



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

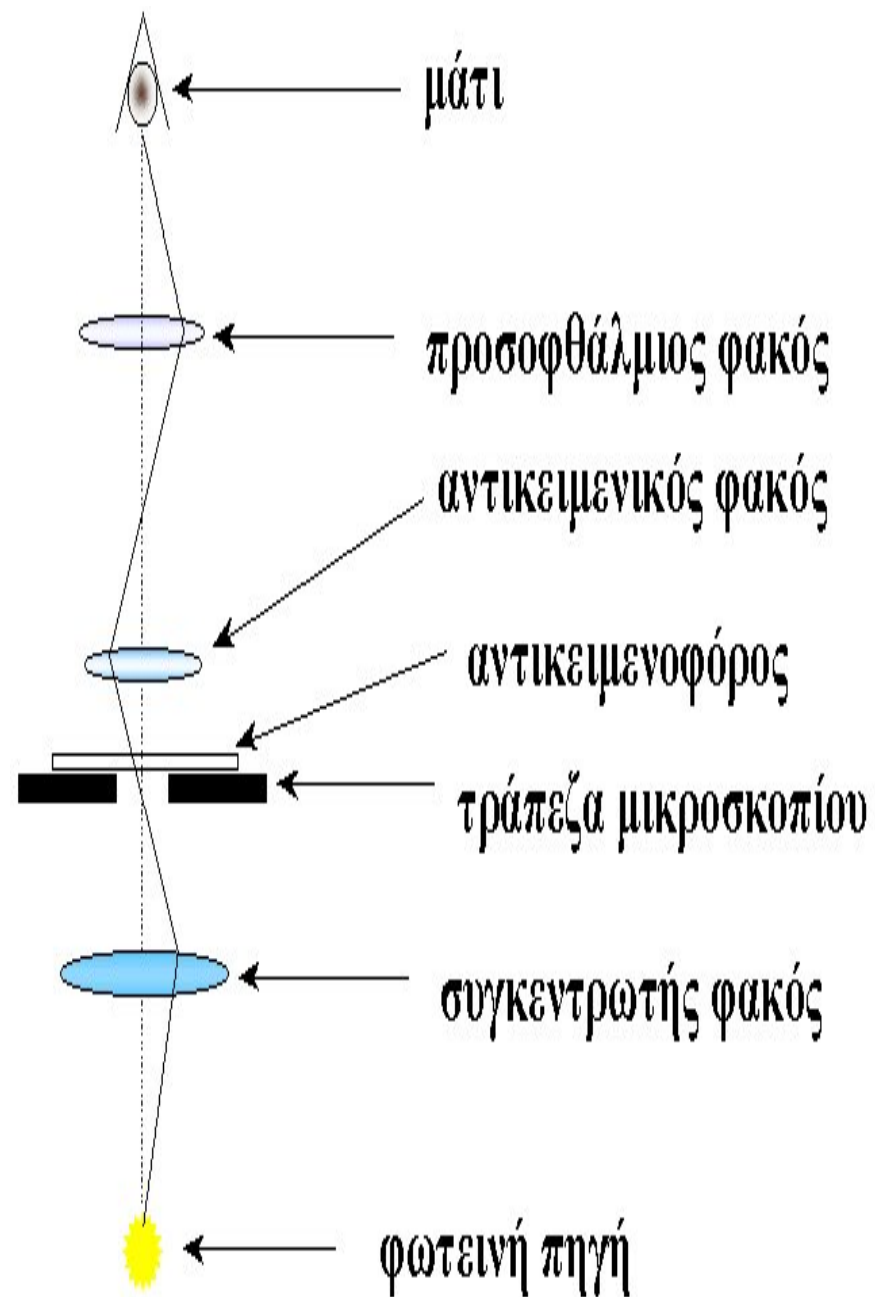
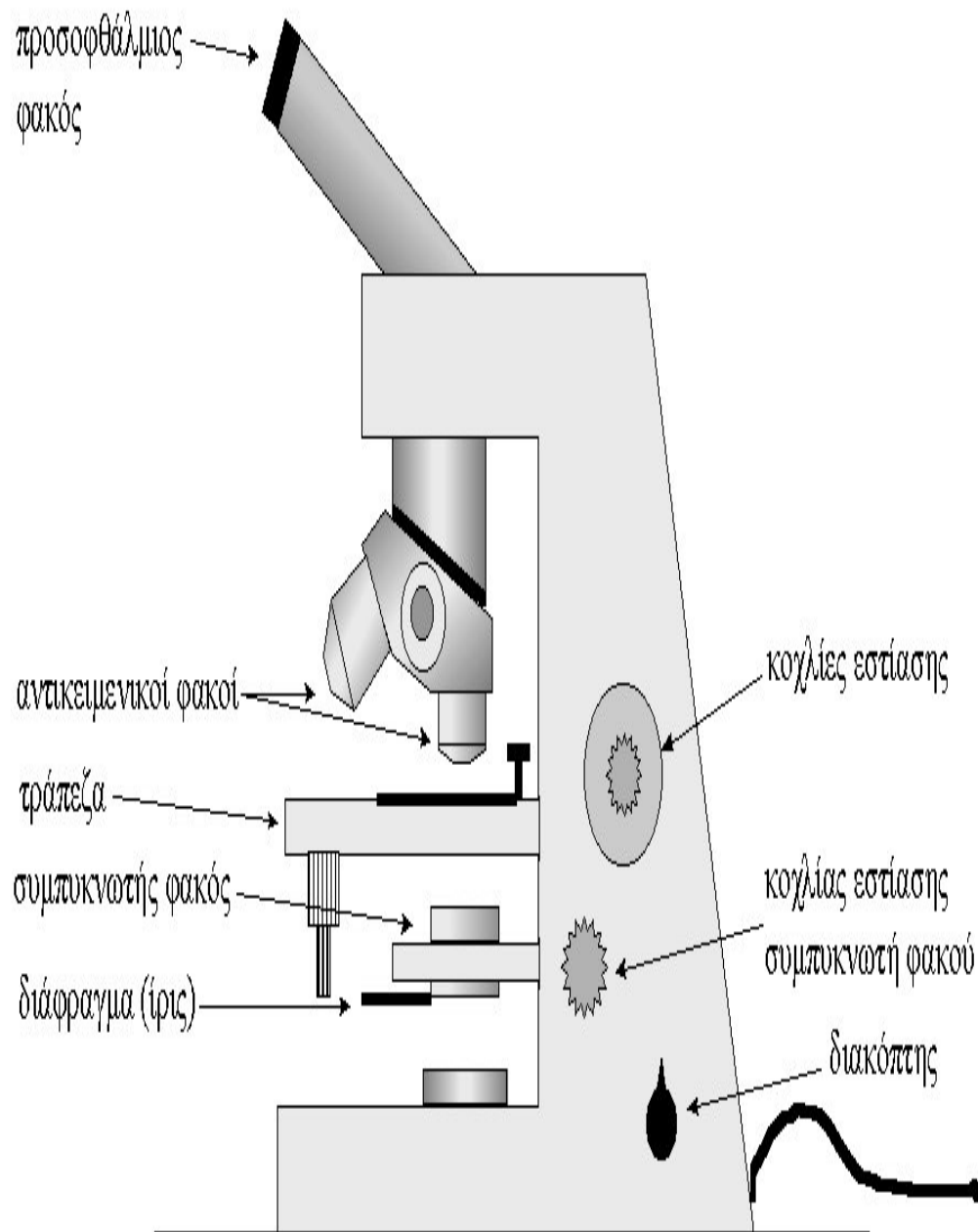
ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

Μικροσκόπιο είναι το οπτικό όργανο που μας επιτρέπει να μελετήσουμε τα αντικείμενα που έχουν πολύ μικρό μέγεθος και γι' αυτό είναι αόρατα με γυμνό μάτι.

Ένα σύγχρονο μικροσκόπιο αποτελείται από δύο μέρη : το **μηχανικό** (ή το στατό) και το **οπτικό**. Η ποιότητα του οπτικού μέρους καθορίζει την αξία του μικροσκοπίου.

Μέρη οπτικού μικροσκοπίου



Μηχανικό μέρος ή στατό:

1. Τη βάση, στην οποία στηρίζεται το μικροσκόπιο. Έχει διάφορα σχήματα, π.χ. δίσκου, πετάλου κ.τ.λ.
2. Το στέλεχος. Σ 'αυτό στηρίζονται τα υπόλοιπα μέρη του μικροσκοπίου.
3. Το σωλήνα, που φέρει τους φακούς. Στο ανώτερο άκρο φέρει τον ή τους προσοφθάλμιους φακούς και στο κατώτερο φέρει δίσκο περιστρεφόμενο, πάνω στον οποίο βιδώνονται οι αντικειμενικοί φακοί. Στα διοφθάλμια μικροσκόπια, ο σωλήνας έχει αντικατασταθεί από κουτί. Οι προσοφθάλμιοι φακοί κινούνται εγκάρσια και έτσι μπορεί να ρυθμιστεί η απόσταση ανάμεσά τους και να προσαρμοστεί στην όραση του παρατηρητή.

4. Τον περιστρεφόμενο δίσκο. Στην πραγματικότητα πρόκειται για δύο δίσκους που εφαρμόζουν ακριβώς ο ένας πάνω στον άλλο. Ο επάνω δίσκος είναι στερεωμένος στο κάτω άκρο του σωλήνα. Στον κάτω δίσκο βιδώνονται οι αντικειμενικοί φακοί, συνήθως **2-3 ξηροί και 1 καταδυτικός**.
5. Το μηχανισμό που χρησιμεύει για την ανεύρεση του οπτικού πεδίου. Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται από δυο κοχλίες συνήθως συγκεντρικούς, που χρησιμεύουν, για να μετακινούν κατακόρυφα ή την αντικειμενοφόρο τράπεζα ή το στέλεχος για την ανεύρεση του οπτικού πεδίου.

6. Την αντικειμενοφόρο τράπεζα. Η αντικειμενοφόρος τράπεζα είναι μια μετάλλινη πλάκα που φέρει άνοιγμα στο κέντρο, για να περνούν οι φωτεινές ακτίνες και προορίζεται για την τοποθέτηση του παρασκευάσματος. Το παρασκεύασμα στερεώνεται πάνω στην πλάκα ή με δύο ελάσματα, οπότε μένει ακίνητο, ή με ειδικό σύστημα που μετακινείται μαζί με το παρασκεύασμα εμπρός-πίσω και δεξιά-αριστερά με τη βοήθεια δύο κοχλιών.

Οπτικό μέρος:

1. Φωτιστικό σύστημα. Πηγή φωτός μπορεί να είναι το φως της ημέρας ή συνήθως μια ηλεκτρική λάμπα ανεξάρτητη από το μικροσκόπιο ή ενσωματωμένη στο μικροσκόπιο.
2. Συμπυκνωτής. Είναι απαραίτητο στοιχείο του οπτικού μέρους του μικροσκοπίου, γιατί αυξάνει το φωτισμό του παρασκευάσματος και συμμετέχει ακόμη και στη διαχωριστική ικανότητα του μικροσκοπίου. Ο συμπυκνωτής είναι τοποθετημένος κάτω από την αντικειμενοφόρο τράπεζα και κινείται κατακόρυφα με έναν κοχλία.

3. Φακοί: Οι φακοί αποτελούν το πιο σημαντικό τμήμα του μικροσκοπίου. Διακρίνουμε τους **αντικειμενικούς** και τους **προσοφθάλμιους** φακούς.

➤ Αντικειμενικοί φακοί: Αυτοί αποτελούν σύστημα από φακούς που παρέχει πραγματική εικόνα του αντικειμένου. Ανάλογα με τα αποτελέσματα που πετυχαίνονται, διακρίνουμε τους αχρωματικούς και αποχρωματικούς φακούς. Οι τελευταίοι είναι οι πιο ικανοποιητικοί. Ακόμη διακρίνουμε τους αντικειμενικούς φακούς σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τους *ξηρούς* και τους *καταδυτικούς*.

Στους ξηρούς φακούς το μέσο που παρεμβάλλεται είναι ο αέρας, ενώ στους καταδυτικούς χρησιμοποιούμε κεδρέλαιο.

Σε κάθε μικροσκόπιο υπάρχουν συνήθως τρεις ξηροί φακοί διάφορων μεγεθύνσεων π.χ. X10, X20, X40 και ένας καταδυτικός, π.χ. X100 ή X120.

- Προσοφθάλμιοι φακοί: Κάθε προσοφθάλμιος φακός αποτελείται από δύο φακούς που χωρίζονται από ένα διάφραγμα. Οι προσοφθάλμιοι φακοί χρησιμεύουν, για να παρατηρούμε πραγματικό είδωλο που παρέχει ο αντικειμενικός φακός. Το είδωλό αυτό το μεγεθύνουν και το μετατρέπουν σε φανταστικό.

Μικροσκόπιο πολωμένου φωτός

Polarized Light Microscope Configuration

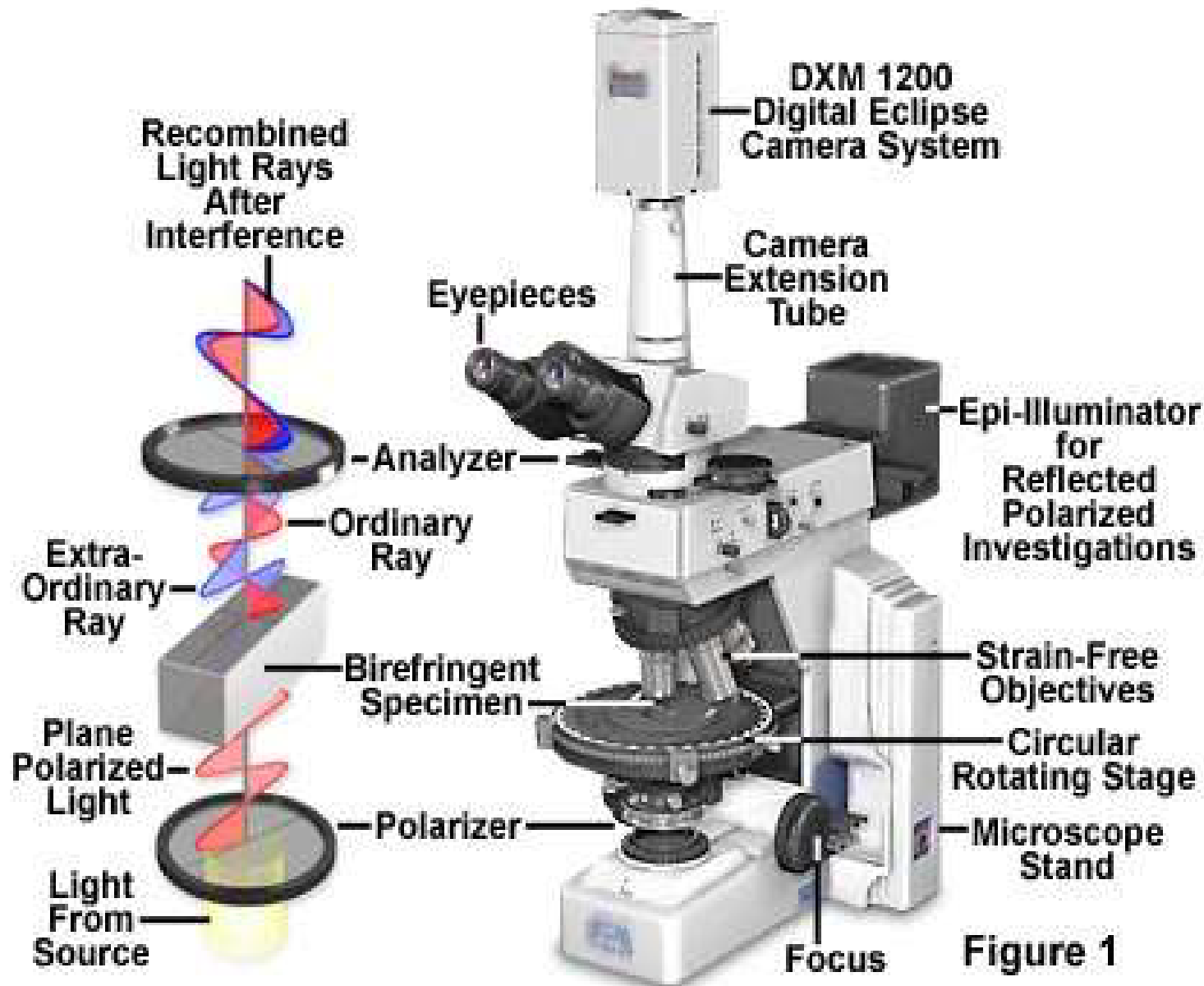


Figure 1

Ολική Μεγέθυνση Μικροσκοπίου:

Ολική μεγέθυνση του μικροσκοπίου είναι ίση με το γινόμενο της μεγεθύνσεως του αντικειμενικού φακού και του προσοφθάλμιου, αν δεν υπάρχουν ενδιάμεσοι φακοί. Π.χ. αντικειμενικός X100 και προσοφθάλμιος X10 δίνουν ολική μεγέθυνση: **$100 \times 10 = 1000$** .

Το γινόμενο $\alpha = n \eta\mu\beta$ ονομάζεται αριθμητικό άνοιγμα του Abbe, όπου n είναι ο δείκτης διαθλάσεως του μέσου που παρεμβάλλεται ανάμεσα στο φακό και το αντικείμενο. Αν $n = 1$ τότε $\alpha = \eta\mu\beta$

Η γνώση του αριθμητικού ανοίγματος έχει μεγάλη σημασία, γιατί με υπολογισμό αποδεικνύεται ότι η διαύγεια της εικόνας $e = A \cdot \eta\mu\beta$, όπου A είναι σταθερά.

Διαχωριστική ικανότητα μικροσκοπίου:

Έτσι ονομάζεται η μικρότερη απόσταση που μπορούν να έχουνε δυο σημεία του αντικειμένου, ώστε το μάτι να βλέπει τα είδωλά τους χωριστά. Για τη διαχωριστική ικανότητα του μικροσκοπίου ισχύει η σχέση:

$$\delta = 1,22\lambda / 2n \eta\mu\beta$$

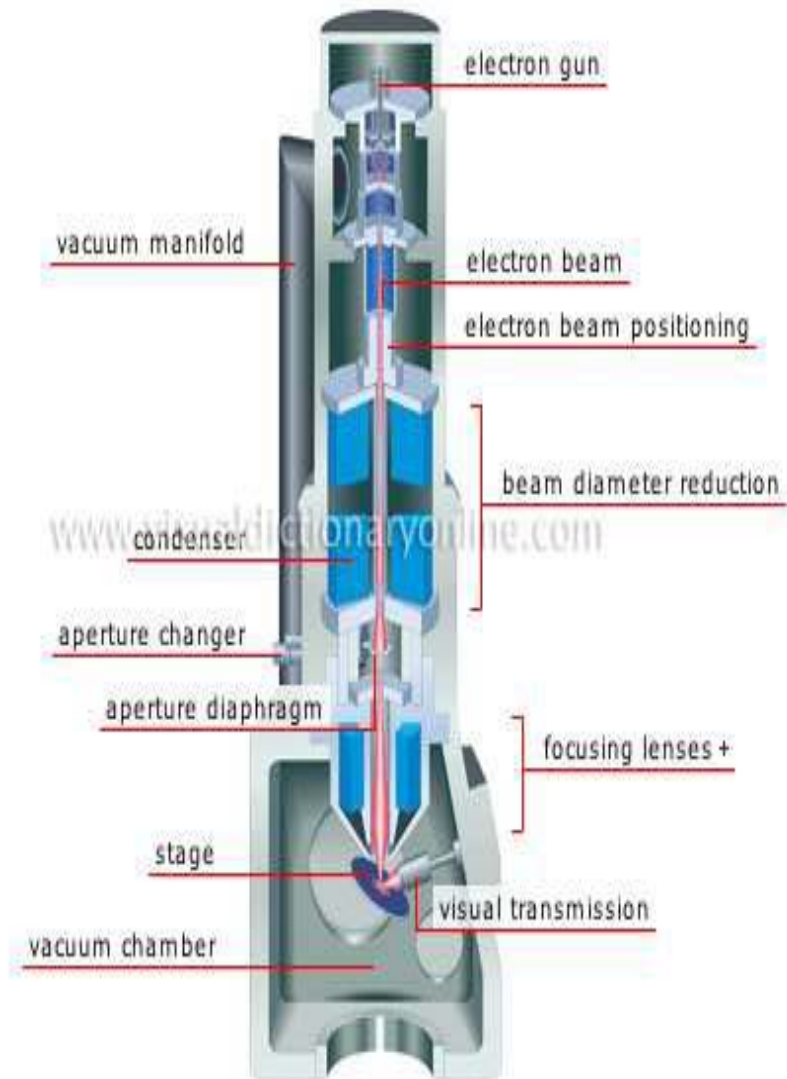
Όπου, λ = μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός

δ = η απόσταση των σημείων (διαχωριστική ικανότητα του μικροσκοπίου)

$n \eta\mu\beta$ = αριθμητικό άνοιγμα του Abbe.

n είναι ο δείκτης διαθλάσεως του μέσου που παρεμβάλλεται ανάμεσα στο φακό και το αντικείμενο

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, πετυχαίνουμε μεγάλες μεγενθύσεις, π.χ 250.000 X, γιατί **αντί για φως χρησιμοποιεί δέσμες ηλεκτρονίων** πολύ μικρού μήκους κύματος $\lambda = 0,05 \text{ \AA}$.

