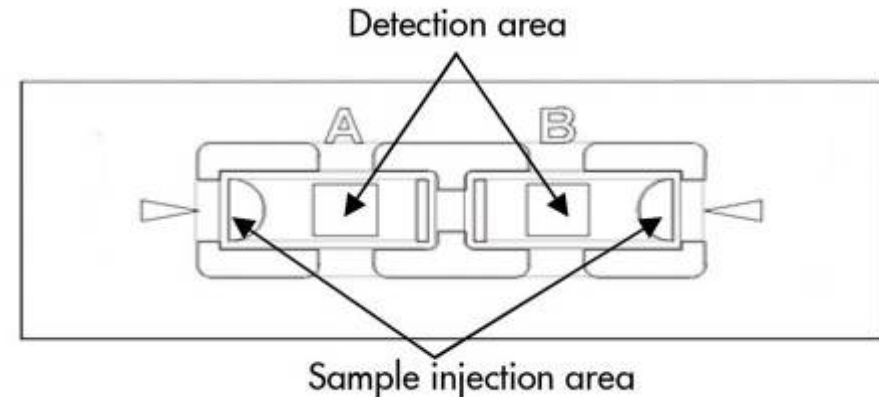
Μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακού πληθυσμού



Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

ΑΜΕΣΟΙ μέθοδοι μέτρησης (1)

- Μικροσκοπική μέτρηση των μικροβιακών κυττάρων
 - Χρήση του αιματοκυττόμετρου ή αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer ή Petroff-Hausser
 - Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων (ζωντανά & νεκρά) στην καλλιέργεια





Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

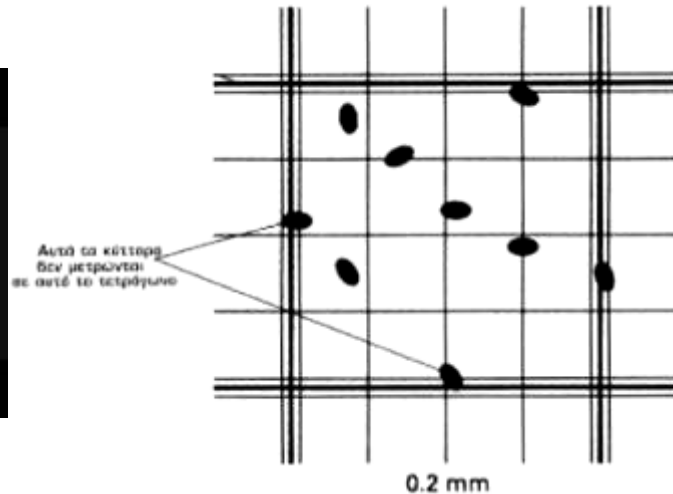
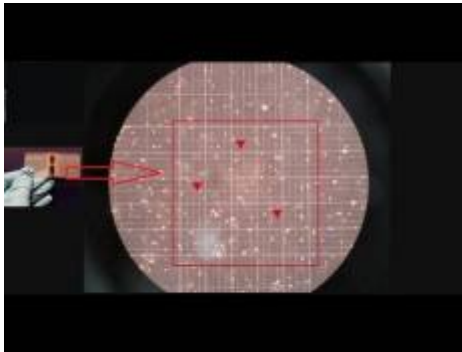
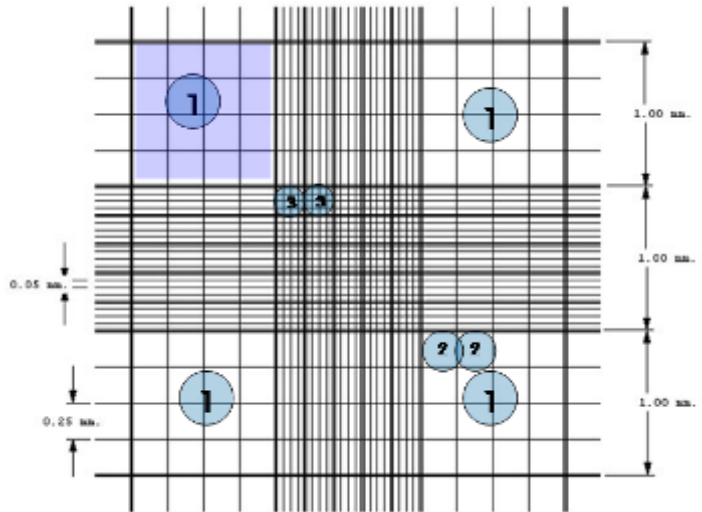
ΑΜΕΣΟΙ μέθοδοι μέτρησης (1)