Χρήση του μικροσκοπίου για καταμέτρηση κυττάρων

Η άμεση παρατήρηση και αρίθμηση των μικροοργανισμών σε ορισμένο όγκο του τροφίμου που αναλύεται είναι η ποσοτική αρχή, στην οποία βασίζεται η άμεση μικροσκοπική καταμέτρηση. Αυτή η αρχή εφαρμόζεται σε επιχρίσματα, κύτταρα καταμετρήσεως ή μεμβράνης διηθήσεως.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου:

- ✓ Δίνει γρήγορα αποτελέσματα
- ✓ Τα επιχρίσματα είναι δυνατόν να χρωματισθούν και αναγνωσθούν αργότερα
- ✓ Απαιτεί ελάχιστο εξοπλισμό
- ✓ Μπορεί να γίνει διάκριση διάφορων τύπων μικροβίων
- ✓ Τα επιχρίσματα μπορεί να κρατηθούν και να χρησιμεύσουν ως στοιχεία αναφοράς μεταγενέστερα.

Μειονεκτήματα τη μεθόδου:

- ✓ Χρησιμοποιείται για τρόφιμα με υψηλό μικροβιακό φορτίο
- ✓ Εξετάζεται μόνο μικρή ποσότητα του δείγματος (0,01g ή 0,001 ml), πράγμα που περιορίζει την ακρίβεια
- ✓ Διάφορα σωματίδια δυσκολεύουν την ταυτοποίηση των μικροβίων.

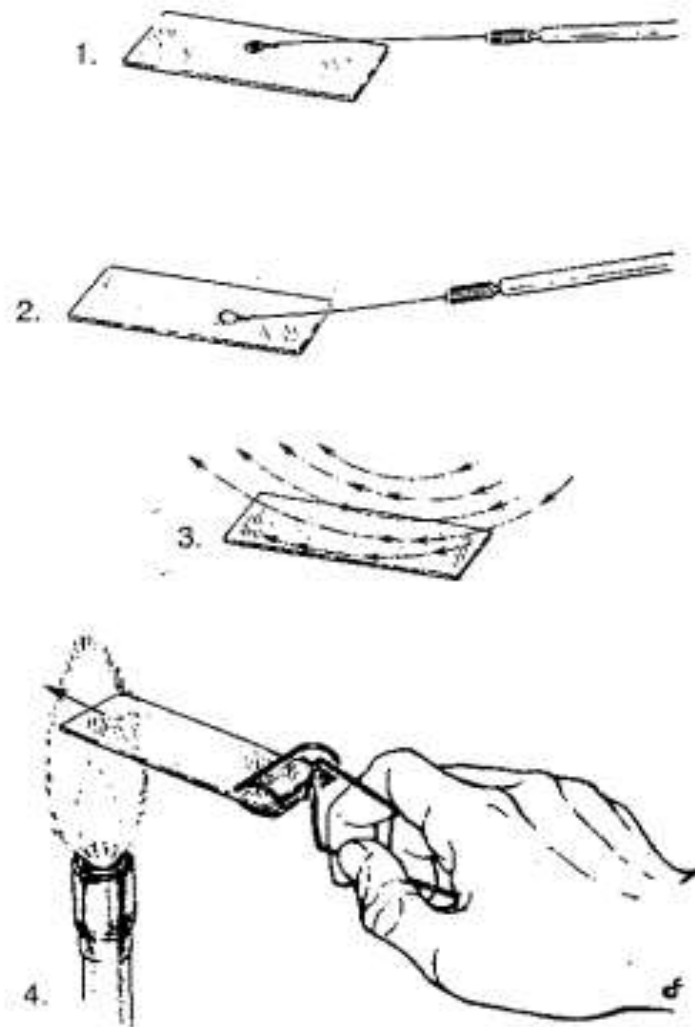
ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΠΛΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Οι μικροοργανισμοί πολλές φορές, κυρίως όταν πρόκειται να χρωματισθούν, χρειάζεται να μονιμοποιηθούν σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Η διαδικασία της μονιμοποίησης θεωρείται απαραίτητη αφού με αυτή ενώ νεκρώνονται οι μικροοργανισμοί και ιζηματοποιείται το πρωτόπλασμά τους, η δομή τους γενικά και τα διάφορα συστατικά τους ειδικότερα, διατηρούνται στις κανονικές τους θέσεις.

Η διαδικασία της μονιμοποίησης:

1. Με το μικροβιολογικό κρίκο μεταφέρετε σε μια καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα μια μικρή σταγόνα από καθαρή καλλιέργεια
2. Η σταγόνα απλώνεται με τον κρίκο στην αντικειμενοφόρο πλάκα
3. Αφήστε την αντικειμενοφόρο να στεγνώσει στον αέρα. Μπορείτε να την πλησιάζετε κοντά στη φλόγα του λύχνου Bunsen όπου το περιβάλλον είναι ξηρό
4. Περάστε την αντικειμενοφόρο πλάκα, με την πλευρά του ξηρού στρώματος των κυττάρων προς τα πάνω, στιγμιαία από τη φλόγα του Bunsen 3 φορές



Η μονιμοποίηση ενός παρασκευάσματος

ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΠΛΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

A. Αλκαλική (άμεση) χρώση:

Οι περισσότερες απλές χρωστικές είναι άλατα στα οποία ένα από τα ιόντα είναι έγχρωμο. Το μπλε του μεθυλενίου για παράδειγμα είναι ένα άλας (Χλωριούχο Μπλε του Μεθυλενίου) που παθαίνει διάσπαση ως εξής:



Τα βακτηριακά κύτταρα, σε ουδέτερο pH, είναι φορτισμένα ελαφρώς αρνητικά γι' αυτό και συνδέονται με τα θετικά φορτισμένα ιόντα του χλωριούχου μπλε του μεθυλενίου με αποτέλεσμα τα κύτταρα να εμφανίζονται χρωματισμένα.

Τέτοιες αλκαλικές χρωστικές είναι: μπλε του μεθυλενίου, κρυσταλλικό ιώδες και φουξίνη.

B. Χρώση με όξινες χρωστικές (Έμμεση Χρώση):

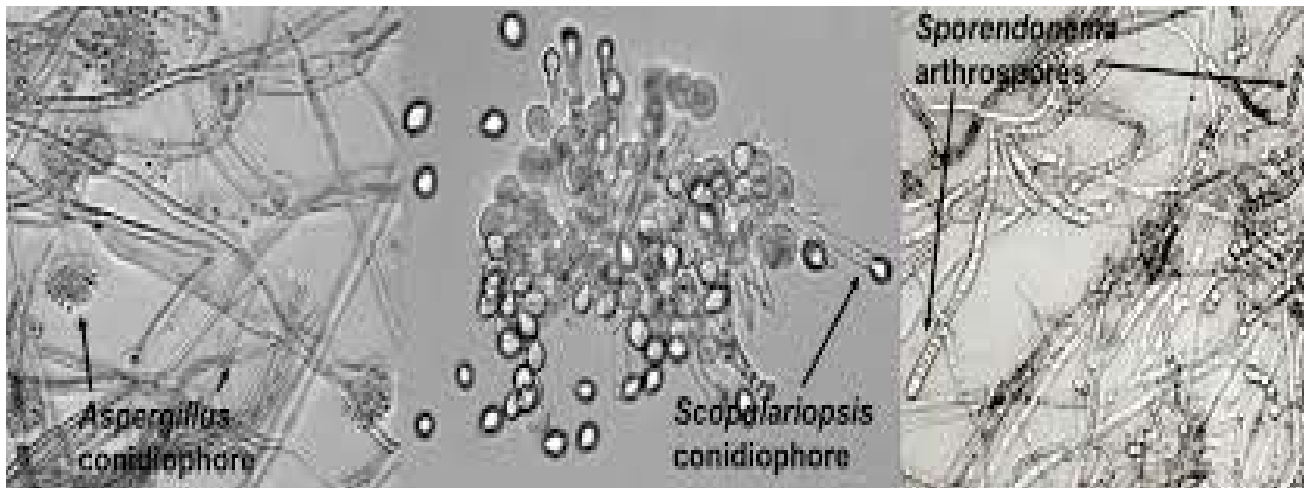
Η πιο κοινή όξινη χρωστική είναι η εωζίνη που χρησιμοποιείται ως διαλυτό άλας (νάτριο της εωζίνης που δίσταται στα κατιόντα νατρίου και ανιόντα εωζίνης). Η ισχυρή χρωστική ικανότητα της εωζίνης οφείλεται στα ανιόντα της.

Επειδή τα βακτηριακά κύτταρα είναι αρνητικά φορτισμένα, οι όξινες χρωστικές δεν τα χρωματίζουν. Αντίθετα οι χρωστικές αυτές σχηματίζουν ένα σκούρο υπόστρωμα, ενώ τα βακτήρια εμφανίζονται αχρωμάτιστα με μια καθαρή ζώνη γύρω τους.

Συνεπώς με τη χρώση αυτή δε χρωματίζεται το κύτταρο αλλά ο χώρος που το περιβάλλει, γι' αυτό ονομάζεται αρνητική ή έμμεση

Παρατήρηση μορφολογία βακτηρίων στο μικροσκόπιο

Απλή χρώση δείγματος κυττάρων
σε αντικειμενοφόρο πλάκα →



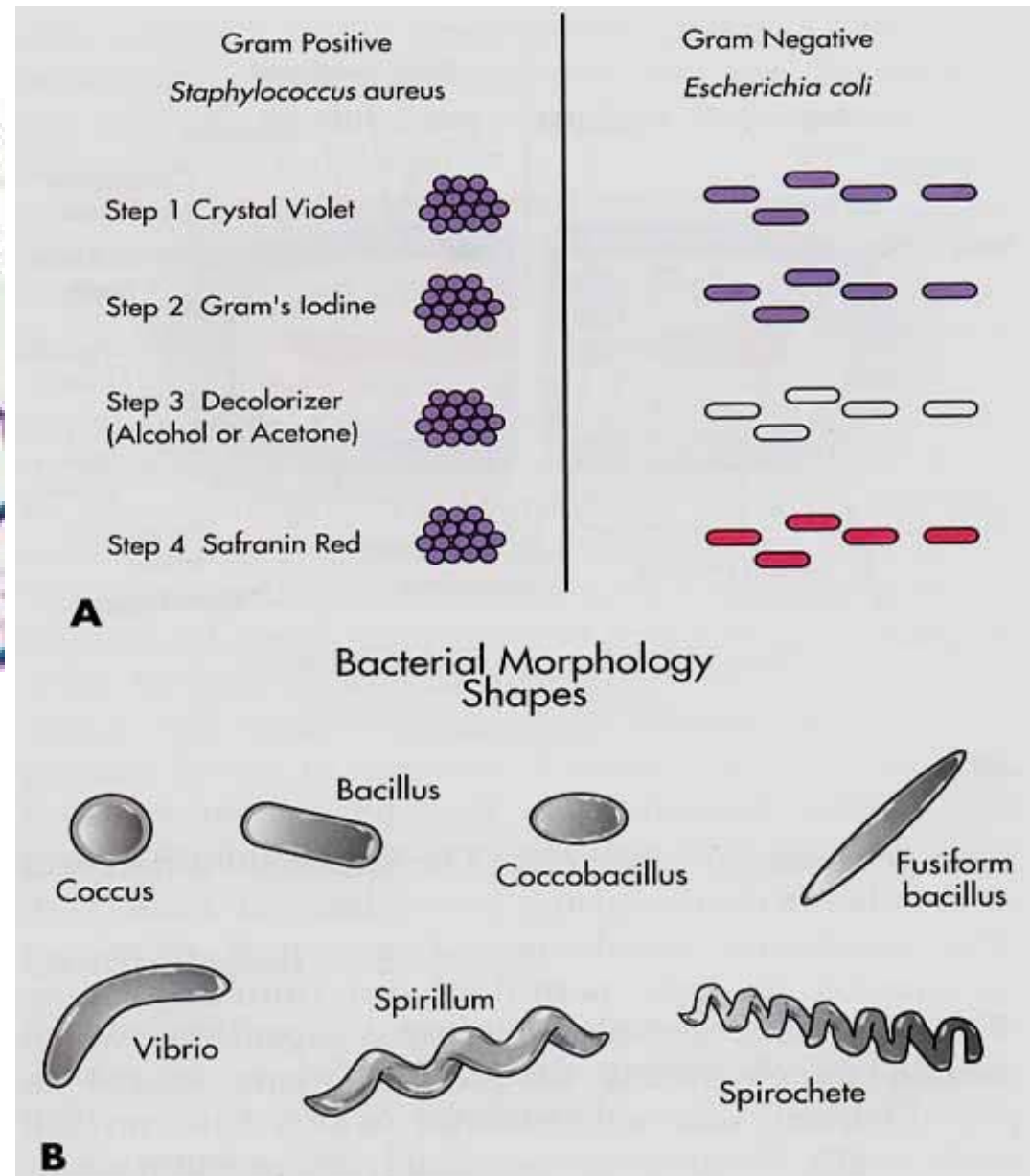
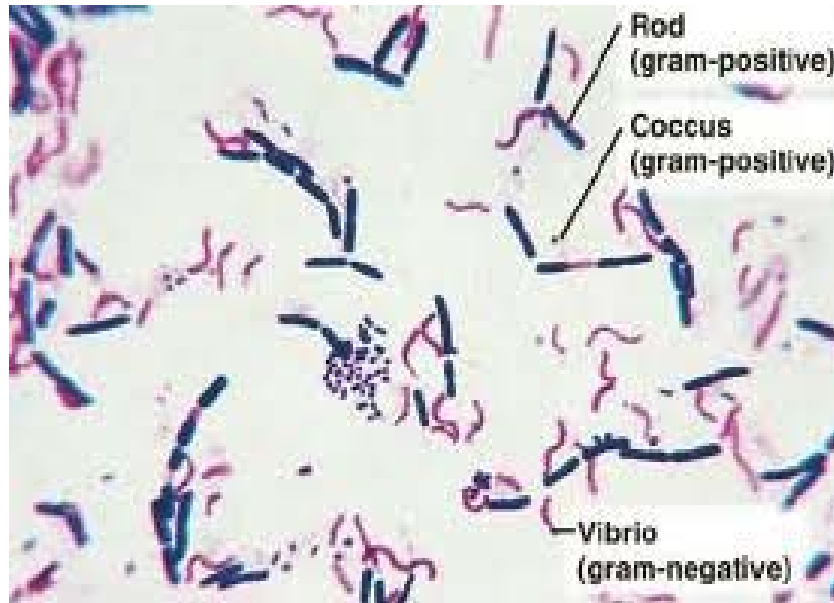
Χρώση Gram (βακτηρίων)

- Gram θετικά/αρνητικά βακτήρια

Διαφορές στη μορφολογία και τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος	
Gram +	Gram -
Περιέχει γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες	Περιέχει λιποπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια
Πολυσακχαρίτες 35-60%	Πολυσακχαρίτες 15-20%
Λιπίδια (0-2%)	Λιπίδια 10-20%
Περιέχει τειχοϊκό οξύ	Δεν περιέχει τειχοϊκό
Περιέχει μουραμικό οξύ	Περιέχουν λίγο ή καθόλου μουραμικό
Δεν περιέχει αρωματικά ή θειούχα αμινοξέα	Περιέχει πολλά αρωματικά ή θειούχα αμινοξέα
Αποτελείται από παχύ, σκληρό ομοειδές στρώμα	Αποτελείται από λεπτές, ελαστικές πολύφυλλες στρώσεις

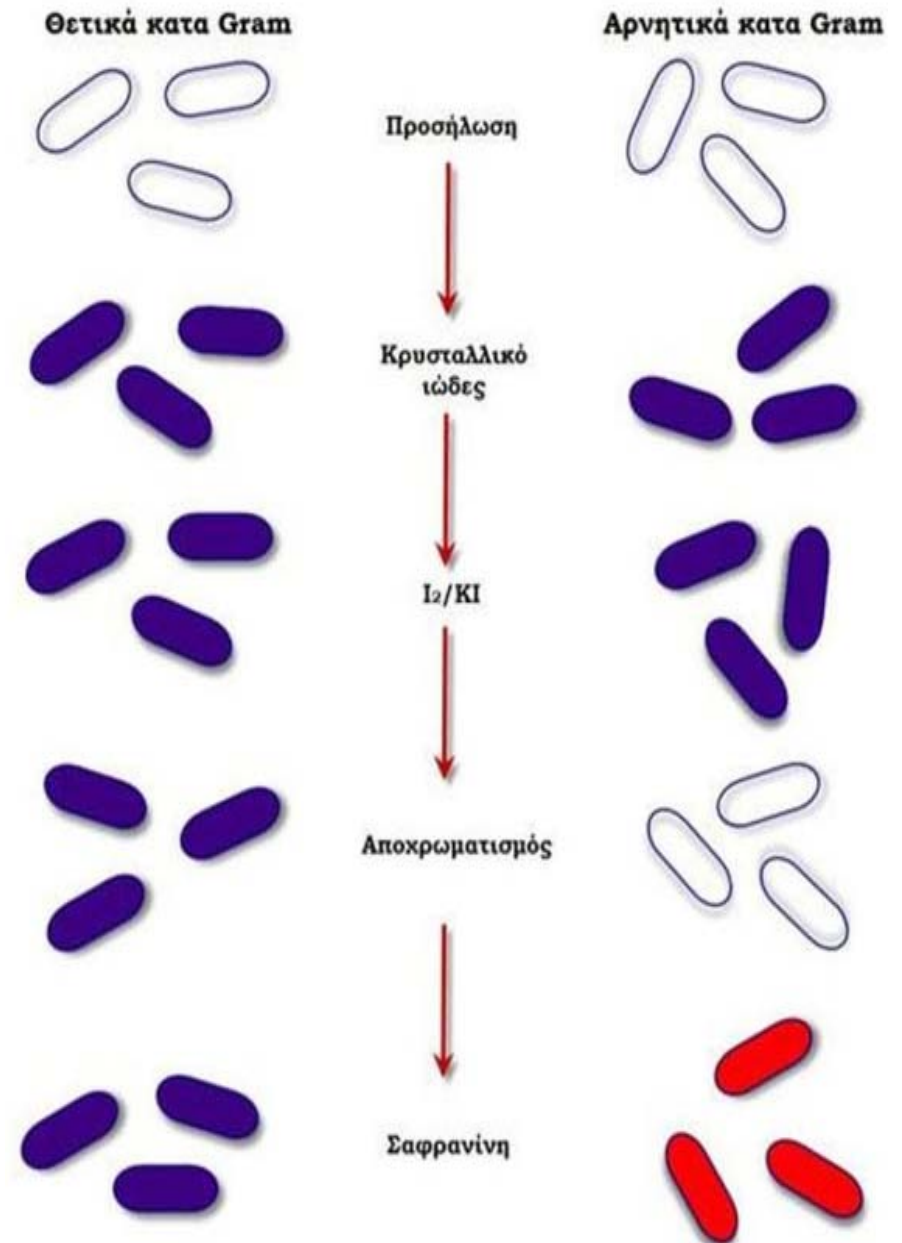
Στάδια εφαρμογής της χρώσης Gram (βακτηρίων)

- Χρώση Gram (θετικά/αρνητικά)

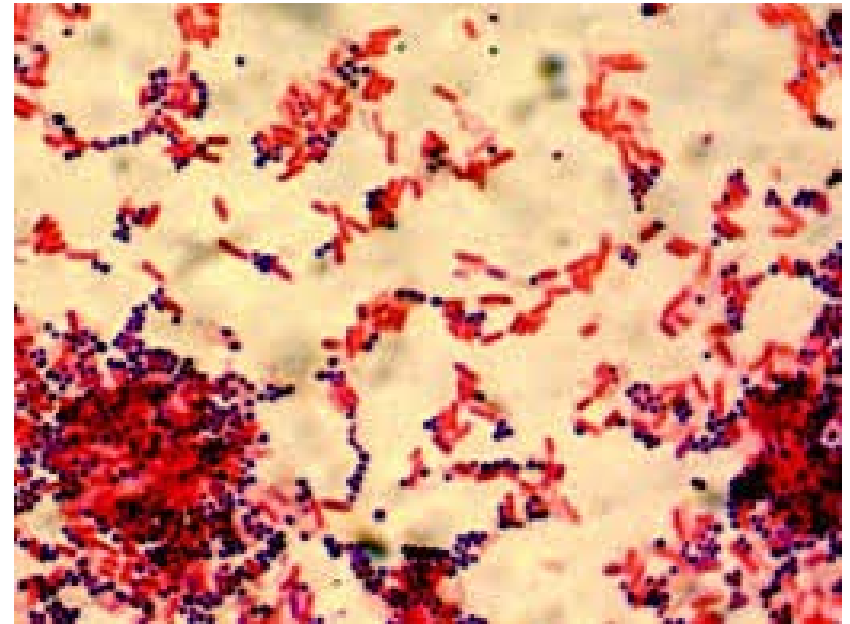
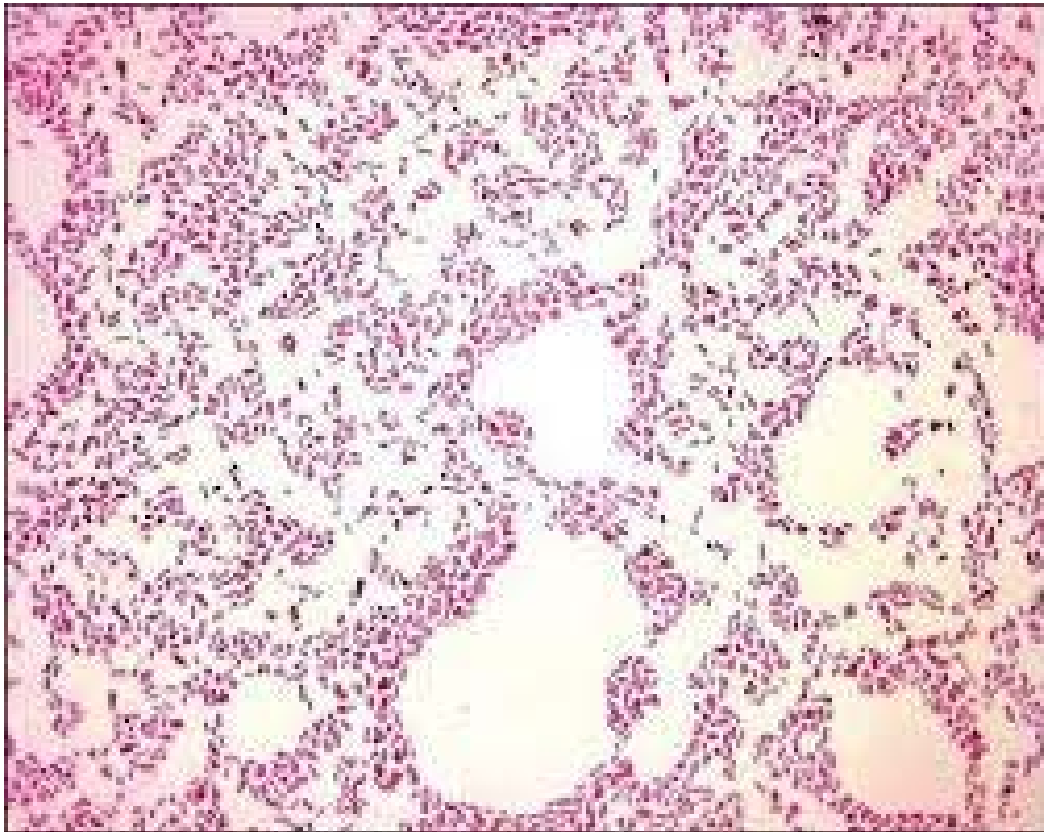
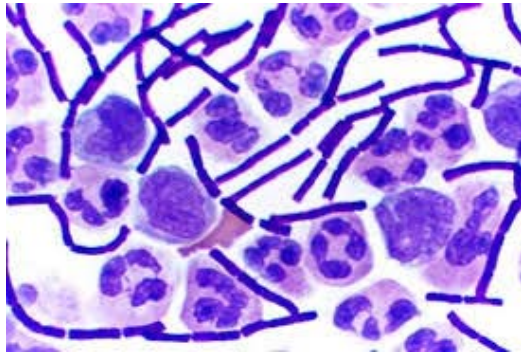


Τεχνική:

- Προετοιμασία του επιχρίσματος με ξήρανση και μονιμοποίηση
- Κάλυψη του παρασκευάσματος με διηθημένο φαινικόχο ιώδες γεντιανής ή κρυσταλλικό ιώδες για 2 με 3 λεπτά
- Έκπλυση με διάλυμα Lugol και κάλυψη του επιχρίσματος με Lugol για 2 λεπτά
- Έκπλυση με νερό βρύσης
- Αποχρωματισμός με αλκοόλη ή διάλυμα αλκοόλης-ακετόνης
- Έκπλυση με άφθονο νερό βρύσης
- Κάλυψη του επιχρίσματος με διάλυμα φουξίνης του Ziehl (1 προς 10 σε νερό) για περίπου μισό λεπτό
- Έκπλυση με νερό, ξήρανση με διηθητικό χαρτί και μικροσκόπηση



Gram + / Gram - bacteria





Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Οι μέθοδοι εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου των τροφίμων διακρίνονται σε έμμεσες και άμεσες.

- **Έμμεσες:** οι μέθοδοι της αναγωγής χρωστικών, της μετρήσεως της ATP, της μέτρησης βακτηριακών μεταβολιτών  γρήγοροι και αποτελεσματικοί αλλά με υψηλό κόστος εγκατάστασης του εξοπλισμού
- **Άμεσες:** οι μικροσκοπικές μέθοδοι και οι μέθοδοι που βασίζονται στη μέτρηση/εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης μετά από επώαση του δείγματος σε στερεά ή υγρά υποστρώματα

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ ΜΕ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η εκτίμηση του ζωντανού μικροβιακού πληθυσμού των τροφίμων σε κατάλληλο θρεπτικό στερεό υπόστρωμα (agar) βασίζεται στην παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται ακινητοποιημένο σε θρεπτικό υπόστρωμα και σχηματίζει μια ορατή αποικία. **Άρα 1 κύτταρο στο δείγμα (τρόφιμο) = 1 αποικία στο agar**

Η παραδοχή δεν είναι απόλυτα σωστή καθώς:

- τα μικροβιακά κύτταρα του δείγματος μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικά είδη με διαφορετικές φυσιολογικές απαιτήσεις και άριστες συνθήκες ανάπτυξης και άρα κάποια μπορεί να μην αναπτυχθούν στο συγκεκριμένο χρόνο ή στις συνθήκες επώασης
- δεν αναπτύσσονται όλα τα κύτταρα (ακόμα και του ίδιου είδους) το ίδιο εύκολα ή γρήγορα υπό τις ίδιες συνθήκες
- μερικά μικρόβια λόγω θρεπτικών ελλείψεων του υποστρώματος δεν σχηματίζουν ορατές αποικίες
- μια αποικία δεν προέρχεται πάντα από ένα μικροβιακό κύτταρο (μπορεί ένα συσσωμάτωμα κυττάρων να δώσει 1 αποικία ή κάποια κύτταρα να μην δώσουν καμία αποικία)
- Κάποιες φορές οι μικροοργανισμοί έχουν κινητικότητα μέσα στο άγαρ ή οι αποικίες είναι συνενωμένες δυσκολεύοντας τη μέτρηση μεμονωμένων αποικιών.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων σε ένα τρόφιμο:

- a. το δείγμα ομογενοποιείται όσο γίνεται καλύτερα για το διασκορπισμό των μικροβιακών κυττάρων.
- b. χρησιμοποιούνται διαφορετικά υποστρώματα, άλλα πιο εκλεκτικά κι άλλα που επιτρέπουν την καταμέτρηση πολλών μικροοργανισμών ταυτόχρονα.
- c. Εφαρμόζονται διαφορετικές συνθήκες επώασης, ώστε να καταστεί δυνατή η καταμέτρηση των διαφόρων μικροβιακών ομάδων (αερόβια, μεσόφιλα, ψυχρότροφα, κ.λ.π.)

Το αποτέλεσμα της εκτιμήσεως των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζεται σε **Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units - CFU)** / g ή ml δείγματος.

Δεκαδικές Αραιώσεις

- Το πρώτο βήμα για την καταμέτρηση μικροοργανισμών σε ένα τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα είναι η αραιώση του δείγματος, με **εφαρμογή δεκαδικών αραιώσεων (1/10 αραιώση σε κάθε βήμα)**
- Ο λόγος που απαιτούνται συνήθως δεκαδικές αραιώσεις είναι ότι συχνά ο πληθυσμός μιας ομάδας μικροοργανισμών ή και ενός γένους μικροοργανισμού σε ένα τρόφιμο είναι πολύ μεγάλος και είναι αδύνατο να καταμετρηθούν σε ένα τρυβλίο.
- Π.χ. αν σε ένα τρυβλίο μπορούμε να δούμε με ικανοποιητική ευκρίνεια 150-300 αποικίες και στο τρόφιμο έχουμε 200.000 αποικίες / g τροφίμου, θα πρέπει το δείγμα τροφίμου να αραιωθεί 1000 φορές ή 1/1000, ώστε τελικά να εμφανιστούν στο τρυβλίο μετά από επώαση 200 αποικίες.
- Τα αραιωτικά υγρά (Maximum Recovery Diluent, Ringer solution, Peptone water) πρέπει να αραιώνουν τα κύτταρα χωρίς να επιτρέπουν την ανάπτυξή τους για όση ώρα παραμένουν στο αραιωτικό υγρό.
- Τα υγρά δείγματα τροφίμων μπορούν να εμβολιαστούν και χωρίς αραιώση (αν ο πληθυσμός μ/ων είναι χαμηλός), αλλά για στερεά τρόφιμα είναι αναγκαστική τουλάχιστον η **1^η δεκαδική αραιώση (1/10) 25g ή 10g του τροφίμου σε 225ml ή 90ml αραιωτικού υγρού** (αντίστοιχα)
- Για κάθε επόμενη δεκαδική αραιώση **μεταφέρουμε 1ml της προηγούμενης αραιώσης σε 9ml της επόμενης δεκαδικής αραιώσης**, ώστε ο λόγος αραιώσης να γίνει 1/100, μετά 1/1000, κ.ο.κ.

Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων

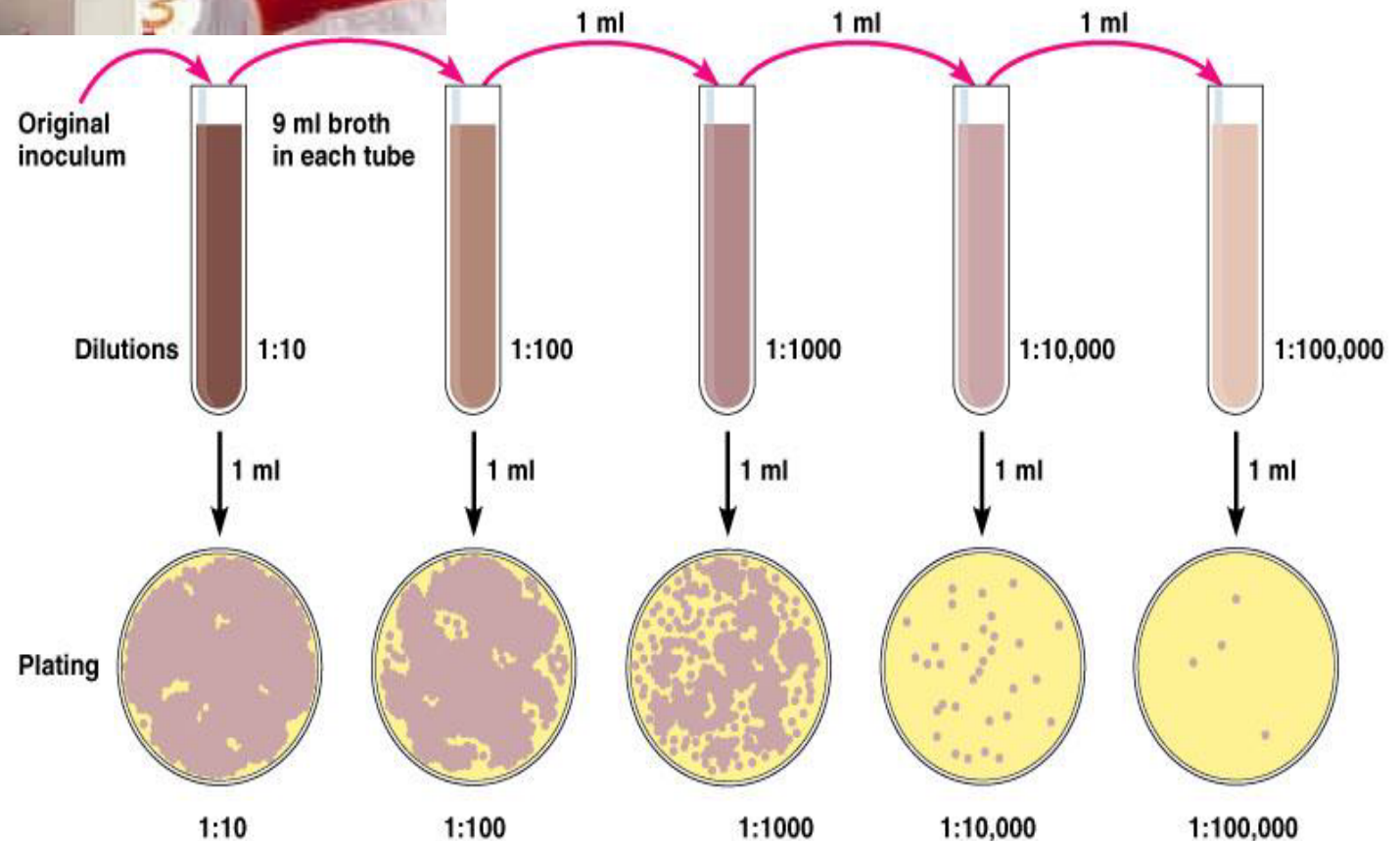
Αρχικό δείγμα σε σακούλα stomacher

Ομογενοποιητής stomacher

1^η δεκαδική αραιώση



Μετά τον εμβολιασμό και το τέλος της επώασης των μικροοργανισμών, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών πολλαπλασιάζεται με το αντίστροφο της αραιώσης. Π.χ. αν κάνουμε αραιώση 1/10.000 και από αυτό το τρυβλίο λάβουμε 58 αποικίες, ο πληθυσμός στο αρχικό δείγμα είναι $58 \times 10000 = 580.000$ cfu/g



Μέθοδοι Εμβολιασμού

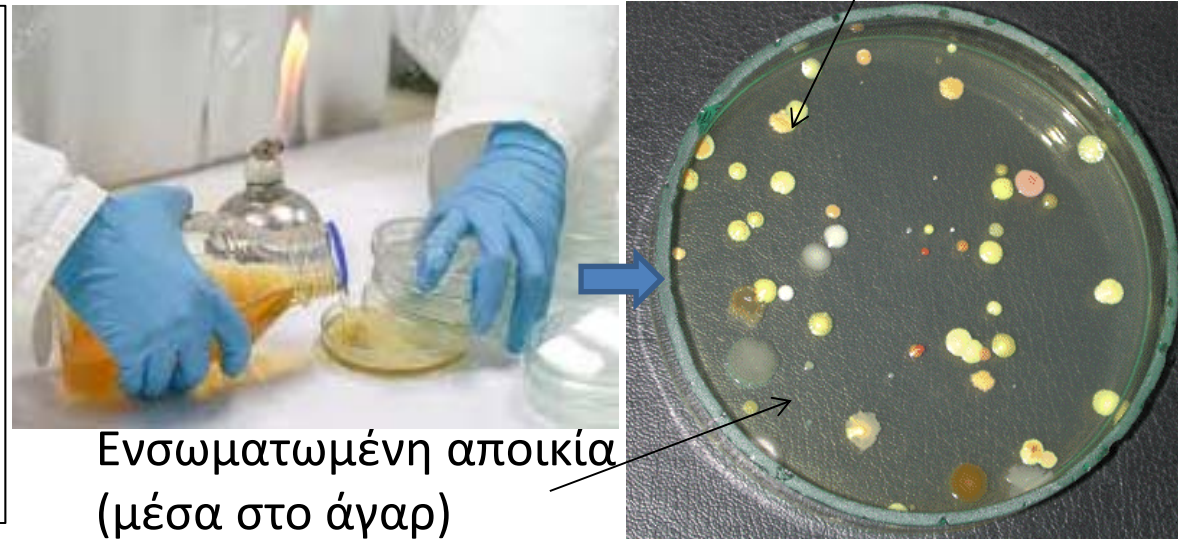
Ο ενοφθαλμισμός ή εμβολιασμός του δείγματος (εμβολίου) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται με 2 τρόπους:

- **A) Τεχνική της ενσωμάτωσης:**

ενοφθαλμισμός 1ml κατάλληλα αραιωμένου δείγματος σε άδειο τρυβλίο →
προσθήκη του υποστρώματος σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία 42-45°C →
ομογενοποίηση δείγματος-υποστρώματος και στερεοποίηση υποστρώματος →
επάαση των τρυβλίων και εμφάνιση αποικιών

Επιφανειακή αποικία
(πάνω στο άγαρ)

* Οι αποικίες που παίρνουμε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στα τρυβλία μας είναι διασκορπισμένες τόσο στο εσωτερικό όσο και στην επιφάνεια του υποστρώματος.



Ενσωματωμένη αποικία
(μέσα στο άγαρ)

Μέθοδοι Εμβολιασμού

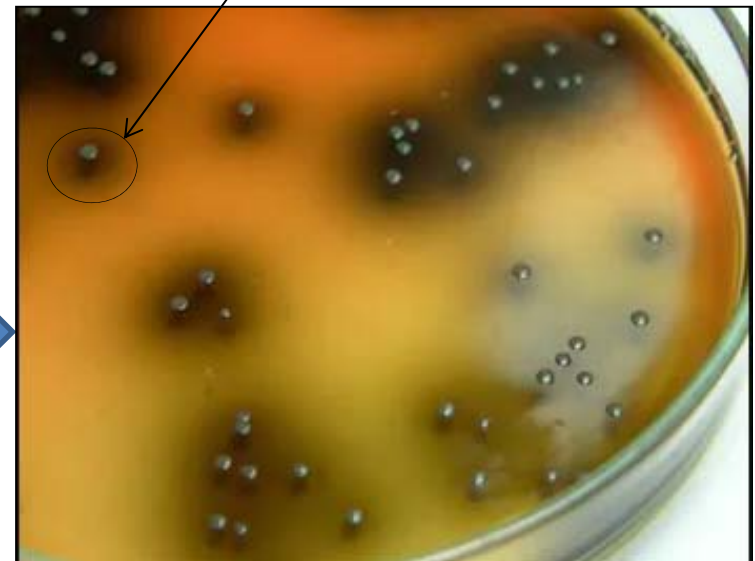
- **B) Τεχνική της επίστρωσης:**

ενοφθαλμισμός 0,1ml εμβολίου σε τρυβλίο με ήδη στερεοποιημένο άγαρ ➡
με αποστειρωμένη ράβδο επίστρωσης απλώνουμε με κυκλικές κινήσεις το
εμβόλιο ώστε να απορροφηθεί σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος ➡
επάωση των τρυβλίων

* Οι αποικίες που παίρνουμε με την τεχνική της επίστρωσης στα τρυβλία μας είναι επιφανειακές όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Επιφανειακή αποικία



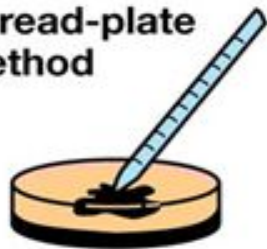
Σχηματική απεικόνιση ενσωμάτωσης – επίστρωσης

<https://www.jove.com/video/3064/aseptic-laboratory-techniques-plating-methods>

Μέθοδος επίστρωσης



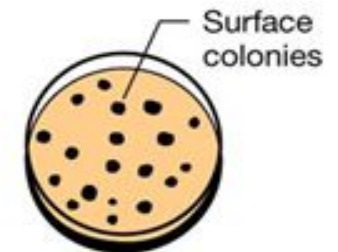
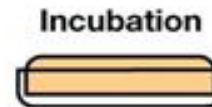
Spread-plate method



Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)



Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader



Typical spread-plate results

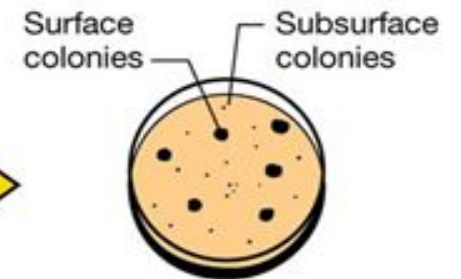
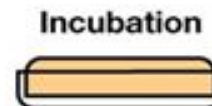
Pour-plate method



Sample is pipetted into sterile plate



Sterile medium is added and mixed well with inoculum



Typical pour-plate results

Μέθοδος ενσωμάτωσης

Κανόνες Καταμέτρησης Αποικιών σε Τρυβλία

1. Επιλέγουμε τρυβλία που έχουν **30-300 αποικίες για την ενσωμάτωση και 15-150 για την επίστρωση.** (ή 10-100 για επίστρωση μυκήτων)
2. Αν δεν έχουμε κανένα τρυβλίο ανάμεσα στα παραπάνω όρια, τότε **επιλέγουμε το τρυβλίο της μικρότερης αραιώσης που έχει αποτέλεσμα κοντά σε αυτά τα όρια.**
3. Αν έχουμε δυο διαδοχικές αραιώσεις εντός των παραπάνω ορίων του 1^{ου} κανόνα τότε παίρνουμε τον **μέσο όρο** του τελικού αποτελέσματος των δυο αραιώσεων, **μόνο όταν το τελικό αποτέλεσμα της μεγαλύτερης αραιώσης (cfu/g) δεν ξεπερνά το διπλάσιο της προηγούμενης.**

Κανόνες Αρίθμησης

4. Εάν κανένα τρυβλίο δεν έχει αποικίες τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν <1 επί τον συντελεστή της μικρότερης αραίωσης.
5. Ο αριθμός των αποικιών υπολογίζεται αν ο αριθμός αποικιών των επιλεγμένων τρυβλίων πολλαπλασιαστεί με το αντίστροφο της αντίστοιχης αραίωσης.