- **Μικροσκοπική μέτρηση των μικροβιακών κυττάρων**
 - Αιματοκυτταρόμετρο είναι αντικειμενοφόρος πλάκα, που φέρει πλέγμα από χαραγές και από πάνω τοποθετείται ειδική καλυπτρίδα, ώστε μεταξύ πλάκας και οι χαραγών να δημιουργούν “διαμερίσματα” συγκεκριμένου όγκου
 - Τοποθέτηση σταγόνας υγρής μικροβιακής καλλιέργειας τοποθετείται στο κέντρο της πλάκας και από πάνω στερεώνεται η καλυπτρίδα και έτσι «παγιδεύεται» συγκεκριμένος (γνωστός) όγκος καλλιέργειας
 - Μικροσκοπική παρατήρηση & καταμέτρηση κυττάρων , ώστε με τις κατάλληλες αριθμητικές αναγωγής να προσδιοριστεί ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων της αρχικής καλλιέργειας



Αιματοκυττόμετρο Neubauer (1)

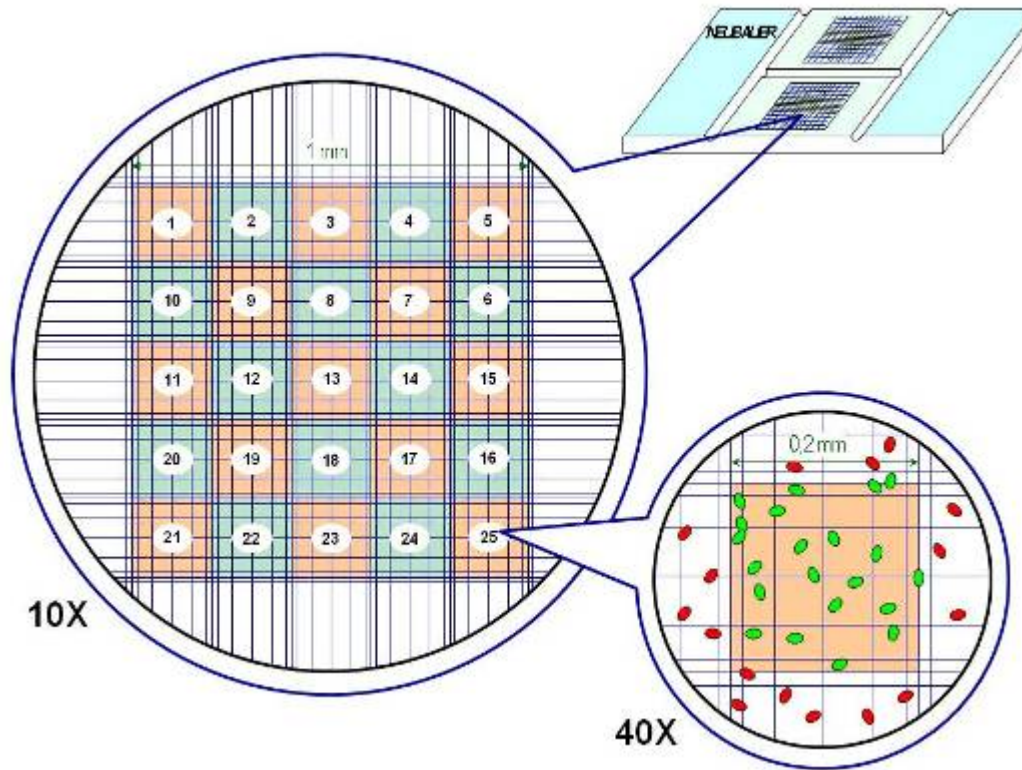
οπτικό πεδίο στο μικροσκόπιο



- **Τετράγωνο 1:** $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$ (επιφάνεια) και $1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$ (όγκος)
- Συγκέντρωση καλλιέργειας: σύνολο κυττάρων που μετρήθηκαν $\times 10.000$
- **Τετράγωνο 2:** $0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm} = 0,0625 \text{ mm}^2$ (επιφάνεια) και $0,0625 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 6,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 = 6,25 \times 10^{-6} \text{ mL}$
- Συγκέντρωση καλλιέργειας: σύνολο κυττάρων που μετρήθηκαν $\times 160.000$



Αιματοκυττόμετρο Neubauer (2) οπτικό πεδίο στο μικροσκόπιο





Αιματοκυττόμετρο Neubauer (3)

Μειονεκτήματα

- Απουσία διαχωρισμού νεκρών-ζωντανών κυττάρων
- Μικρού μεγέθους κύτταρα δεν είναι ευδιάκριτα
- Απαιτείται μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, όταν τα κύτταρα δεν είναι βαμμένα
- Κύτταρα που κινούνται είναι δύσκολο να μετρηθούν
- Σε αραιές καλλιέργειες (π.χ. λιγότερο από 10^6 κύτταρα/mL) δεν ενδείκνυται ως μέθοδος



Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

ΑΜΕΣΟΙ μέθοδοι μέτρησης (2)

- **Εκτίμηση αριθμού βιώσιμων κυττάρων (δείκτης βιωσιμότητας)**
 - Μέτρηση αριθμού κυττάρων, τα οποία είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν και να δώσουν νέα θυγατρικά κύτταρα
 - **Μέθοδος:** μέτρηση μόνο των κυττάρων, που σχηματίζουν αποικίες σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό
 - **Παραδοχή μεθόδου:** κάθε βιώσιμο κύτταρο μπορεί να δώσει μία αποικία
 - **Τρόποι εφαρμογής μεθόδου:** α) με επίστρωση του υγρού δείγματος (εμβολίου) στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού, β) με ενσωμάτωση του υγρού δείγματος (εμβολίου) στη μάζα του στερεού θρεπτικού υλικού



Εκτίμηση αριθμού βιώσιμων κυττάρων

Μέθοδος υγρής επίστρωσης σε τρυβλίο



Το δείγμα (0,1 ml ή λιγότερο)
ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια
τρυβλίου με άγαρ



Ομοιόμορφη διασπορά του
δείγματος στην επιφάνεια
του άγαρ με τη βοήθεια
αστεριωμένου διανομέα