$$\text{CFU/g or ml} = \text{CFU/τρυβλίο} \times (\text{αραίωση})^{-1}$$

Παραδείγματα κανόνων αρίθμησης για Ενσωμάτωση

Αραίωση 10^{-2}	Αραίωση 10^{-3}	Αραίωση 10^{-4}	Αποτελέσματα αραιώσεων για ενσωμάτωση cfu/g ή ml
730	119	12	$119 \times 10^3 = 1,2 \times 10^5$
12	3	0	$12 \times 10^2 = 1,2 \times 10^3$
1280	470	12	$12 \times 10^4 = 1,2 \times 10^5$
280	65	4	$280 \times 10^2 = 2,8 \times 10^4$
250	48	5	$(250+480/2) \times 10^2 = 365 \times 10^2 = 3,7 \times 10^4$
340	52	8	$52 \times 10^3 = 5,2 \times 10^4$
0	0	0	$<10^2$
>30000	>3000	650	650×10^4

Παραδείγματα κανόνων αρίθμησης για Επίστρωση

Αραίωση 10^{-2}	Αραίωση 10^{-3}	Αραίωση 10^{-4}	Αποτελέσματα αραιώσεων για επίστρωση cfu/g ή ml
730	119	12	$119 \times 10^3 = 1,2 \times 10^5$
12	3	0	$12 \times 10^2 = 1,2 \times 10^3$
1280	470	12	$12 \times 10^4 = 1,2 \times 10^5$
140	65	4	$140 \times 10^2 = 1,4 \times 10^4$
120	18	5	$(120+180)/2 \times 10^2 = 150 \times 10^2 = 1,5 \times 10^4$
340	52	8	$52 \times 10^3 = 5,2 \times 10^4$
0	0	0	$<10^2$
>30000	>3000	380	380×10^4

Παραδείγματα κανόνων αρίθμησης

Αραίωση 10^{-2}	Αραίωση 10^{-3}	Αραίωση 10^{-4}	Αποτελέσματα αραιώσεων για <u>ενσωμάτωση</u> cfu/gr ή ml
1250	250	12	$250 \times 10^3 = 2,5 \times 10^5$
250 $(2 \times 250) \times 100 = 50000$	40 (40000)	25	$(250 + 400) / 2 \times 10^2 = 325 \times 10^2 = 3,3 \times 10^4$
251 $(2 \times 251) \times 100 = 52000$	120 (120000)	2	$251 \times 10^2 = 2,5 \times 10^4$
19	3	1	$19 \times 10^2 = 1,9 \times 10^3$

Αραίωση 10^{-2}	Αραίωση 10^{-3}	Αραίωση 10^{-4}	Αποτελέσματα αραιώσεων για <u>επίστρωση</u> cfu/gr ή ml
302	139	12	$139 \times 10^3 = 1,4 \times 10^5$
120	26	8	$120 \times 10^2 = 1,2 \times 10^4$
130	40	0	$130 \times 10^2 = 1,3 \times 10^4$
5	1	0	5×10^2

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΕΟΝ ΠΙΘΑΝΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ (Most Probable Number- MPN)

Σε αρκετές περιπτώσεις ο αριθμός των κυττάρων σε ένα δείγμα είναι πολύ χαμηλός και δεν μπορεί να καταμετρηθεί με τη μέθοδο των τρυβλίων. Π.χ. μπορεί υπάρχουν 5 αποικίες ανά 10 ή 100 ml ή g δείγματος, άρα λαμβάνοντας 1 ή 10 g δείγματος με τις μεθόδους ενσωμάτωσης ή επίστρωσης δεν θα εμφανιστεί καμία αποικία σε τρυβλίο.

Ωστόσο κάποιες φορές τα μικροβιολογικά όρια (π.χ. στο νερό) μπορεί να αφορούν την ύπαρξη έστω και 1 αποικίας σε 100 ή 250 ή 1000ml.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, εφαρμόζουμε τη **μέθοδο του πλέον πιθανού αριθμού (most probable number-MPN)**.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εκτίμηση του πληθυσμού ενός δείγματος υγρού ή στερεού τροφίμου, με βάση την παρουσία ή απουσία ανάπτυξης του μικροοργανισμού μετά από **3 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και εμβολιασμό σε μια σειρά 3πλών ή 5πλών δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.**

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΕΟΝ ΠΙΘΑΝΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ (Most Propable Number- MPN)

Η ανάλυση γίνεται σε 3 διαδοχικές αραιώσεις (συνήθως τις μικρότερες δυνατές), δηλαδή τις αραιώσεις 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} για υγρά, ή 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} για στερεά τρόφιμα και για κάθε αραιώση σημειώνουμε τον αριθμό των θετικών σωλήνων μετά από τον εμβολιασμό και την κατάλληλη επώαση του δείγματος.

Η τεχνική MPN είναι ένας **τρόπος έμμεσης εκτίμησης** του πληθυσμού πυκνότητας των ζωντανών μικροβίων σ'ένα δείγμα τροφίμου, με βάση αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας.

Η ακρίβεια της μεθόδου αυτής δεν είναι τόσο μεγάλη. Η ακρίβεια αυτής εξαρτάται από τον αριθμό των σωλήνων (επαναλήψεις).

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΕΟΝ ΠΙΘΑΝΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ (Most Propable Number- MPN)

Συνήθως χρησιμοποιούνται 3 ή 5 ή 10 σωλήνες. Για την εκτίμηση του MPN χρησιμοποιούνται ειδικοί πίνακες ή υπολογιστικά προγράμματα.

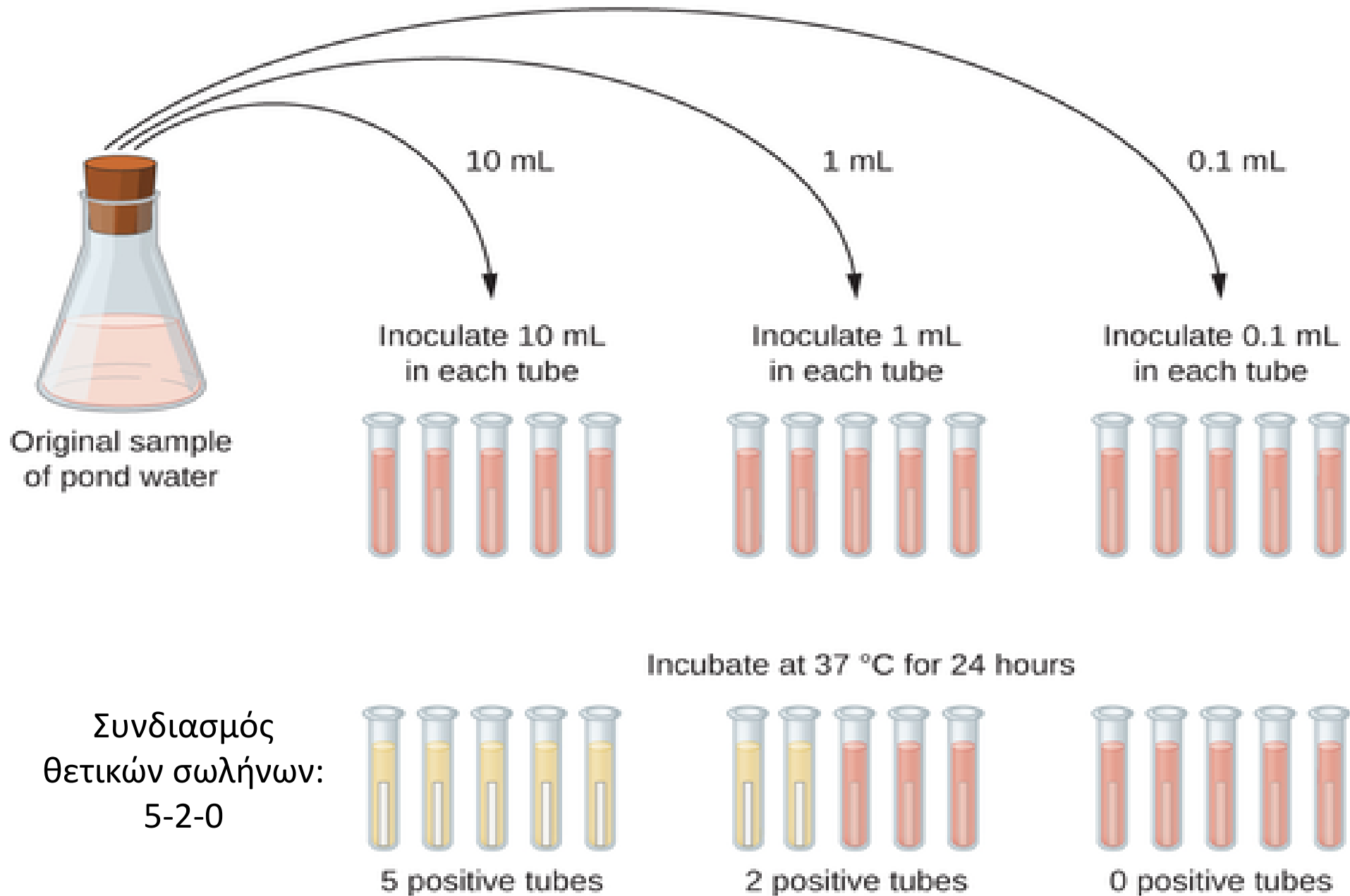
Η MPN εφαρμόζεται σε τρόφιμα με σχετικά μικρή μικροβιακή πυκνότητα (< 10 cfu/ml)

Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό είτε της ολικής μικροβιακής χλωρίδας ενός τροφίμου (Ο.Μ.Χ) είτε για την καταμέτρηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών, π.χ. των κολοβακτηριοειδών ή της *Salmonella* ή θειοαναγωγικών *Clostridium* στο νερό ή σε τρόφιμα.

Μεθοδολογία MPN

1. Παρασκευάζονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις δείγματος όπως και στην μέθοδο των τρυβλίων.
2. Συγκεκριμένος όγκος δείγματος (1ml) ενοφθαλμίζεται σε σωλήνες που περιέχουν κατάλληλο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (9ml).
3. Επώαση σε κλίβανους επώασης.
4. Ένας σωλήνας από μια αραιώση θεωρείται θετικός αν παρουσιάζει μικροβιακή ανάπτυξη. Η μικροβιακή ανάπτυξη διαπιστώνεται:
 - από τη θολερότητα του υποστρώματος
 - από την ύπαρξη ιζήματος κυττάρων στον πυθμένα του σωλήνα
 - με την ανίχνευση των μεταβολικών προϊόντων των μικροβίων (ανίχνευση παραγωγής αερίου, ανίχνευση οξέος ή βάσεως, αποχρωματισμό των υποστρωμάτων που περιέχουν δείκτες. κλπ)
5. Από τους θετικούς σωλήνες από κάθε αραιώση προκύπτει ένας αριθμός θετικών σωλήνων, που αντιστοιχεί σε έναν αριθμό MPN (πιθανό αριθμό αποικιών).
6. Ο αριθμός MPN πολλαπλασιάζεται με το αντίστροφο της μεσαίας αραιώσης για να υπολογιστεί το τελικό αποτέλεσμα για το δείγμα τροφίμου

Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου MPN (με χρήση 5πλων σωλήνων σε κάθε αραιώση)



Πίνακας με τιμές MPN για συνδυασμούς θετικών σωλήνων όταν ενοφθαλμίζονται σε 3 σωλήνες ανά αραίωση

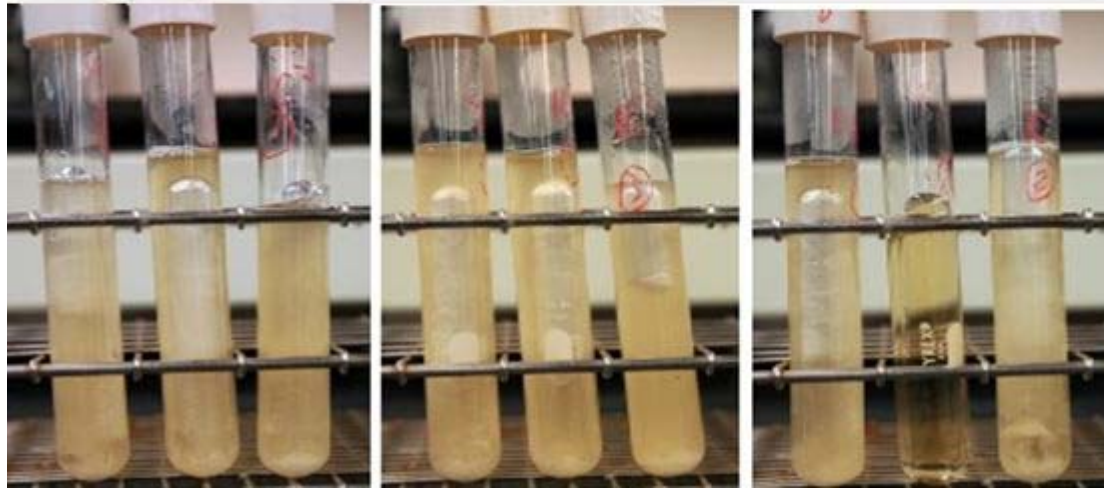
Αριθμός θετικών σωλήνων			MPN
0	0	0	< 0,03
0	0	1	0,03
0	0	2	0,06
0	0	3	0,09
0	1	0	0,03
0	1	1	0,061
0	1	2	0,092
0	1	3	0,12
0	2	0	0,062
0	2	1	0,093
0	2	2	0,12
0	2	3	0,16
0	3	0	0,094
0	3	1	0,13
0	3	2	0,16
0	3	3	0,19
1	0	0	0,036
1	0	1	0,072
1	0	2	0,11
1	0	3	0,15
1	1	0	0,073
1	1	1	0,11
1	1	2	0,15
1	1	3	0,19
1	2	0	0,11

Πίνακας με τιμές MPN για συνδυασμούς θετικών σωλήνων όταν ενοφθαλμίζονται σε 3 σωλήνες ανά αραιώση

1	2	1	0,15
1	2	2	0,2
1	2	3	0,24
1	3	0	0,16
1	3	1	0,2
1	3	2	0,24
1	3	3	0,29
2	0	0	0,091
2	0	1	0,14
2	0	2	0,2
2	0	3	0,26
2	1	0	0,15
2	1	1	0,2
2	1	2	0,27
2	1	3	0,34
2	2	0	0,21
2	2	1	0,28
2	2	2	0,35
2	2	3	0,42
2	3	0	0,29
2	3	1	0,36
2	3	2	0,44
2	3	3	0,53
3	0	0	0,23
3	0	1	0,39
3	0	2	0,64
3	0	3	0,95
3	1	0	0,43
3	1	1	0,75
3	1	2	1,2
3	1	3	1,6
3	2	0	0,93
3	2	1	1,5
3	2	2	2,1
3	2	3	2,9
3	3	0	2,4
3	3	1	4,6
3	3	2	11
3	3	3	> 24

Παραδείγματα υπολογισμού MPN (στερεό τρόφιμο)

Typical growth results observed for EC broth
Use these tubes to determine an MPN



10^{-1}

10^{-2}

10^{-3}

- Η παρουσία αερίου (CO_2) στους αντεστραμένους σωλήνες durham δείχνει θετικό αποτέλεσμα (π.χ. για την παρουσία *E. coli*).
- **Συνδυασμός θετικών σωλήνων: 2-3-2 αντιστοιχεί σε MPN = 0,44.** Η μεσαία αραιώση είναι η αραιώση (10^{-2}), δηλαδή εκεί που εμβολιάστηκε 1ml από δείγμα αραιωμένο 1/100.
- Άρα το τελικό αποτέλεσμα είναι $0,44 \times 10^2 = 44 \text{ cfu/g}$

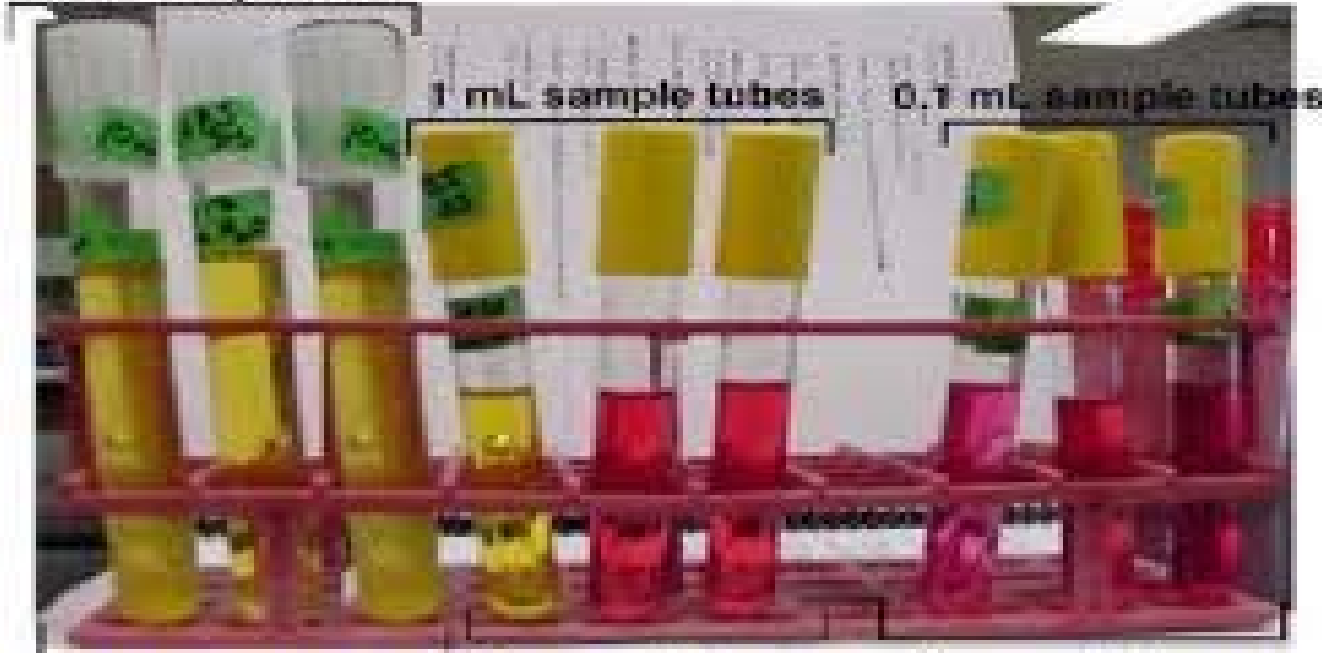
Παραδείγματα υπολογισμού MPN (υγρό τρόφιμο)

10πλάσιο δείγμα (10ml)= 10^1

Χωρίς Αραίωση (1 ml)= 10^0

Αραίωση 1/10 (0,1ml)= 10^{-1}

10 mL sample tubes



3 positives 1 positive 0 positives

- Στα υγρά μπορεί να εμβολιαστεί δείγμα χωρίς αραίωση (1ml) ή ακόμα και συμπυκνωμένο (αντί αραιωμένο δείγμα), δηλ. δείγμα 10ml όπως εδώ
- Συνδυασμός θετικών σωλήνων: 3-1-0 αντιστοιχεί σε MPN = 0,43. Η μεσαία αραίωση είναι η μηδενική αραίωση (10^0), δηλαδή εκεί που εμβολιάστηκε 1ml δείγμα χωρίς αραίωση.
- Άρα το τελικό αποτέλεσμα είναι $0,43 \times 1 = 0,43$ cfu/ml ή 43 cfu/100ml

Μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης (streaking) για την απομόνωση μεμονωμένων αποικιών

- Επιφανειακή επίστρωση (streaking): μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση μεμονωμένων αποικιών από μια μικτή ή καθαρή καλλιέργεια ώστε να χρησιμοποιηθούν σε βιοχημικές και μορφολογικές δοκιμές.
- Δεν χρησιμεύει στην καταμέτρηση αποικιών!
- Το δείγμα ή η καλλιέργεια μας αραιώνεται κάνοντας διαδοχικά streaking επάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου. Το εμβόλιο μας αραιώνεται σε τέτοιο βαθμό ώσπου στο τέλος παίρνουμε κάποιες μεμονωμένες αποικίες.

Streak Plate Method

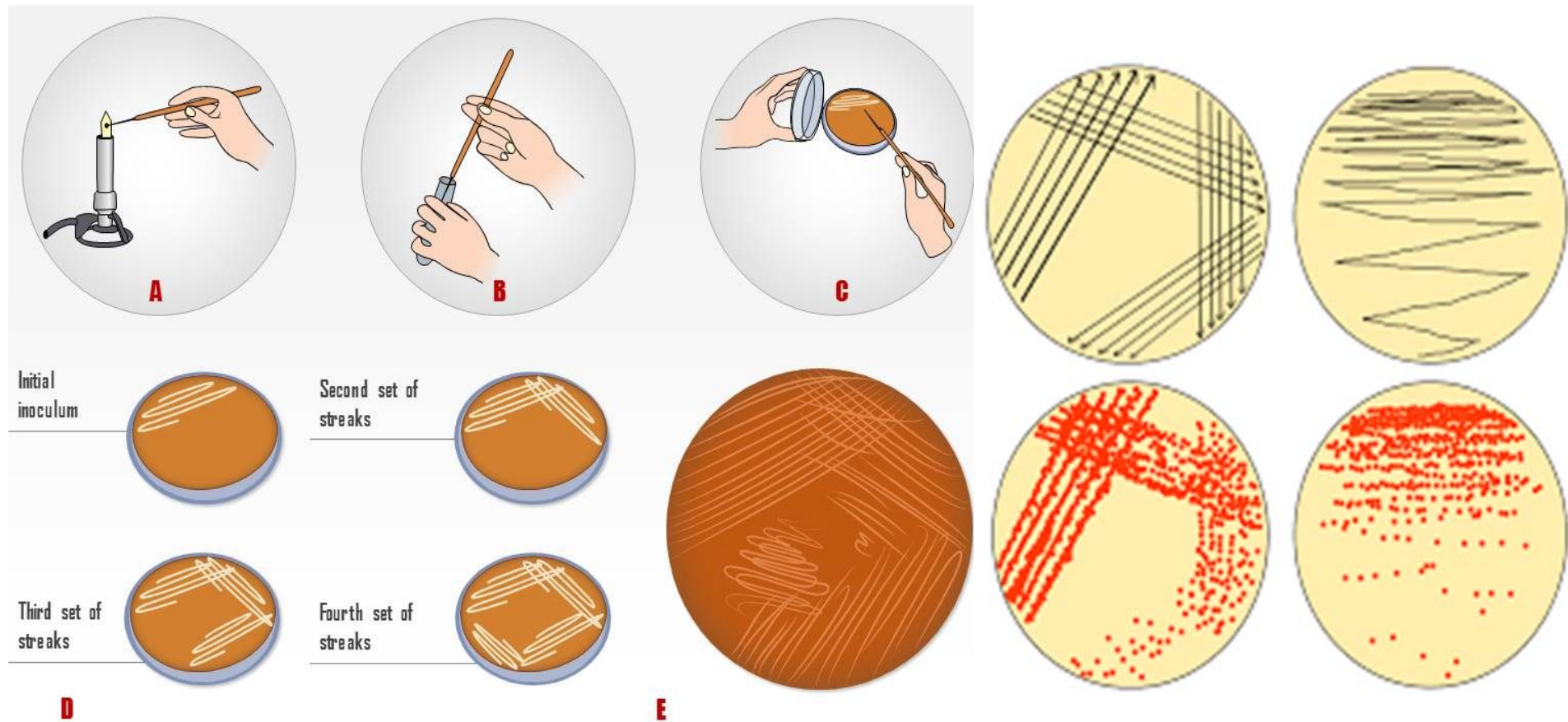


Επίστρωση streaking με κρίκο εμβολιασμού και εμφάνιση αποικιών μετά από επώαση

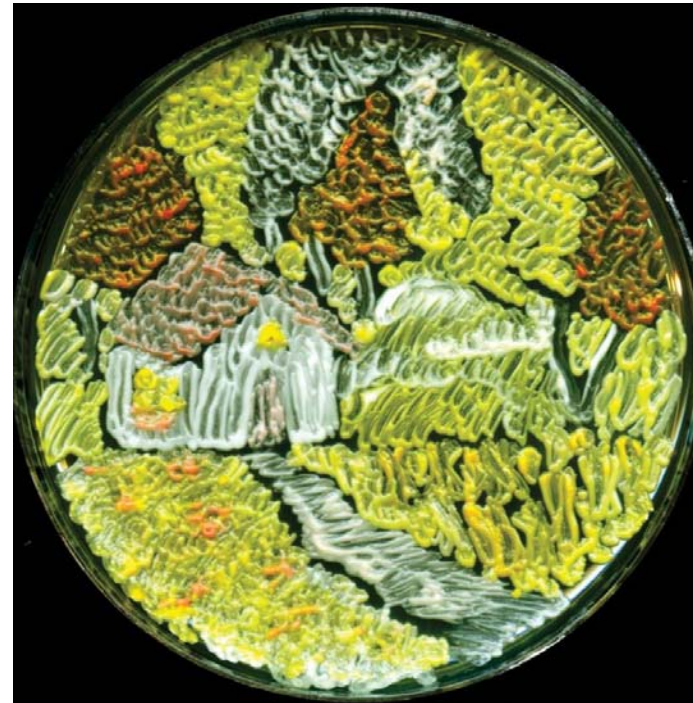
Σχηματική απεικόνιση επιφανειακής επίστρωσης (streaking)

<https://www.youtube.com/watch?v=oPl4ETb3vMg>

The Streak Plate Isolation Method



«Καλλιτεχνικός» Εμβολιασμός





Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Καταμέτρηση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΟΦΙΛΗ ΧΛΩΡΙΔΑ (ΟΜΧ)

Εισαγωγή

Τα τρόφιμα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας μόλυνσης και ρύπανσής τους είναι πάντοτε φορείς μικροβίων.

Ο συνολικός αριθμός μικροβίων ενός τροφίμου εξαρτάται από:

- ✓ τη χημική σύσταση (η παρουσία πρωτεϊνών, σακχάρων και βιταμινών διευκολύνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών)
- ✓ τις μηχανικές ιδιότητες και την υφή (μαλακά ή ρευστά τρόφιμα αλλοιώνονται πιο εύκολα)
- ✓ την περιεκτικότητά του σε παράγοντες που παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων (αλάτι, οργανικά οξέα, συντηρητικά, μπαχαρικά, αντιβιοτικά, κλπ)
- ✓ την περιεκτικότητά του σε υγρασία και κυρίως την ενεργότητα νερού (αναστολή ανάπτυξης μικροβίων σε $a_w < 0,62$)
- ✓ τον βαθμό έκθεσης του τροφίμου σε μόλυνση ή ρύπανση
- ✓ τον τρόπο επεξεργασίας αλλά και χειρισμού, σε όλο το διάστημα, που μεσολαβεί μεταξύ συγκομιδής ή παραγωγής και κατανάλωσής του

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΟΦΙΛΗ ΧΛΩΡΙΔΑ (ΟΜΧ)

Εισαγωγή

Τα επεξεργασμένα τρόφιμα δηλαδή αυτά που έχουν υποστεί ξήρανση - αφυδάτωση, ψύξη - κατάψυξη, προσθήκη συντηρητικών, ακτινοβολήση, κονσερβοποίηση, φέρουν πολύ μικρότερο μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τα μη επεξεργασμένα.

Το μικροβιακό φορτίο είναι μια μεταβλητή των τροφίμων με ιδιαίτερη σημασία για τον **προσδιορισμό της ποιότητας**. Είναι ένα ποιοτικό χαρακτηριστικό, η τιμή του οποίου **βρίσκεται σε αντίστροφη σχέση με την ποιότητα***: όσο μικρότερο είναι το μικροβιακό φορτίο τόσο καλύτερο, ποιοτικά, είναι το τρόφιμο.

* Με εξαίρεση τα ζυμούμενα τρόφιμα, όπου αυξημένο μικροβιακό φορτίο αποτελείται από τα μικρόβια που πραγματοποιούν την ζύμωση του προϊόντος.

ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΟΦΙΛΗ ΧΛΩΡΙΔΑ (ΟΜΧ)

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα – ΟΜΧ (Total Plate Count): είναι ο πληθυσμός των **αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων**, τα οποία με τη χρήση μη εκλεκτικού υποστρώματος και σε ορισμένη θερμοκρασία και χρόνο επώασης μπορούν να αναπτυχθούν και να δώσουν από μία ορατή αποικία.

Η ΟΜΧ έχει ως σκοπό την εκτίμηση της συνολικής υγιεινής κατάστασης των τροφίμων και του νερού, και της τυχόν αλλοίωσης (μη ζυμούμενων) τροφίμων, καθώς και την αποτελεσματικότητα των επεργασιών συντήρησης τροφίμων (π.χ. παστερίωση τροφίμων, χλωρίωση νερού, κλπ).

Η ΟΜΧ δεν αφορά σε μέτρηση παθογόνων μικροβίων, αν και δεν αποκλείεται μέσα στον πληθυσμό της ΟΜΧ να υπάρχουν και κάποια παθογόνα (τα οποία όμως μπορούν να προσδιοριστούν μόνο με άλλα, εκλεκτικά υποστρώματα)

Η ανεύρεση πολύ μεγάλου πληθυσμού ΟΜΧ σε ένα τρόφιμο, φανερώνει συνθήκες επεξεργασίας και συντήρησης μη ικανοποιητικές.

Γενικά για τα τρόφιμα υπάρχουν κανονισμοί, αγορανομικές διατάξεις και κριτήρια (standards), που καθορίζουν, για κάθε προϊόν, τα όρια ανοχής σε μικρόβια.

Αν ένα τρόφιμο έχει μικροβιακό φορτίο ΟΜΧ $10^7 - 10^8$ cfu/g, αναμένουμε πως θα έχει εισέλθει στο στάδιο της αλλοίωσης.

Με την εκτίμηση της ΟΜΧ μπορούν να γίνουν προβλέψεις για την πιθανή εμπορική ζωή του τροφίμου και να εξαχθούν συμπεράσματα για τις συνθήκες, κάτω από τις οποίες το τρόφιμο επεξεργάστηκε, συσκευάστηκε και διακινήθηκε ως τον καταναλωτή.

Επίσης, ανάλογα με το προϊόν, κι εφόσον υπάρχουν αυστηρά, νομικά όρια ή προτεινόμενα ενδεικτικά όρια για ένα προϊόν, η κάθε βιομηχανία μπορεί να κάνει αυτοέλεγχο μετρώντας την ΟΜΧ σε προϊόντα της.

Ενδεικτικά όρια Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας για την ΟΜΧ σε τρόφιμα

- ΟΜΧ σε νωπό κρέας: $<5 \times 10^6$ cfu/g
- ΟΜΧ σε αλλαντικά από σύγκοπτο κρέας (π.χ. λουκάνικα παστεριωμένα): 5×10^4 cfu/g
- ΟΜΧ σε αλλαντικά παστεριωμένα από αυτούσιο τεμάχιο (π.χ. καπνιστό ψαρονέφρι): 10^4 cfu/g
- ΟΜΧ σε παστεριωμένο γάλα: $m=5 \times 10^4$ cfu/ml, $M=5 \times 10^5$ cfu/ml, $c=1$
- ΟΜΧ (ψυχρόφιλα, $22\text{C} \times 48\text{h}$) σε εμφιαλωμένο νερό: 100 cfu/ml
- ΟΜΧ (θερμόφιλα, $37\text{C} \times 48\text{h}$) σε εμφιαλωμένο νερό: 20 cfu/ml

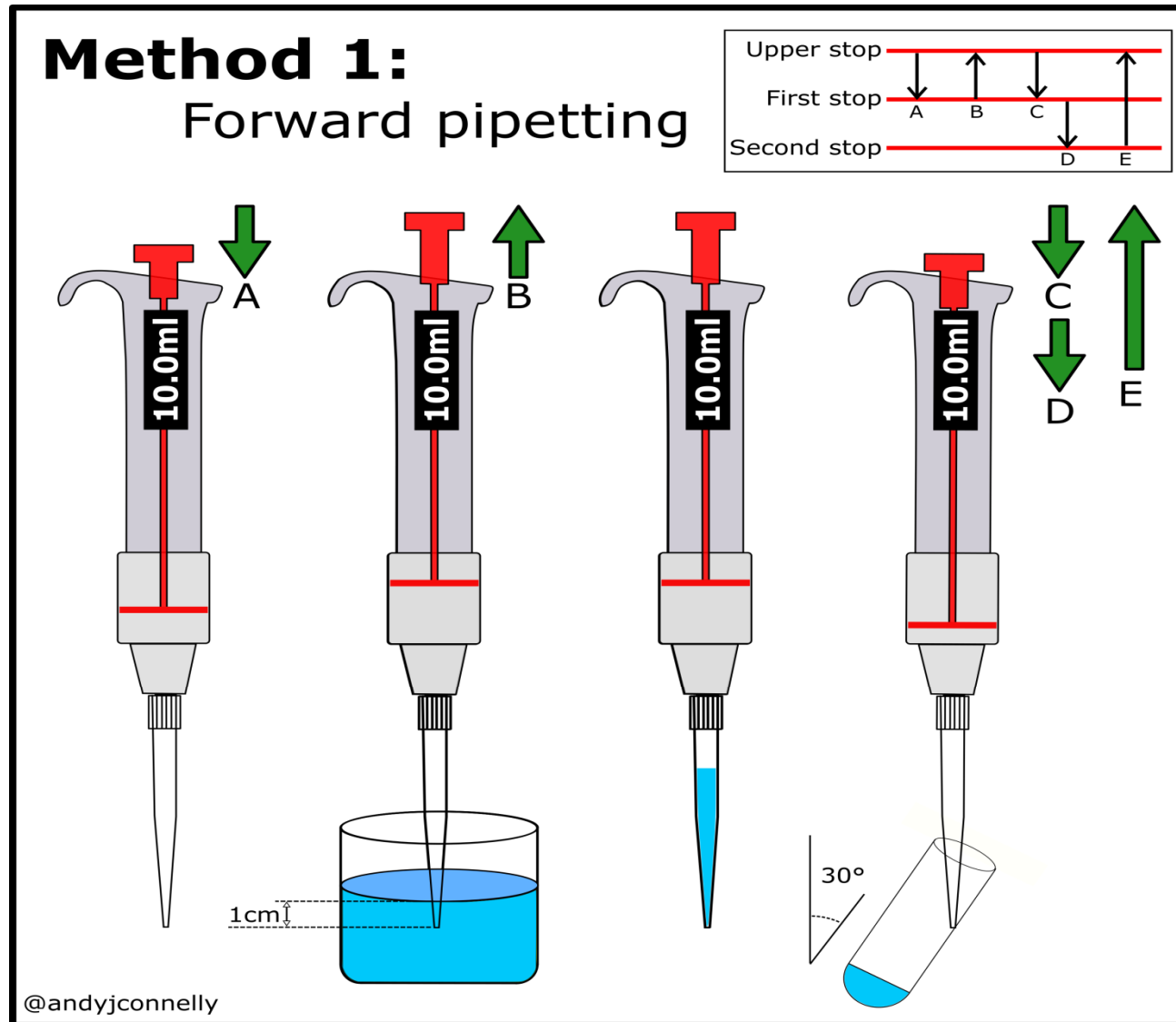
Πειραματικό Μέρος – Μέτρηση ΟΜΧ με εμβολιασμό σε τρυβλία

Η καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας πραγματοποιείται στο υπόστρωμα Plate Count Agar είτε με την μέθοδο της ενσωμάτωσης είτε με την μέθοδο της επίστρωσης. Η επώαση των τρυβλίων γίνεται συνήθως στους 30-32°C για έως 72h ή στους 35 - 37°C για 48h (σε κάποιες συγκεκριμένες περιπτώσεις) ή και καταμετρούμε όλες τις αποικίες που εμφανίζονται στο τρυβλίο μας, ασχέτως μεγέθους, σχήματος ή χρώματος αποικιών (εκτός από τυχόν μύκητες που μπορεί να εμφανιστούν).

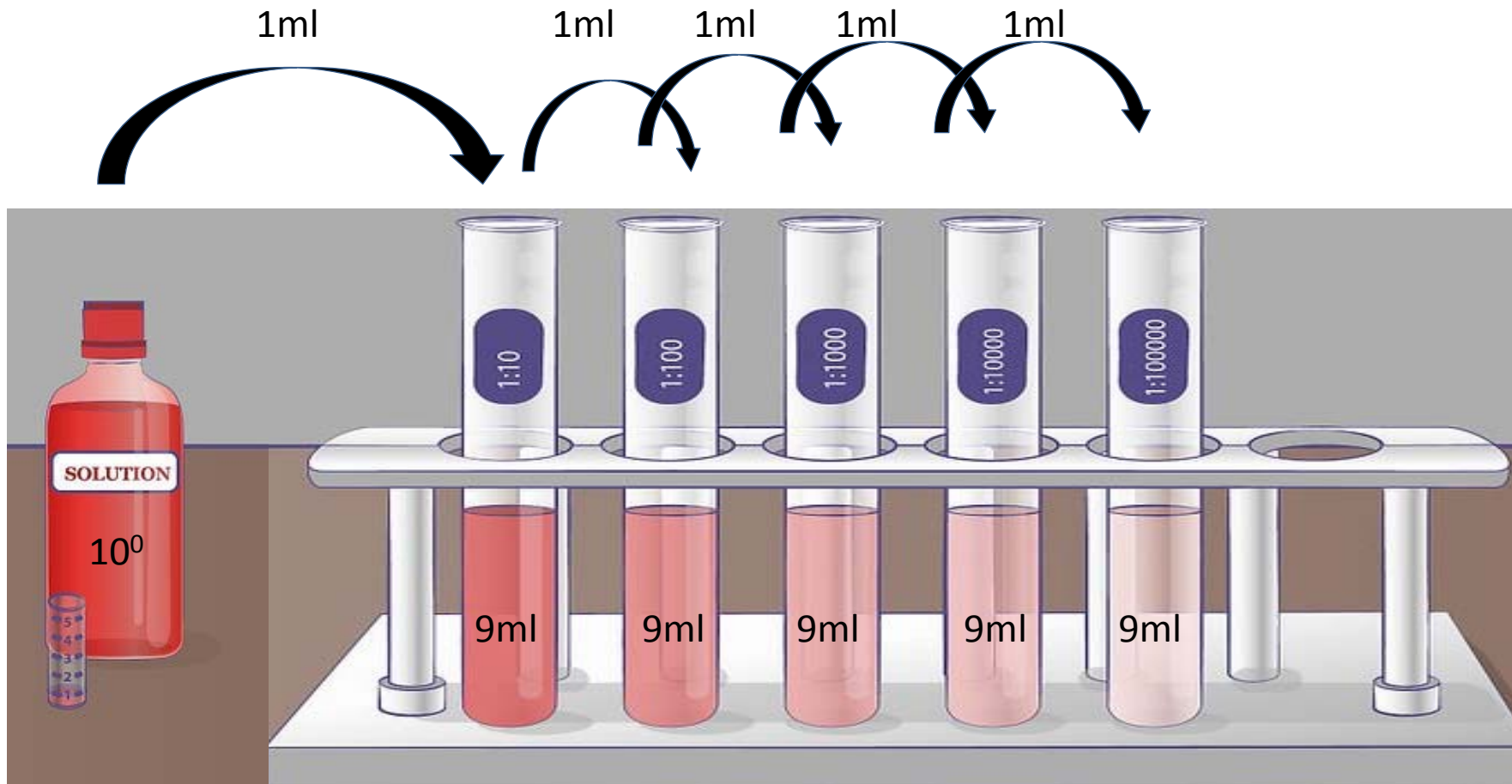


Τρυβλίο με PCA για την μέτρηση της ΟΜΧ

Σχηματική απεικόνιση μηχανικής πιπέτας και ο τρόπος που πρέπει να «πιπετάρουμε» το δείγμα μας, τόσο για τη δημιουργία δεκαδικών αραιώσεων, όσο και για τον εμβολιασμό που θα ακολουθήσει



Δημιουργία δεκαδικών αραιώσεων



Όταν έχουμε ένα υγρό τρόφιμο(αραιώση 10^0) η πρώτη δεκαδική αραιώση στον δοκιμαστικό σωλήνα είναι η 10^{-1} , σε αντίθεση με ένα στερεό τρόφιμο όπου η πρώτη δεκαδική αραιώση στον δοκιμαστικό σωλήνα είναι η 10^{-2} .

Στάδια μικροβιολογικής ανάλυσης απαστερίωτου γάλακτος για καταμέτρηση της ΟΜΧ

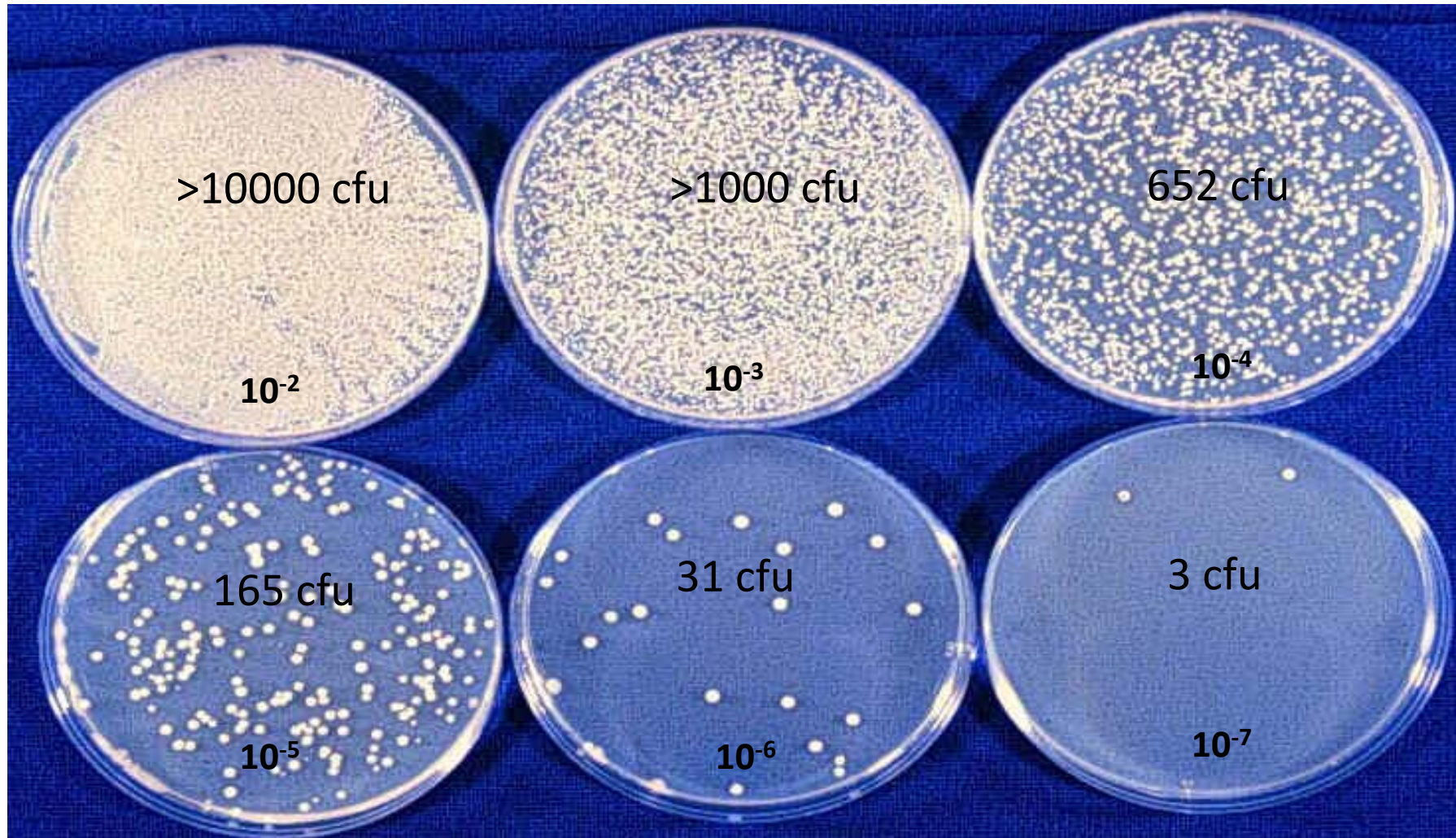


Στάδια μικροβιολογικής ανάλυσης παστεριωμένου αλλαντικού για καταμέτρηση της ΟΜΧ

1. Δειγματοληψία και Δεκαδικές αραιώσεις 2. Εμβολιασμός 3. Επώαση και καταμέτρηση



Αποικίες ΟΜΧ έπειτα από εμβολιασμό διαφορετικών δεκαδικών αραιώσεων με ενσωμάτωση και επώαση των τρυβλίων



Τελικό αποτέλεσμα ΟΜΧ για το τρόφιμο = $(165+310)/2 \times 10^5 \text{ cfu/ml} = 237,5 \times 10^5 \text{ cfu/ml} = 2,4 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

Απομόνωση, Ανίχνευση και Καταμέτρηση του *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* (Σταφυλόκοκκος ο χρυσίζων) ανήκει στο γένος *Staphylococcus*, της οικογένειας *Micrococcaceae*.