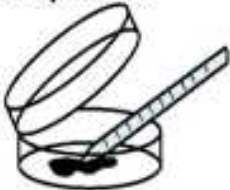
Επώση



Αποικίες στην
επιφάνεια

Τυπικό αποτέλεσμα
της χρήσης της μεθόδου

Μέθοδος αραιώσης του εμβολίου



Το δείγμα τοποθετείται σε
αστεριωμένο τρυβλίο



Προσθήκη αστεριωμένου
θρεπτικού υλικού και καλή
ανάμειξη με το εμβόλιο



Επώση



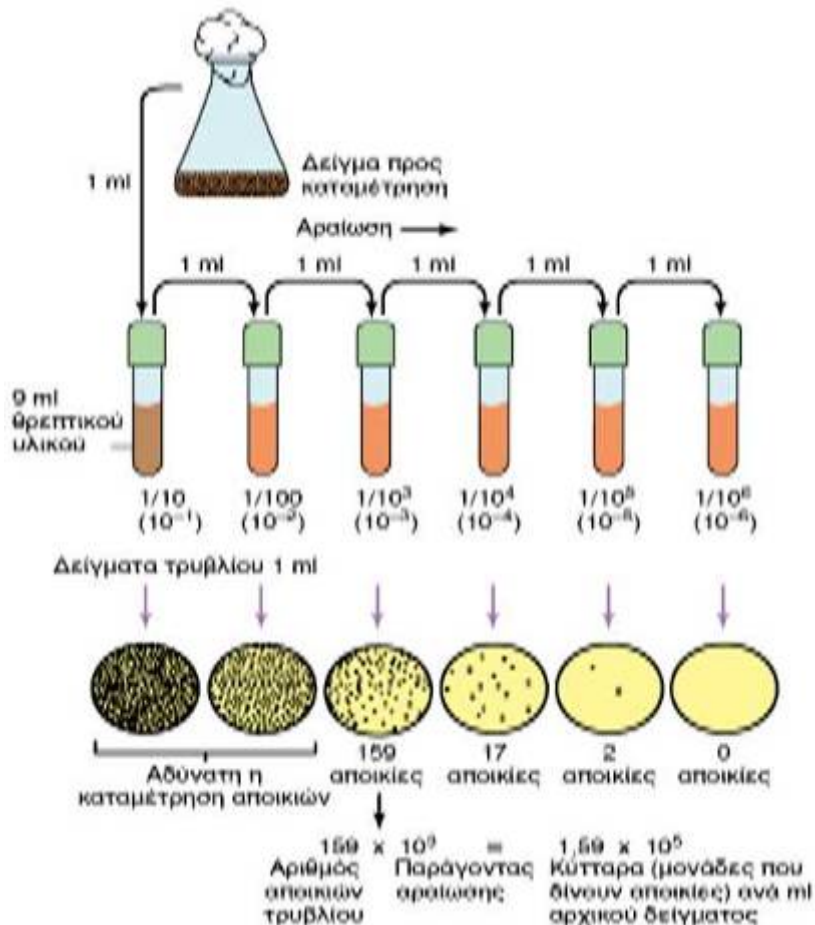
Αποικίες
στην
επιφάνεια

Αποικίες στο
εσωτερικό του
θρεπτικού υλικού

Τυπικό αποτέλεσμα
της χρήσης της μεθόδου



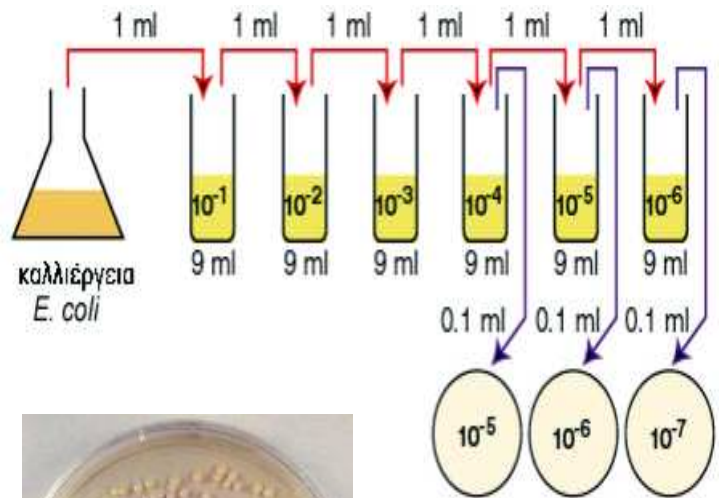
Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων



- Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων (υγρές καλλιέργειες)
- Παράγοντας αραίωσης είναι το **αντίστροφο** της αραίωσης και κατά την επίστρωση στο τρυβλίο (διασπορά κυττάρων) ίσως γίνει επιπλέον αραίωση
- **Μειονεκτήματα:** Πιθανά στατιστικά σφάλματα, όχι γρήγορη, «δυσκολία/ ανωμαλία» καταμέτρησης επί τρυβλίου
- **Πλεονεκτήματα:** ευρεία εφαρμογή, υψηλή ευαισθησία, ευχέρεια επιλεκτικής μέτρησης μικροβιακών ομάδων



Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων



αποικίες

- Όταν είναι πολύ υψηλός ο μικροβιακός πληθυσμός, ώστε να είναι μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών, και έτσι απαιτείται πρώτα να αραιωθεί αρκετά η καλλιέργεια
- Διαδοχικές (συνήθως δεκαδικές) αραιώσεις από την αρχική καλλιέργεια, ώστε τελικά να περιέχονται μόνο 30-300 κύτταρα (αξιόπιστες μετρήσεις στατιστικά και να μπορούν παράλληλα οι αποικίες στο τρυβλίο να μετρηθούν) στο 0.1 mL ή στο 1 mL, που θα χρησιμοποιηθεί για τον εμβολιασμό του στερεού υλικού
- Τελικός εμβολιασμός των τρυβλίων γίνεται είτε με επίστρωση (συνήθως 0,1 mL εμβόλιο), είτε με ενσωμάτωση (συνήθως 1 mL εμβόλιο)
- Ακολουθεί επώαση για 1-2 ημέρες σε κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και σχηματισμού αποικιών
- Μέτρηση αποικιών στο τρυβλίο και με τις κατάλληλες αναγωγές υπολογίζεται ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων που υπήρχαν σε ένα mL της αρχικής καλλιέργειας



Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

ΑΜΕΣΟΙ μέθοδοι μέτρησης (4)



- **Μέθοδος ηθμομεμβράνης (διήθηση):** διήθηση δείγματος μέσω μεμβράνης (ηθμός ή φίλτρο) αποστειρωμένης, η οποία έχει αρκετά μικρούς σε μέγεθος πόρους (συνήθως $0.45 \mu\text{m}$), ώστε να συγκρατεί τα μικροβιακά κύτταρα
- Τοποθέτηση μεμβράνης επί κατάλληλου στερεού θρεπτικού υλικού
- Τα κύτταρα που έχουν συγκρατηθεί στη μεμβράνη, αφού επωασθούν σχηματίζουν αποικίες και καταμετρούνται



Μέθοδος ηθμομεμβράνης (διήθηση)

Πλεονεκτήματα

- Επιτρέπει την εξέταση μεγάλου όγκου δείγματος
- Αρκετά γρήγορη και οικονομική
- Αρκετά αποτελεσματική για τη μέτρηση μικροβιακών κυττάρων σε δείγματα με μικρό αριθμό τους

Μειονεκτήματα

- Δεν εφαρμόζεται σε δείγματα υψηλού ιξώδους, λόγω του ότι η μεμβράνη φράζει εύκολα
- Δε εφαρμόζεται σε δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα και φαινολικές ουσίες, διότι οι ουσίες αυτές συγκρατούνται από τη μεμβράνη και η αυξημένη συγκέντρωσή τους παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών



Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

ΕΜΜΕΣΟΙ μέθοδοι μέτρησης (1)

- **Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων**
 - Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (απορρόφησης) του εναιωρήματος καλλιέργειας με τη χρήση του φωτομέτρου ή φασματοφωτομέτρου
 - Σε μονοκύτταρους μικροοργανισμούς, η απορρόφηση είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων
 - Απαιτείται η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης, που να συσχετίζει μια άμεση μέτρηση του αριθμού των κυττάρων (μικροσκοπική ή δείκτη βιωσιμότητας) με την έμμεση μέτρηση (θολερότητα)



Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων



- **A.** Υγρή καλλιέργεια βακτηρίου («θολερός» σωλήνας), στην οποία είχε εμβολιασθεί στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό και έχει αναπτυχθεί μετά από 2 ημέρες επώασης στις κατάλληλες συνθήκες
- **B.** Θρεπτικό υλικό που δεν έχει εμβολιασθεί κάποιος μικροοργανισμός και έτσι παραμένει διαυγές



Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων



- Μικροβιακά κύτταρα υγρής καλλιέργειας έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν «φράγμα» στη διέλευση των ακτινών του φωτός που διαπερνά το υλικό και να τις ανακλούν
- Έτσι υφίσταται εμφάνιση θολότητας στο υγρό υλικό, όταν ο αριθμός των κυττάρων είναι αρκετά μεγάλος
- Εντός ορισμένων ορίων, μετρώντας αυτή τη θολότητα (ήτοι, την απορρόφηση φωτός) στην υγρή καλλιέργεια, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων της μιας και είναι ανάλογη (η απορρόφηση) του αριθμού των κυττάρων που περιέχονται στο εναιώρημα
- Όργανο μέτρησης θολότητας: φωτόμετρο ή φασματοφωτόμετρο ή σπεκτοφωτόμετρο



Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων



- **Αρχή λειτουργίας:** το ποσοστό του φωτός που απορροφάται, καθώς αυτό περνάει μέσα από ένα μέσο
- Ποσότητα της υγρής καλλιέργειας τοποθετείται σε ένα ειδικό σωλήνα (κιβέτα) και πηγή φωτός στο φωτόμετρο εκπέμπει ακτίνες φωτός, οι οποίες κατευθύνονται και διαπερνάνε τη μικροβιακή καλλιέργεια στην κυβέτα
- Μέρος αυτών των ακτίνων δεν καταφέρνουν να διαπεράσουν το δείγμα γιατί απορροφώνται από τα μικροβιακά κύτταρα (απορρόφηση A, Absorbance), ενώ οι ακτίνες που καταφέρνουν να διαπεράσουν το δείγμα καταγράφονται από το όργανο και εκφράζουν τη διαπερατότητα (Transmittance T) του δείγματος