Ο *Staphylococcus aureus* είναι *Gram* θετικός κόκκος, που διατάσσεται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς, σε τετράδες άτακτα.

Είναι κόκκος ακίνητος, άσπορος, αερόβιος και χωρίς έλυτρο.



Φυσικός Βιότοπος

Οι σταφυλόκοκκοι είναι πολύ διαδεδομένοι στο περιβάλλον.

Ως κύρια πηγή τους θεωρείται:

- ✓ το δέρμα, γενικά, του ανθρώπου και των ζώων
- ✓ ο βλεννογόμος του ρινοφάρυγγα, τα αυτιά, τα μαλλιά
- ✓ τα αποστήματα (πληγές στο δέρμα)

Αποτελούν μία από τις κυριότερες αιτίες τροφικών δηλητηριάσεων σε πολλές χώρες του κόσμου και το πρόβλημά τους είναι από τα πιο σημαντικά στην υγιεινή των τροφίμων.

Η ασθένεια οφείλεται σε μια θερμοάντοχη εντεροτοξίνη που παράγει ο *S. aureus* σε θερμοκρασία $>8^{\circ}\text{C}$ και συνήθως αφού φτάσει σε πληθυσμό $>100.000 - 500.000$ cfu/g

Προσοχή: Ο *S. aureus* (όπως τα περισσότερα παθογόνα) δεν προκαλεί αλλοίωση στα τρόφιμα

Εντεροτοξίνες που παράγονται από τον *S. aureus*

Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση (σταφυλοκοκκίαση) οφείλεται στην κατανάλωση τροφίμων, που μέσα τους έχουν παραχθεί, από στελέχη σταφυλόκοκκων, **εντεροτοξίνες (εξωτοξίνες)** οι οποίες είναι απλές πρωτεΐνες.

Οι εντεροτοξίνες του *S. aureus*:

- Δεν καταστρέφονται τελείως με βρασμό για 30 min, ενώ καταστρέφονται στους 120°C x20 -30 min.
- Είναι πολύ τοξικές, με άμεση δράση (χρόνος επώασης 1-3h) και συμπτώματα γαστρεντερίτιδας.
- Οι συνθήκες του τροφίμου (aw, pH, σύσταση) ή οι επεξεργασίες του, ελαττώνουν ή εξαφανίζουν των πληθυσμό του *S.aureus* αλλά δεν επιδρούν στις εντεροτοξίνες.
- Δεν είναι σπάνιο να συμβεί κρούσμα σταφυλοκοκκικής τροφοτοξίνωσης, από τρόφιμο στο οποίο δεν ανιχνεύονται ζωντανοί σταφυλόκοκκοι. Γιατί;

Τύποι εντεροτοξινών

Υπάρχουν διάφοροι αντιγονικοί τύποι εντεροτοξινών, που σημειώνονται με τα γράμματα A, B, C, D κ.λ.π.

- Συχνότερα συναντάται ο τύπος A, που συνδέεται κυρίως με τη σταφυλοκοκκική τοξίνωση
- Ο τύπος B, που συνδέεται, πιθανότερα, με την πρόκληση εντερίτιδας
- οι τύποι C και D, που μεταξύ τους παρατηρούνται “διασταυρούμενες” αντιδράσεις.

Συνήθεις τρόποι μόλυνσης με *S. aureus*

Η μόλυνση των τροφίμων με σταφυλόκοκκους οφείλεται συνήθως στον άνθρωπο και τα ζώα μέσω δερματικής επαφής.

Συνήθως εμφανίζεται σε κρέας (μόλυνση από το δέρμα ζώων και ανθρώπων κατά τη σφαγή και τεμαχισμό), γάλα-τυριά (μόλυνση από μαστό και δέρμα ζώων και δέρμα ανθρώπου) και έτοιμα φαγητά (μόλυνση από δέρμα ανθρώπων)

Ιδιαίτερη σημασία έχει η μόλυνση μετά την παρασκευή τους και μάλιστα όταν τα τρόφιμα παραμένουν αρκετές ώρες σε ευνοϊκή θερμοκρασία για την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων.

Προσδιορισμός *S. aureus* σε τρόφιμα και επιφάνειες (δέρμα)

Ο προσδιορισμός του *S. Aureus* γίνεται για τους εξής λόγους:

- 1. Σε περίπτωση που έχει προκληθεί τροφική δηλητηρίαση, για να εξετασθεί εάν ο *S. aureus* ήταν ο μικροοργανισμός, που την προκάλεσε και σε τι πληθυσμό ήταν στο τρόφιμο (εναλλακτικά προσδιορίζεται απευθείας η παρουσία τοξίνη).**
- 2. Για να προσδιορισθεί ο κίνδυνος πρόκλησης τροφικής δηλητηρίασης μέσω τροφίμων ή δέρματος**

Τρόφιμα που περιέχουν 10^6 cfu/g μπορεί να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί τροφική δηλητηρίαση και από τρόφιμα που περιέχουν 50.000 cfu/g.

3. Για να διαπιστωθεί τυχόν επιμόλυνση του τροφίμου μετά τη θερμική του επεξεργασία.

Στις περιπτώσεις αυτές η μόλυνση προέρχεται από το προσωπικό του εργοστασίου ή από μη κατάλληλη μεταχείριση του προϊόντος. Συνήθης είναι η παρουσία του *S. aureus* στα νωπά τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Το νωπό κρέας, ο κιμάς, τα πουλερικά, το νωπό γάλα, τα μη παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, μερικές φορές, φέρουν αυξημένο πληθυσμό του *S. aureus*.

4. Για να διαπιστωθεί εάν κάποιοι άνθρωποι (π.χ. εργαζόμενοι σε γραμμή παραγωγής) είναι φορείς του *S. aureus*

Περίπου 1 στους 3-4 ανθρώπους είναι μόνιμα ή περιστασιακά φορέας του *S. aureus*. Για αυτό είναι σημαντική η χρήση γαντιών στην γραμμή παραγωγής ευαίσθητων ζωικών προϊόντων

Βιοχημικές δοκιμές για την επιβεβαίωση του *S. aureus*

Ο *S. aureus* παράγει:

- 1) Το ένζυμο **καταλάση**, που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο. Η καταλάση παράγεται από όλα τα είδη των Σταφυλόκοκκων και είναι βασικό διαχωριστικό χαρακτηριστικό τους από τους Στρεπτόκοκκους, που αντίθετα δεν την παράγουν.
- 2) Το ένζυμο **κοαγκουλάση ή πηκτάση**, που είναι δύο ειδών, η εξωκυττάρια ή ελεύθερη και η συνδεδεμένη, προσκολλημένη στο κυτταρικό τοίχωμα. Η παραγωγή κοαγκουλάσης είναι η βασική διαχωριστική ιδιότητα του *S. aureus* από την ομάδα των κοαγκουλάση αρνητικών Σταφυλόκοκκων (CNS).



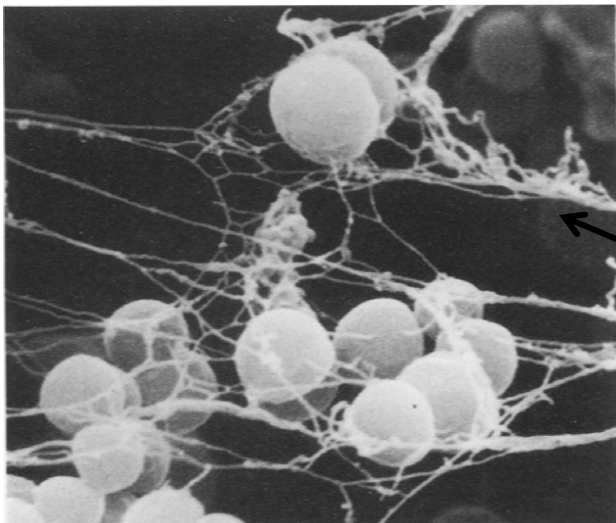
- 3) Μια **θερμοανθεκτική δεσοξυριβονουκλεάση (Dnase)**. Η ιδιότητα αυτή είναι χαρακτηριστική του *S.aureus*, όπως και η παραγωγή κοαγκουλάσης.
- 4) **Παράγει λεκιθινάση** με την οποία διασπάει τη λεκιθίνη (σόγιας ή αυγού)
- 5) Διασπά τη γλυκόζη και τη **μαννιτόλη** κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (η διάσπαση μανιτόλης χρησιμοποιείται ως κριτήριο διαχωρισμού από άλλα βακτήρια)

Staphylococcus epidermidis

Ο *S. epidermidis* είναι Gram θετικός κόκκος, άσπορος, αερόβιος, ακίνητος, με λεπτό έλυτρο, ο οποίος διατάσσεται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς ή άτακτα.

Αναπτύσσεται σε κοινά, εμπλουτισμένα και εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C.

Μερικά στελέχη παράγουν μια βλενώδη ουσία (slime) και κάνουν γλοιώδεις αποικίες.



Slime ή αλλιώς βιοφίλμ του *S.epidermidis* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Staphylococcus epidermidis

Παράγει το ένζυμο καταλάση ενώ **δεν παράγει κοαγκουλάση ούτε θερμοανθεκτική δεοξυριβονουκλεάση και δε διασπά τη μαννιτόλη**. Με τις ιδιότητες αυτές το διαχωρίζουμε από τον *S.aureus*.

Επίσης παράγει μια αιμολυσίνη που μοιάζει με τη δ-τοξίνη του *S.aureus* και ονομάζεται ε-τοξίνη.

Η παθογόνος δράση του *S. epidermidis* οφείλεται στις δύο βασικές βιολογικές του ιδιότητες, την προσκολλητική ικανότητα και την παραγωγή βλέννας (slime). Οι βλεννώδεις ουσίες που παράγει τον προστατεύουν από τη δράση των αντιβιοτικών.

Προσδιορισμός του *S. aureus* σε τρόφιμα

Ο προσδιορισμός του *S. aureus* μπορεί να γίνει με 2 τρόπους ανάλογα με τον πληθυσμό που περιμένουμε να έχει το προς εξέταση δείγμα:

1. Αν ο πληθυσμός που περιμένουμε είναι $>100/g$ κάνουμε **καταμέτρηση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker Agar**, στο οποίο προσθέτουμε supplement **egg yolk tellurite**, ή **rabbit plasma fibrinogen (RPF)**.
 - Το **egg yolk tellurite** προστίθεται σαν εκλεκτικός παράγοντας και δίνει το χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα στις αποικίες αλλά και στη δημιουργία της χαρακτηριστικής άλω γύρω από την αποικία, λόγω υδρόλυσης της λεκιθίνης του αυγού (ο *S. aureus* παράγει λεκιθινάση). Απαιτείται και επιβεβαίωση των ύποπτων αποικιών με ανοσολογικό τεστ οροσυγγόλλησης.
 - Το **rabbit plasma fibrinogen** περιέχει μια πρωτεΐνη, το ινογόνο, το οποίο υδρολύεται από την πηκτάση (ή κουαγκουλάση) με αποτέλεσμα οι αποικίες να εμφανίζουν διάφανη άλω υδρόλυσης του ινογόνου που αποτελεί ένδειξη παραγωγής πηκτάσης. Δεν απαιτείται στη συνέχεια το τεστ οροσυγκόλλησης.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε **cfu/g** ή **cfu/ml**

Ο εμβολιασμός του δείγματος γίνεται με επίστρωση

2. Αν ο πληθυσμός που περιμένουμε είναι μικρός (<10 cfu/g) τότε εφαρμόζουμε τη μέθοδο **MPN**. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε **cfu/g** ή **cfu/ml**

Προσδιορισμός του *S. aureus* σε επιφάνειες

Ο προσδιορισμός του *S. aureus* σε επιφάνειες μπορεί να γίνει με 2 τρόπους ανάλογα με το μέγεθος της επιφάνειας προς εξέταση:

1. Αν η επιφάνεια είναι μικρή (αυτιά, μύτη) χρησιμοποιούμε **αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στείλεό** (μπατονέτα)
2. Αν η επιφάνεια είναι μεγάλη (επιφάνεια τραπέζιου, σφάγγιου ή δέρματος κρέατος, πουλερικών, κλπ) χρησιμοποιούμε **αποστειρωμένο σπόγγο** (κομμάτι τύπου vetex ~10x10 cm)

Σημαντικό : Λαμβάνουμε δείγμα από συγκεκριμένη επιφάνεια, είτε:

- 10 cm² (π.χ. 2x5 cm), που μεταφέρεται σε 10ml αραιωτικό υγρό MRD
- 100 cm² (π.χ. 20x5 cm, ή (10x10cm), που μεταφέρεται σε 100ml αραιωτικό υγρό MRD

Αυτή η πρώτη μεταφορά σε υγρό δεν λογίζεται ως δεκαδική αραιώση, αλλά ως μηδενική αραιώση. **Δηλαδή όσα κύτταρα υπήρχαν σε 10cm² ή 100cm², θα υπάρχουν πλέον σε 10ml, ή 100ml, αντίστοιχα.**

Στη συνέχεια γίνονται κανονικά οι δεκαδικές αραιώσεις με 1ml δείγμα + 9ml MRD, εμβολιασμός σε τρυβλία και εκφράζουμε το τελικό αποτέλεσμα σε **cfu/cm²**

Εμφάνιση αποικιών

Η επώαση γίνεται σε αερόβιες συνθήκες, στους 37°C x 48h.

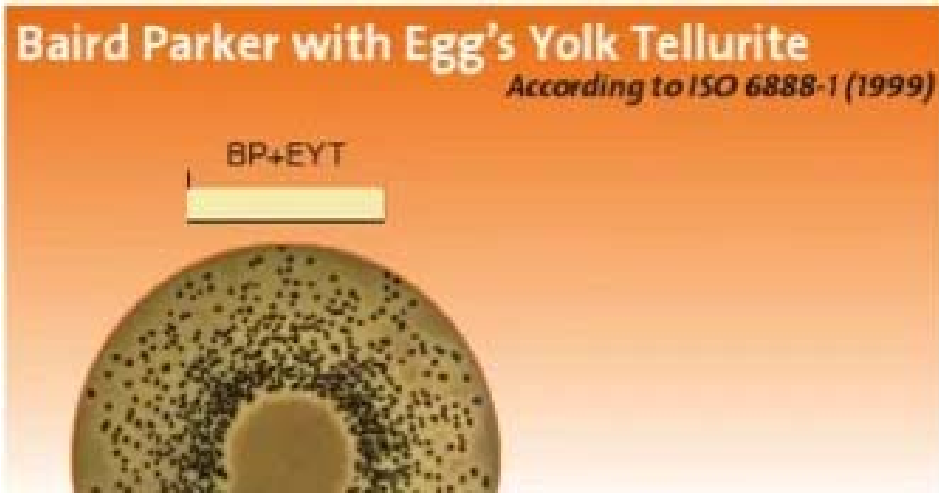
Οι αποικίες του *S.aureus* είναι μαύρες με διαφανή άλω.



- *S. aureus*
- *S. epidermidis*

Η χαρακτηριστική διάφανη άλω γύρω υπάρχει γύρω από τις μαύρες αποικίες του *S.aureus*, αλλά όχι του *S. epidermidis*

Εμφάνιση αποικιών σε BPA με egg yolk tellurite ή rabbit plasma fibrinogen (Πηγή: Scharlau)



24-48 hours
(37 ±1)°C

Characteristic and/or non-characteristic colonies

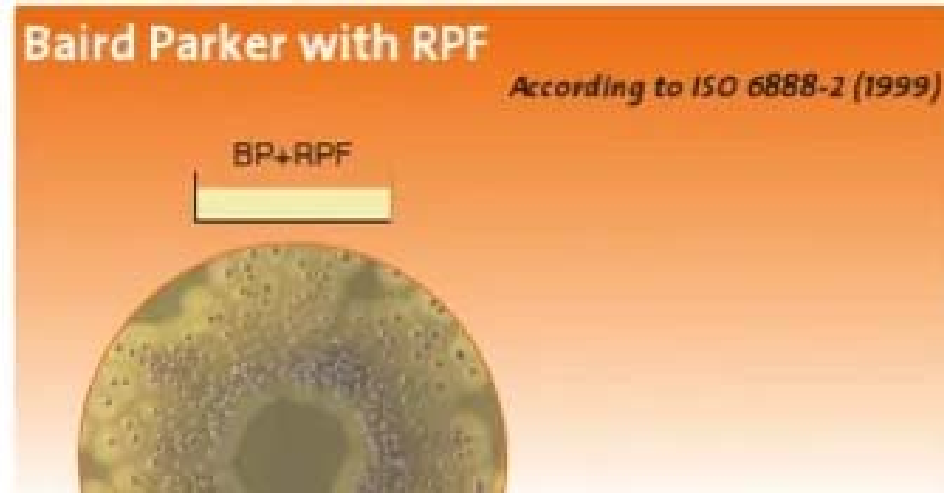
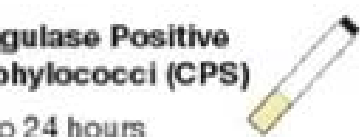
BHI (Brain Heart Infusion)



(24 ±2) hours
(37 ±1)°C

Coagulase

- + **Coagulase Positive Staphylococci (CPS)**
- Up to 24 hours
(37 ±1)°C
- **Others**



24-48 hours
(37 ±1)°C

+ **Coagulase Positive Staphylococci (CPS)**

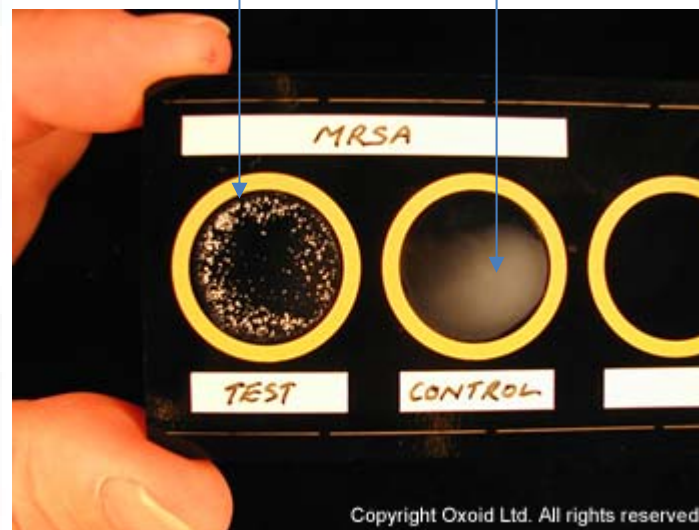
Ανοσολογικό τεστ οροσυγκόλλησης (latex test)

Μετά την καλλιέργεια Baird Parker agar + egg yolk tellurite, απαιτείται επιβεβαίωση των ύποπτων αποικιών με βιοχημικές δοκιμές που περιγράφονται παρακάτω ή με ανοσολογικό **τεστ οροσυγκόλλησης (latex test)**, όπου η ύποπτη αποικία μεταφέρεται σε αποστειρωμένο χάρτινο δίσκο, ομογενοποιείται με φυσιολογικό ορό, και σε αυτό προστίθεται διάλυμα με αντίσωμα του *S. aureus*, το οποίο όταν ενωθεί με αντιγόνο του *S. aureus* (που υπάρχει σε όλα τα κύτταρα του *S. aureus*) δημιουργεί πήγμα οροσυγκόλλησης που είναι εμφανές εντός 2 λεπτών.