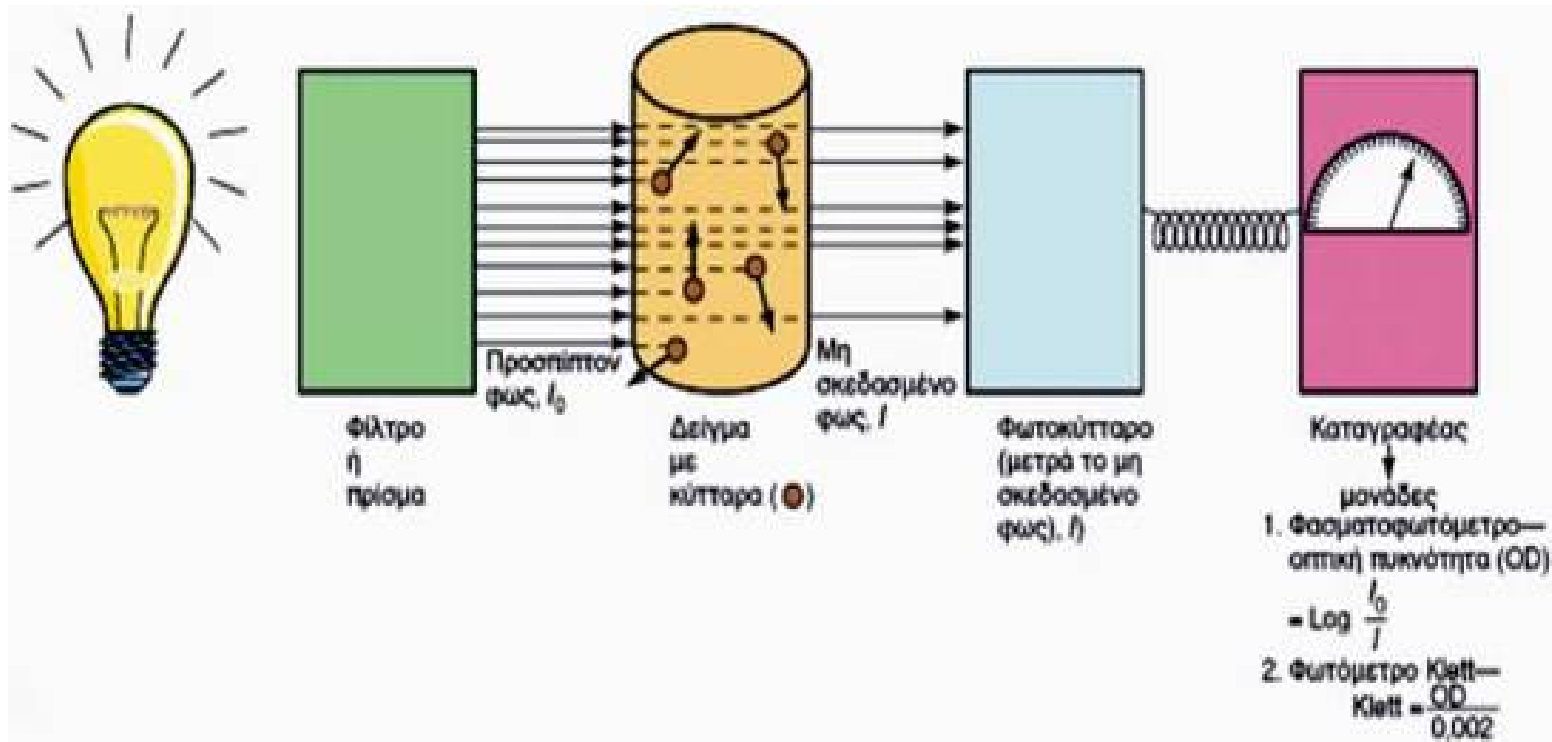


Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων

- **Αρχή λειτουργίας:** στο φωτόμετρο εμφανίζονται οι ενδείξεις T & A (λέγεται και **οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD)**); Όσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν στο δείγμα, τόσο περισσότερο φως παγιδεύεται από τα κύτταρα με αποτέλεσμα η τιμή της απορρόφησης που δείχνει η συσκευή να αυξάνει (ενώ η τιμή της διαπερατότητας μειώνεται)
- Φίλτρο επιτρέπει μόνο στις ακτίνες συγκεκριμένου μήκους κύματος να κατευθυνθεί στο δείγμα
- Στην περίπτωση που επιθυμείται η μέτρηση της θολότητας σε μια υγρή μικροβιακή καλλιέργεια, το μήκος κύματος που επιλέγεται είναι τα **600 nm** γιατί σε αυτό το μήκος κύματος παρατηρείται το μέγιστο της απορρόφησης των κυττάρων



Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων



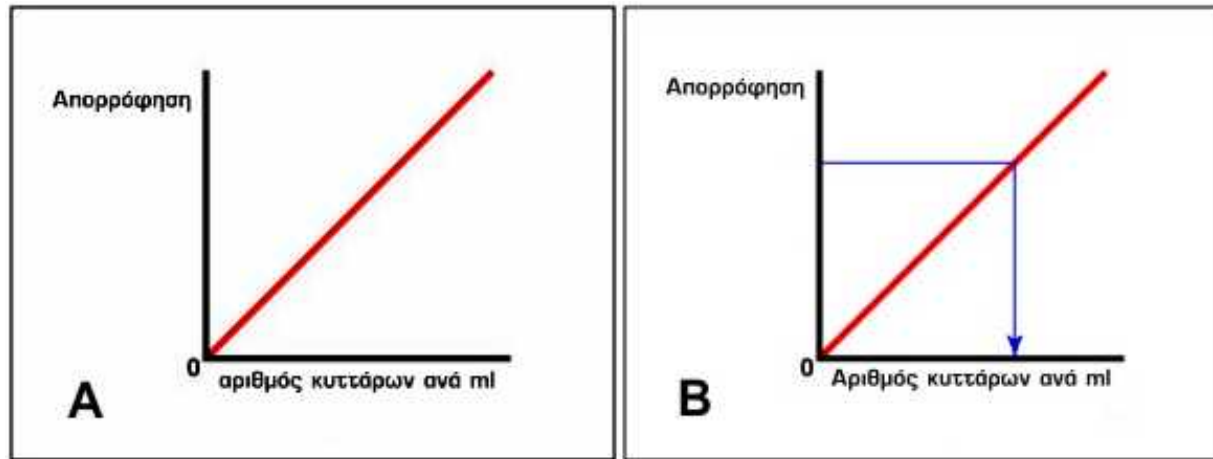


Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων

- Μέτρηση θολότητας (απορρόφηση φωτός **συνήθως 600 nm**) δεν δίνει τον αριθμό των μικροβιακών κυττάρων που υπάρχουν στην καλλιέργεια
- Μικροβιακός πληθυσμός υπολογίζεται **έμμεσα** από την μέτρηση της απορρόφησης μέσω της **καμπύλης αναφοράς** (ή **πρότυπη καμπύλη**), που να συσχετίζει την απορρόφηση φωτομέτρου με τον αριθμό των κυττάρων
- Δημιουργία αυτής της καμπύλης μέσω άλλης μεθόδου μέτρησης κυττάρων, π.χ. αιματοκυτταρόμετρο, και σε κάθε γνωστό αριθμό μικροβιακών κυττάρων μετράται και η απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm
- Πρότυπη καμπύλη (ευθεία) συσχετίζει αυτούς τους δύο παράγοντες (στον άξονα των X είναι ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων και στον άξονα των Y η απορρόφηση) και παρέχει τη δυνατότητα υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε μία υγρή καλλιέργεια (ή σε οποιαδήποτε αραιώση αυτής), μετρώντας απλά την απορρόφηση (A_{600}) με τη βοήθεια του φωτομέτρου



Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων



- **A:** Πρότυπη καμπύλη συσχέτισης της απορρόφησης φωτός μια μικροβιακής καλλιέργειας με τον αριθμό μικροβιακών κυττάρων ανά ml της καλλιέργειας
- **B:** χρήση της καμπύλης για τον προσδιορισμό του αριθμού των μικροβιακών κυττάρων που υπάρχουν σε 1 mL μιας καλλιέργειας 70



Μέτρηση «θολότητας» αιωρήματος μικροβιακών κυττάρων

- **Μειονεκτήματα:**
 - λιγότερο ευαίσθητη σε σχέση με τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων
 - μετράει ζωντανά και νεκρά κύτταρα
 - Ανεφάρμοστη για τη μέτρηση μυκήτων που φτιάχνουν μυκήλιο και σε μικροοργανισμούς με μεγάλα κύτταρα (π.χ. πρωτόζωα), γιατί προκαλούν ανομοιόμορφη διάθλαση φωτός
- **Πλεονεκτήματα:** απλή, εύκολη, γρήγορη και οικονομική



Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

ΕΜΜΕΣΟΙ μέθοδοι μέτρησης (2)

- **Μέτρηση ξηρού βάρους μικροβιακής καλλιέργειας**
 - Συλλογή μικροβιακών κυττάρων με φυγοκέντρηση και υπολογισμός του βάρους τους
 - Ποσότητα του υγρού μέσου παγιδεύεται στο ίζημα των κυττάρων με αποτέλεσμα η μέτρηση να μην αντιστοιχεί πράγματι στο καθαρό βάρος τους
 - Πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί λαμβάνοντας το ξηρό βάρος του ιζήματος που λαμβάνεται με τη φυγοκέντρηση, μέσω της τοποθέτησης του σε ξηρό κλίβανο υψηλής θερμοκρασίας, στο οποίο και απομακρύνεται η υγρασία και ακολουθεί ζύγιση
 - Ξηρό βάρος μικροβιακών κυττάρων προσδιορίζει τη βιομάζα αυτών
 - Εφαρμογή κυρίως σε μικροοργανισμούς με μεγάλα κύτταρα, καθώς και σε μύκητες με μυκήλιο



Ανάγκες για την καλλιέργεια μ/ο

- **Αερόβιοι:** ανακίνηση, γιατί το O_2 είναι δυσδιάλυτο στο νερό και δεν ανανεώνεται γρήγορα
- **Αναερόβιοι:** πλήρης απουσία O_2 (ερμητικό κλείσιμο των φιαλών, αναγωγικοί παράγοντες, ανοξικό δοχείο GasPack, βρασμός θρεπτικού υλικού, ανοξικοί θάλαμοι)

Για το χειρισμό και την επώαση καλλιεργειών υπό ανοξικές συνθήκες; (α) ανοξικό δοχείο, (β) ανοξικός θάλαμος





Βιβλιογραφία

- Ανώνυμος, 2009. Εργαστηριακές σημειώσεις Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 45 σελ.
- Ζωάκη-Μαλισιόβα Δ., 1995. Εργαστήρια Φυτοπροστασίας Ι. Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου, 93 σελ.
- Ζωάκη-Μαλισιόβα Δ., 1998. Μαθήματα Φυτοπροστασίας Ι. Διδακτικές σημειώσεις, Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου, 121 σελ.
- Ηλιόπουλος Α.Γ., 2004. Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Έμβρυο, 296 σελ.
- Τζάμος Ε.Κ., 2007. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, 557 σελ.



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Τεχνολογικό Ίδρυμα Ηπείρου. Δρ Δήμητρα Ζωάκη
Μαλισιόβα.

Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο. Μη-παρασιτικές &
Μετασυλλεκτικές ασθένειες.

Έκδοση: 1.0. Άρτα, 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
<<http://eclass.teiep.gr/courses/TEXG101/>>

Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά Δημιουργού-Μη Εμπορική Χρήση-Όχι Παράγωγα Έργα 4.0 Διεθνές [1] ή μεταγενέστερη. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, Διαγράμματα κ.λπ., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.el>



Τέλος Ενότητας

Επεξεργασία: Δρ Αντωνόπουλος Δημήτριος

Γεωπόνος-Φυτικής Παραγωγής ΓΠΑ

Γεωπόνος-Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας ΓΠΑ

ΕΠΠΑΙΚ ΑΣΠΑΙΤΕ

ΜΔΕ (MPhil) Φυτοπροστασίας ΓΠΑ

ΜΔΕ (MSc) Ασφάλειας Τροφίμων WUR

ΔΔ (PhD) Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

Μετα-ΔΔ (Post-Doc) Φυτοπαθολογίας NCSU USA

Μετα-ΔΔ (Post-Doc) Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ-ΙΚΥ

Άρτα, 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