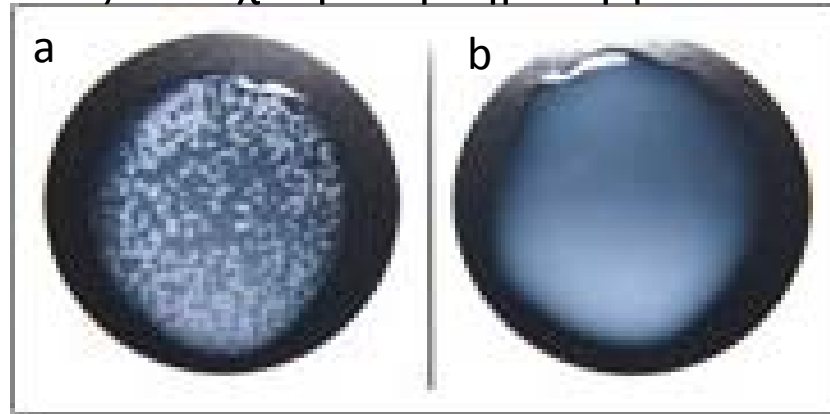
Θετικό τεστ οροσυγκόλλησης

αρνητικό τεστ οροσυγκόλλησης

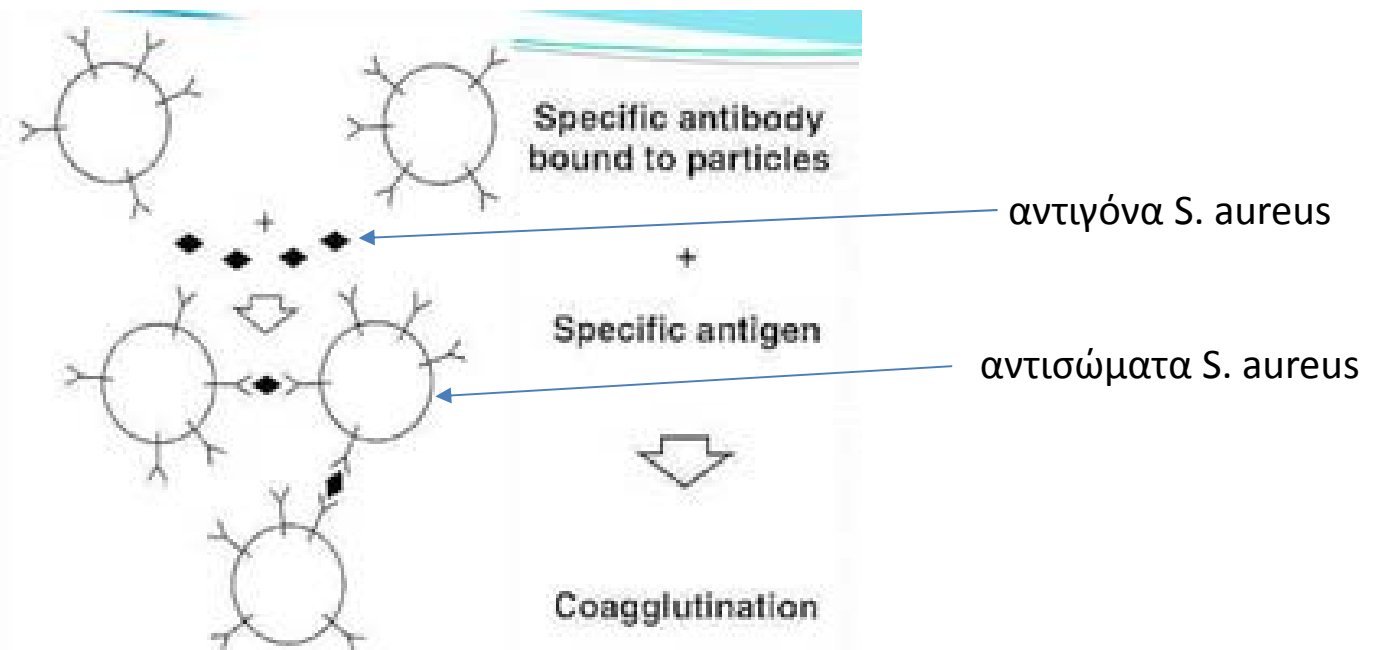


Ανοσολογικό τεστ οροσυγκόλλησης (latex test)

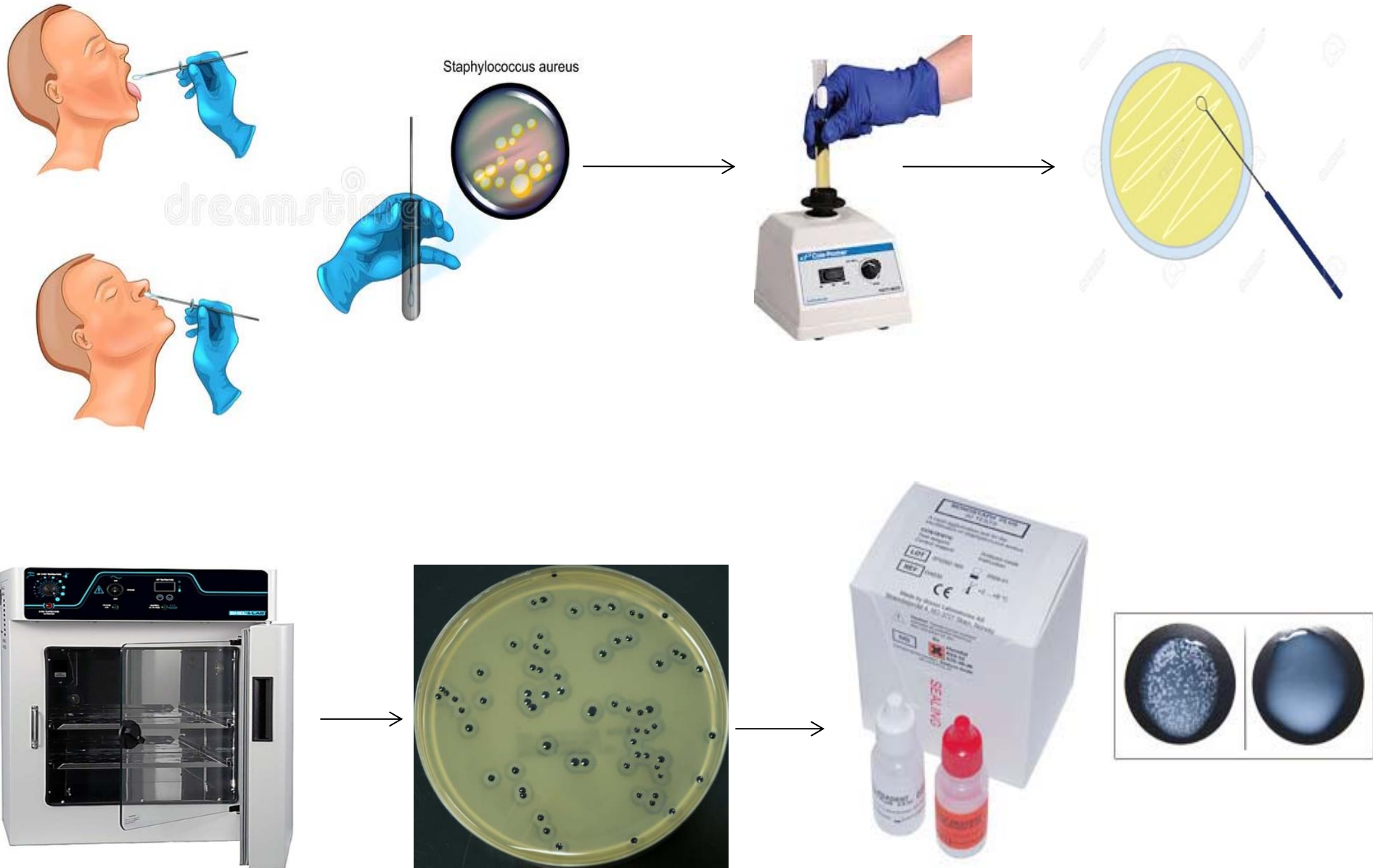
Το (a) είναι θετικό για *S. aureus* (έχουμε τον χαρακτηριστικό σχηματισμό πήγματος όπου δημιουργείται από την ένωση του αντιγόνου – αντισώματος. Το (b) είναι αρνητικό καθώς δεν έχουμε τη δημιουργία του πήγματος



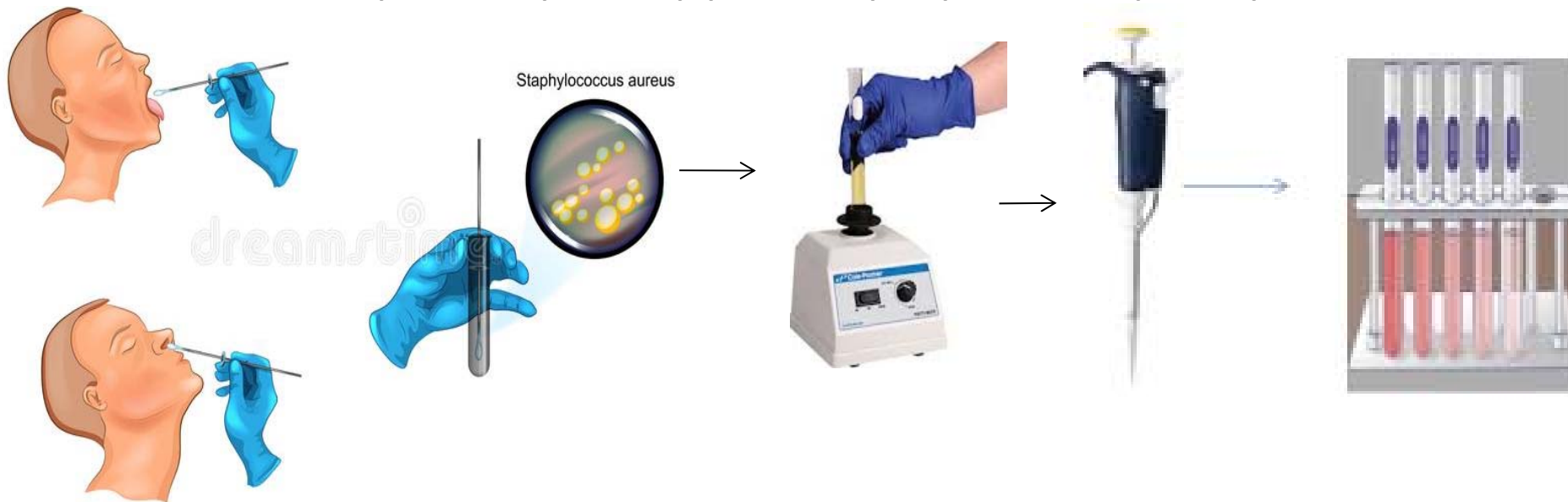
Όταν υπάρχουν αντιγόνα *S. aureus* (στα κύτταρα υπό εξέταση) και συνδεθούν με αντισώματα *S. aureus* (στο αντιδραστήριο), τότε σχηματίζεται πήγμα λόγω συγκόλλησης αντιγόνων με αντισώματα



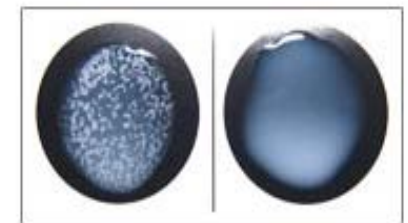
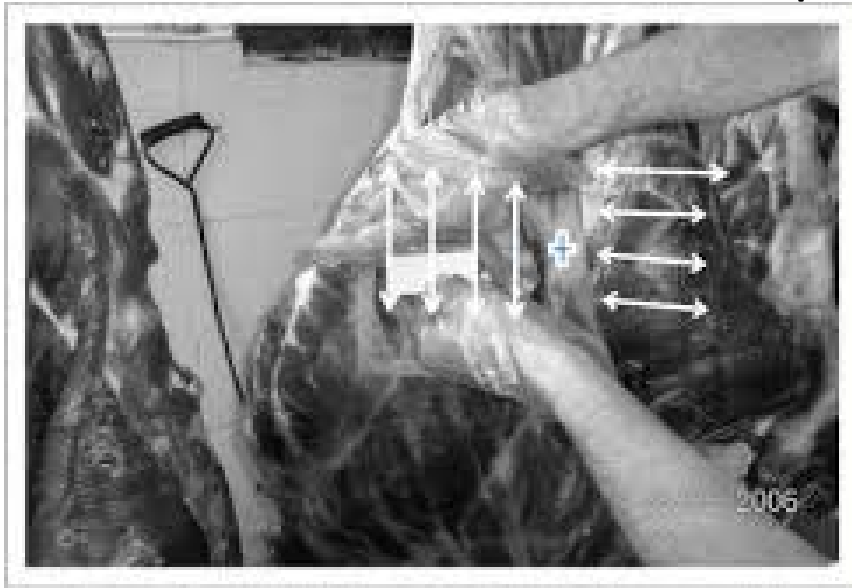
Δειγματοληψία με σπειλεό και ανίχνευση με streaking



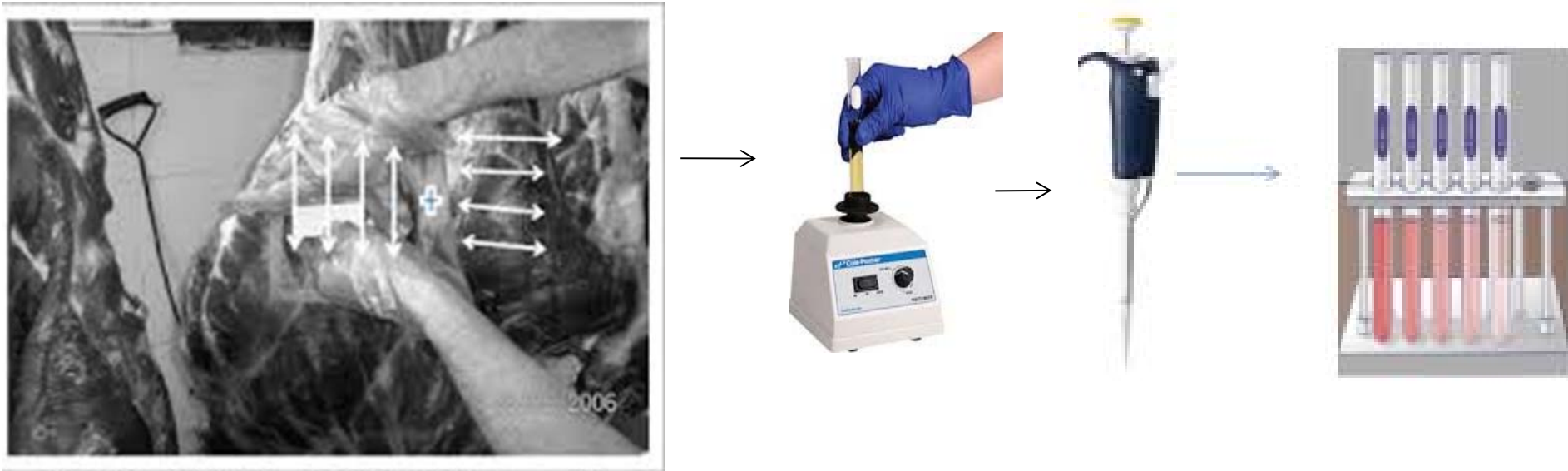
Δειγματοληψία με στείλεό και καταμέτρηση σε τρυβλία μετά από αραιώση και εμβολιασμό με επίστρωση



Δειγματοληψία με σπόγγο από επιφάνεια σφάγειου και ανίχνευση με streaking



Δειγματοληψία με σπόγγο και καταμέτρηση σε τρυβλία μετά από αραιώση και εμβολιασμό με επίστρωση



Δειγματοληψία από στερεό/υγρό τρόφιμο και καταμέτρηση σε τρυβλία μετά από αραιώση και εμβολιασμό με επίστρωση





Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΕΡΑ ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Εισαγωγή

- Ο αέρας περιέχει πολλούς μικροοργανισμούς όπως σπόρια μυκήτων και βακτηρίων, και αερόβια βακτήρια που αιωρούνται, ή ανήκουν στο έδαφος και περιστασιακά βρίσκονται και στον αέρα.
- Πολλοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση σε τρόφιμα, ιδίως σε θερμικώς επεξεργασμένα τρόφιμα μετά τη θερμική επεξεργασία και πριν τη συσκευασία (π.χ. παστεριωμένα αλλαντικά και τυριά, έτοιμα φαγητά, αλοιφόμενες σαλάτες, κλπ), καθώς και σε ζυμούμενα τρόφιμα (μπύρα, κρασί, γιαούρτι, τυριά, κλπ).
- Επομένως, η μικροβιολογική ποιότητα του αέρα είναι σημαντική για την πρόληψη αλλοίωσης τροφίμων, ιδίως ευαλλοίωτων τροφίμων ζωικής προέλευσης.
- Επίσης, σε ένα μικροβιολογικό εργαστήριο οι τυχόν επιμολύνσεις δειγμάτων από τον αέρα μπορεί να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα (εξ' ου και η ανάγκη του λύχνου Bunsen για την αποστείρωση του αέρα στον πάγκο εργασίας).

Μέθοδοι μέτρηση του μικροβιακού φορτίου του αέρα

A. Μέθοδος ανοιχτών τρυβλίων (τεχνική της καθίζησης) για καταμέτρηση πληθυσμού μυκήτων ή Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) του αέρα:

1. Τρυβλίο Petri που περιέχει Potato Dextrose agar (για μέτρηση μυκήτων) ή Plate Count Agar (για μέτρηση ΟΜΧ) αφήνεται ανοιχτό για διάστημα ~30 λεπτών (και σε ύψος ενός μέτρου από το δάπεδο) πάνω σε κάποια επιφάνεια.
2. Με τον τρόπο αυτό κάποιοι μικροοργανισμοί του αέρα επικάθονται στην επιφάνεια του υλικού.
3. Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στους 22-25°C για 5 μέρες για μύκητες, ή στους 30°C για 72 ώρες για την ΟΜΧ και καταμέτρηση των αποικιών.

Πρόκειται για απλή ποιοτική μέτρηση, όχι ποσοτική (δεν αφορά συγκεκριμένη ποσότητα αέρα)

B. Μέθοδος αναρρόφησης αέρα σε τρυβλία με αντλία κενού:

Με τη μέθοδο αυτή γίνεται αναρρόφηση αέρα (κενό) μέσω αντλίας κενού και ο αέρας που αναρροφάται διέρχεται από την επιφάνεια ανοικτού τρυβλίου επιστρωμένου με κατάλληλο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (ανάλογα με το μικροοργανισμό που θέλουμε να προσδιορίσουμε), ώστε οι μικροοργανισμοί του αέρα να επικαθήσουν στην επιφάνεια του τρυβλίου. Η ποσότητα αέρα που διέρχεται από το τρυβλίο μετράται σε λίτρα αέρα ή ως ρυθμός αναρρόφησης αέρα (λίτρα αέρα /λεπτό), και μετά από την επώαση των τρυβλίων τα αποτελέσματα εκφράζονται ως **cfu/lt αέρα** (πρόκειται για ποσοτική μέθοδο).





Ανοιχτό τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα για τον έλεγχο μικροοργανισμών στον αέρα πριν την επώαση

Τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα για τον έλεγχο μικροοργανισμών στον αέρα μετά την επώαση



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

Μικροβιολογική ανάλυση νερού

Το νερό στη βιομηχανία τροφίμων έχει ευρεία χρήση ως συστατικό τροφίμων και ποτών, αλλά και ως μέσο καθαρισμού και έκπλυσης μηχανημάτων, συσκευασιών, τραπεζών εργασίας, κλπ.

Επειδή το μη χλωριωμένο νερό μπορεί να περιέχει διάφορους αλλοιογόνους ή και παθογόνους μικροοργανισμούς, το νερό στη βιομηχανία τροφίμων πρέπει να είναι πάντα ποιότητας πόσιμου νερού, δηλαδή χλωριωμένο ή επεξεργασμένο με άλλο απολυμαντικό μέσο (π.χ. όζον).

Για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού ενδιαφέρον παρουσιάζουν κυρίως οι μικροοργανισμοί εντερικής/κοπρανώδους προέλευσης, η παρουσία των οποίων μπορεί να σημαίνει ανεπαρκή χλωρίωση, ή επιμόλυνση του πόσιμου νερού με νερό αποχέτευσης ή άλλα υγρά απόβλητα.

Σε ότι αφορά το εμφιαλωμένο νερό, οι ενδεχόμενοι μικροβιολογικοί κίνδυνοι είναι μεγαλύτεροι, καθώς αυτό συντηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτός ψυγείου, και άρα οι σχετικές προδιαγραφές είναι ακόμα πιο αυστηρές.

Ως μικροβιολογικοί δείκτες ποιότητας του νερού χρησιμοποιούνται :

- Τα **ολικά κολοβακτηριοειδή** (coliforms = Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella)
- Η **Escherichia coli**, η οποία είναι παθογόνος και πιο θερμοάντοχος μικροοργανισμός της ομάδας των Coliforms και έχει ως αποκλειστικό φυσικό βιότοπο τα κόπρανα δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης
- Ο συνολικός πληθυσμός **Enterococcus** κοπρανώδους προέλευσης (E. faecalis, E. faecium)
- Η ολική αερόβια χλωρίδα (**OMX**) στους 37°C και στους 22°C
- Το ψυχρότροφο, παθογόνο βακτήριο **Pseudomonas aeruginosa**
- Το αναερόβιο, σπορογόνο και παθογόνο βακτήριο **Clostridium perfringens** (ανθεκτικό σε θερμικές και χημικές επεξεργασίες όπως η χλωρίωση)
- Η παρουσία εντερικών ιών ή φάγων ή/και παρασίτων

Γενικά χαρακτηριστικά κολοβακτηριδίων:

- Οικογένεια Enterobacteriaceae, Gram- βακτήρια εντερικής και περιβαλλοντικής (φυτικής, εδαφικής, υδατικής) προέλευσης (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*)
- Gram⁻ μη σπορογόνοι βάκιλλοι, αναπτύσσονται παρουσία αλάτων χολής, οξειδάση αρνητικοί.
- Πολλαπλασιάζονται στους 37°C ζυμώνοντας τη γλυκόζη και λακτόζη (παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης) με παραγωγή αερίου σε 24-48h. Επιπλέον, η *E. coli* παράγει και β-γλουκουρονιδάση.
- (τα υπόλοιπα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae δεν διασπών τη λακτόζη)

- Χρησιμοποιούνται σαν δείκτης αποτελεσματικότητας των επεξεργασιών και σαν δείκτης περιβαλλοντικής ρύπανσης από κόπρανα, χώματα κλπ. Η *E.coli* αποτελεί ασφαλή δείκτη πρόσφατης ρύπανσης κοπρανώδους προέλευσης.

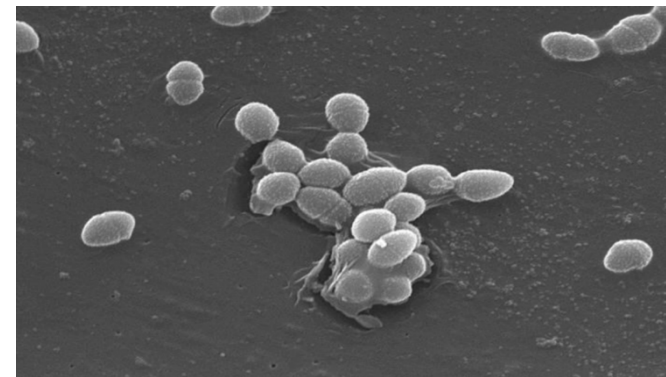
Προσοχή: Τα περισσότερα στελέχη *E. coli* από κόπρανα υγιών ανθρώπων και ζώων δεν είναι παθογόνα, αλλά το στέλεχος 0:157:H7 προκαλεί αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (10%).



E. coli σε ηλεκτρονικό
μικροσκόπιο

Γενικά χαρακτηριστικά Εντεροκόκκων:

- Οικογένεια Streptococcaceae, θερμοάντοχοι Gram⁺ κόκκοι εντερικής προέλευσης
- Έχουν αντοχή στο NaCl και στο αλκαλικό και όξινο pH, είναι **ανθεκτικότεροι από την *E.coli* στην χλωρίωση**
- Θεωρούνται ασφαλέστερος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης από ότι η *E. coli* για θερμά νερά, θαλάσσια νερά, υπόγεια νερά, νερό πισίνας



Enterococcus faecalis σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Γενικά χαρακτηριστικά ολικής αερόβιας χλωρίδας (ΟΜΧ):

- Δεν έχει σχέση με την προέλευση της ρύπανσης. Σχετίζεται με την διαπίστωση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης (χλωρίωσης για πόσιμα νερά και πισίνες), και της καθαριότητας-υγιεινής κατά τη διαδικασία εμφιάλωσης (εμφιαλωμένα νερά).
- Δεν ενδιαφέρει τόσο η συγκέντρωσή τους στο πόσιμο νερό (δεν υπάρχει όριο στη νομοθεσία του πόσιμου νερού) αλλά η σχετική σταθερότητα του πληθυσμού ΟΜΧ, καθώς **οι απότομες μεταβολές υποδηλώνουν αστάθεια στο βαθμό χλωρίωσης του νερού.**
- **Στο εμφιαλωμένο νερό υπάρχουν όρια ανοχής για ΟΜΧ, τόσο για ψυχρότροφα, όσο και για (θερμοάντοχα) μεσόφιλα βακτήρια της ΟΜΧ**



Αποικίες ΟΜΧ

Γενικά χαρακτηριστικά *P. aeruginosa*:

- Gram⁻, οξειδάση θετική, μη σπορογόνος βάκιλλος
- Μεγάλη εξάπλωση στο περιβάλλον (νερό, έδαφος, λύματα) όπου πολλαπλασιάζονται παρουσία λίγων οργανικών ουσιών (ολιγοτροφικά), κυρίως σε **στάσιμα νερά** (όπως είναι και το εμφιαλωμένο). Δεν αποτελούν δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης.
- Παράγουν ανθεκτικά **βιοφιλμ σε επιφάνειες** παρουσία στάσιμου νερού (σωληνώσεις, δοχεία, δεξαμενές, κλπ).
- Είναι **δυσνητικά παθογόνα (πληγές, μάτια) και θέλουν προσοχή στην εργαστηριακή πρακτική**
- Έχουν ιδιαίτερη αξία στην αξιολόγηση της ποιότητας των εμφιαλωμένων νερών και της κατάστασης υγιεινής των δικτύων ύδρευσης, των υδατοδεξαμενών και των κολυμβητηρίων.



Γενικά χαρακτηριστικά *C. perfringens*:

- Αναερόβιοι, σπορογόνοι, παθογόνοι Gram⁺ βάκιλλοι. Υπάρχουν σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση στα κόπρανα και στο χώμα.
- Έχουν μεγάλη αντοχή στο περιβάλλον και επιβιώνουν στην απολύμανση.
- Αν ανιχνευθούν απουσία *E.coli* και εντεροκόκκων υποδεικνύουν παλιά ρύπανση.
- Χρησιμοποιούνται σαν έμμεσοι δείκτες παρουσίας πρωτοζώων και ειδικά του εντεροπαθογόνου *Cryptosporidium parvum*.



C. parvum (ροζ χρώμα) σε περιβαλλοντικό δείγμα σε οπτικό μικροσκόπιο



C. perfringens σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Βακτηριοφάγοι:

- Ιοί που χρησιμοποιούν κύτταρα βακτηρίων ως ξενιστές. Πολλοί από αυτούς προέρχονται **από αστικά/βιομηχανικά λύματα**.
- Ορισμένες ομάδες φάγων, κυρίως οι κολιφάγοι και οι φάγοι του *Bacteroides* spp χρησιμοποιούνται σαν **δείκτες μόλυνσης του νερού κυρίως από εντεροϊούς** και σαν **δείκτες αποτελεσματικότητας της απολύμανσης μονάδων επεξεργασίας λυμάτων (βιολογικού καθαρισμού)**.
- Σε περιβαλλοντικά δείγματα (ποτάμια, λίμνες, θάλασσα) η παρουσία βακτηριοφάγων και εντεροϊών **συνδέεται με απόρριψη αστικών ή βιομηχανικών λυμάτων**.

Μικροβιολογικά Όρια Νομοθεσίας

Πόσιμο νερό δικτύου ύδρευσης

Μικροοργανισμοί δείκτες	Όρια
Ιοί που χρησιμοποιούν κύτταρα βακτηρίων ως ξενιστές. Πολλοί από αυτούς προέρχονται από αστικά/βιομηχανικά λύματα.	
Ολικά κολοβακτηριοειδή	Απουσία/ 100ml
<i>E.coli</i>	Απουσία/ 100ml
Εντερόκοκκοι	Απουσία/ 100ml
<i>Clostridium perfringens</i>	Απουσία/ 100ml
Ολική ψυχρόροφη (22°C/48h) χλωρίδα	όχι ασυνήθιστη μεταβολή

Εμφιαλωμένα (επιτραπέζια) νερά

Μικροοργανισμοί δείκτες	Όρια
<i>E.coli</i>	Απουσία/ 250ml
Εντερόκοκκοι	Απουσία/ 250ml
<i>Clostridium perfringens</i>	Απουσία/ 100ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Απουσία/ 250ml
Ολική ψυχρότροφη (22°C/48h) χλωρίδα	100cfu/ml
Ολική μεσόφιλη (37°C/48h) χλωρίδα (ενδεικτικό όριο)	20cfu/ml

Θαλάσσια νερά

Μικροοργανισμοί δείκτες

Όρια

Ολικά κολοβακτηριοειδή

10.000/100ml

Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή

500/100ml

Σαλμονέλλα

Απουσία/ 1000ml

Κολυμβητικές δεξαμενές

Μικροοργανισμοί δείκτες

Όρια

Ολική μεσόφιλη (37°C/24h) χλωρίδα

200cfu/ml

Ολικά κολοβακτηριοειδή

15/100ml

Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή

Απουσία/ 100ml

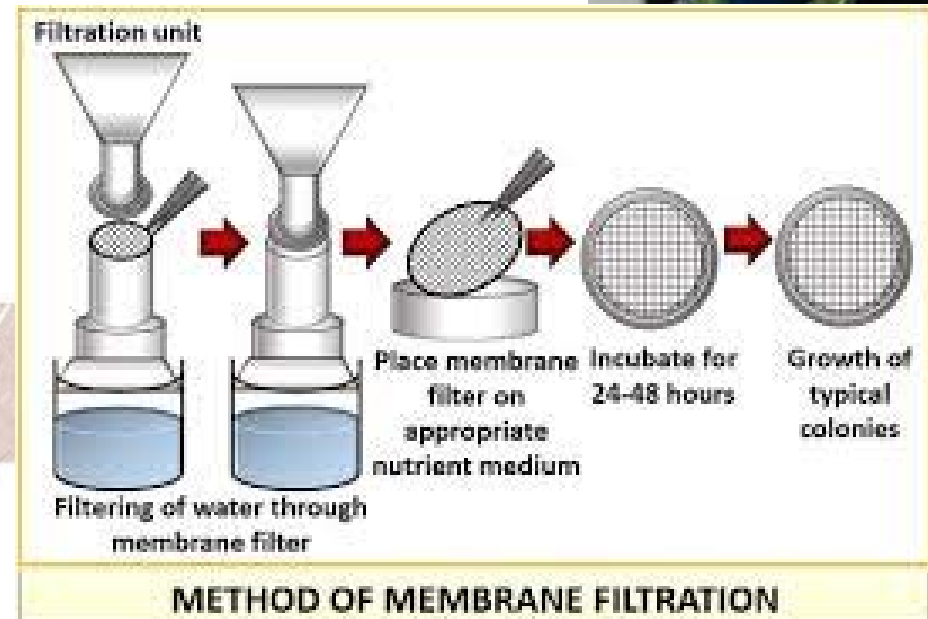
Μέθοδοι Ανάλυσης

1. **Μέθοδος ενσωμάτωσης 1ml ή επίστρωσης 0,1ml σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα για καταμέτρηση ΟΜΧ** (και γενικώς όταν τα κριτήρια αφορούν ποσότητα 1ml δείγματος νερού). Μέτρηση έως και 300 αποικιών (ενσωμάτωση) ή 150 αποικιών (επίστρωση) ανά τρυβλίο.
2. **Μέθοδος μεμβρανών για ανίχνευση μικροοργανισμών-δεικτών:** διήθηση υπό κενό 100 ή 250, ή 500ml δείγματος νερού μέσω αποστειρωμένων μεμβρανών (χάρτινα φίλτρα) με πορώδες 0,45μμ, οι οποίες κατακρατούν τα μικροβιακά κύτταρα. Μετά τη διήθηση του νερού τα κύτταρα συγκεντρώνονται στη μεμβράνη, η οποία τοποθετείται στην επιφάνεια του κατάλληλου στερεού υποστρώματος σε τρυβλίο. Μετά την επώαση ελέγχουμε αν έχει αναπτυχθεί έστω και μία ύποπτη αποικία (ανίχνευση).
3. Για όσους μικροοργανισμούς χρειάζεται κάνουμε επιβεβαιωτικές δοκιμές (*Enterococcus*, *P. aeruginosa*, κλπ)

Μικροοργανισμοί δείκτες	Υποστρώματα/ θερμοκρασίες επώασης /αποικίες
Coliforms	(Lactose) Tergitol agar +TTC supplement: 37°C x 24h, πορτοκαλί αποικίες
E. coli	(Lactose) Tergitol agar + TTC supplement: 44°C x 24h, πορτοκαλί αποικίες
Enterococcus	Slanetz & Bartley agar: 37°C x 48h, σκούρες κόκκινες αποικίες, επιβεβαίωση στη συνέχεια σε Bile Esculin Azide agar (καφέ αποικίες μετά από νέα επώαση 37°C x 48h)
Pseudomonas aeruginosa	Pseudomonas agar base + CN (cetrimide) supplement: 35°C x 48h, μπλε/πράσινες αποικίες που φθορίζουν στο υπεριώδες φως
Clostridium perfringens	TSC agar (αναερόβιες συνθήκες) (+egg yolk) : 44°C x 48h, μαύρες αποικίες λόγω παραγωγής H ₂ S → FeS (+ ζώνη υδρόλησης λεκιθίνης γύρω από τις αποικίες)
ΟΜΧ ψυχρόφιλη	PCA agar: 22°C x 48h, μπεζ αποικίες
ΟΜΧ μεσόφιλη	PCA agar: 37°C x 48h, μπεζ αποικίες

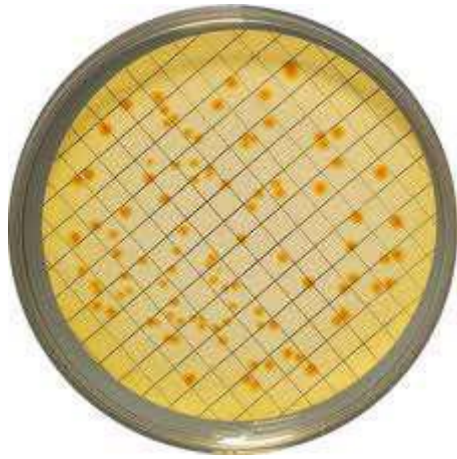
Πειραματικό μέρος

<https://www.youtube.com/watch?v=zJib6f8V-PE>

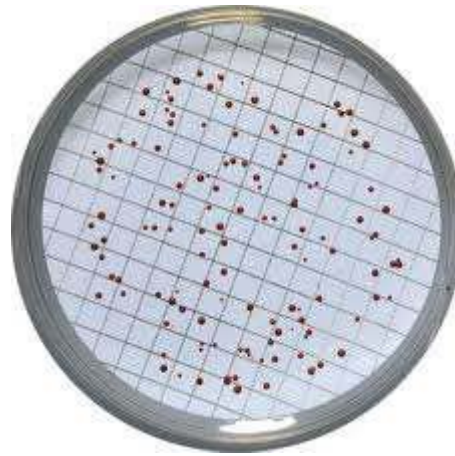


Αποστείρωση βρύσης, λήψη δείγματος σε αποστειρωμένο δοχείο, αποστειρωτική διήθηση, τοποθέτηση φίλτρων σε τρυβλία

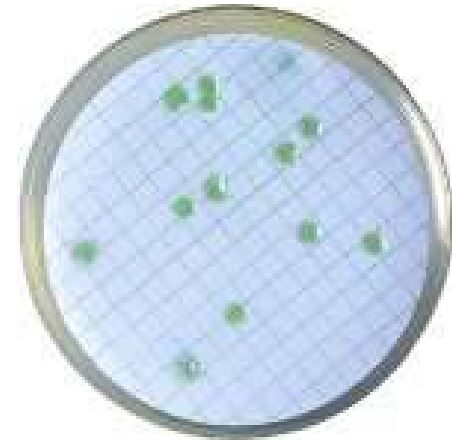
Ενδεικτικές αποικίες μικροοργανισμών-δεικτών έπειτα από τη διήθηση του νερού και την επώαση των φίλτρων σε στερεό υπόστρωμα



Coliforms σε Tergitol agar +TTC supplement



Enterococcus σε Slanetz & Bartley agar



Pseudomonas aeruginosa σε Cetrimide (CN) agar



C. perfringens σε TSC agar



Αποικίες OMX μετά από εμβολιασμό 1ml δείγματος νερού (με ενσωμάτωση, χωρίς διήθηση)



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Πρόγραμμα Σπουδών Τεχνολογίας Τροφίμων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

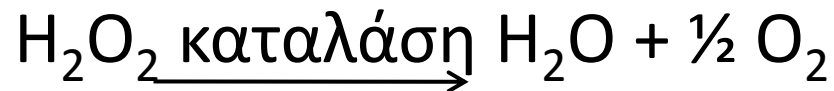
ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΤΕΣΤ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ-ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ- ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ

Τα βιοχημικά τεστ χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών και την ταξινόμησή τους σε γένη-είδη-υποείδη. Πολλά από τα βιοχημικά τεστ αφορούν την παρουσία/απουσία συγκεκριμένων ενζύμων στο κύτταρων των μικροοργανισμών που διερευνώνται, όπως η καταλάση, η οξειδάση και η αμινοπεπτιδάση.

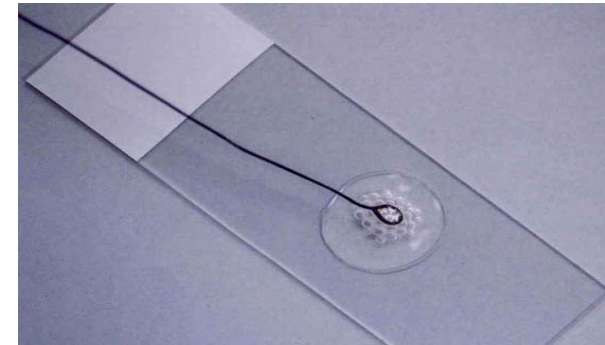
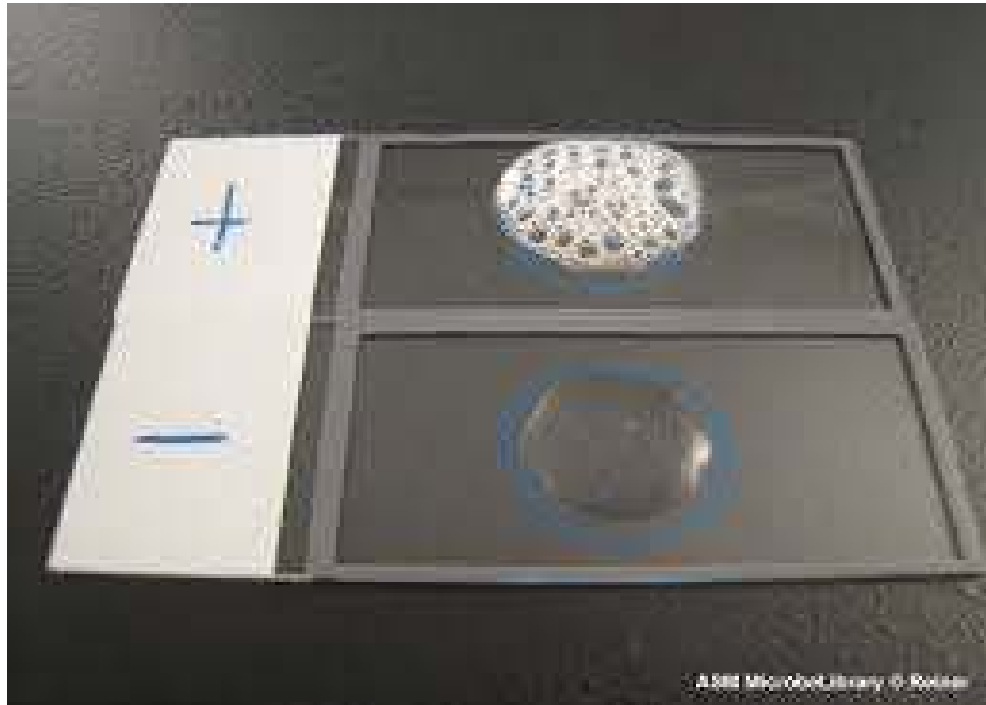
A. Τεστ καταλάσης

Η **καταλάση** είναι ένα ένζυμο που διασπάει το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο είναι μια έντονα οξειδωτική ουσία που παράγεται κατά το μεταβολισμό μικροοργανισμών, σε νερό και οξυγόνο:



Η παρουσία αυτού του ενζύμου βοηθάει τους μικροοργανισμούς που παράγουν καταλάση **να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες** που προέρχεται από το υπεροξείδιο υδρογόνου και το οποίο μπορεί να είναι καταστροφικό για τα κύτταρα.

Το τεστ γίνεται με την προσθήκη διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε παρασκεύασμα καθαρής καλλιέργειας (σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα ή σε τρυβλίο), οπότε **εάν παράγει η καλλιέργεια καταλάση**, τότε δημιουργείται **άμεσα αφρισμός**, λόγω του οξυγόνου που εκλύεται.



Στην παραπάνω εικόνα με (+) έχουμε θετικό τεστ για την παραγωγή καταλάσης (έχουμε την παραγωγή αφρισμού) ενώ με (-) έχουμε αρνητικό τεστ (δεν έχει παραχθεί αφρισμός)

B. Τεστ οξειδάσης

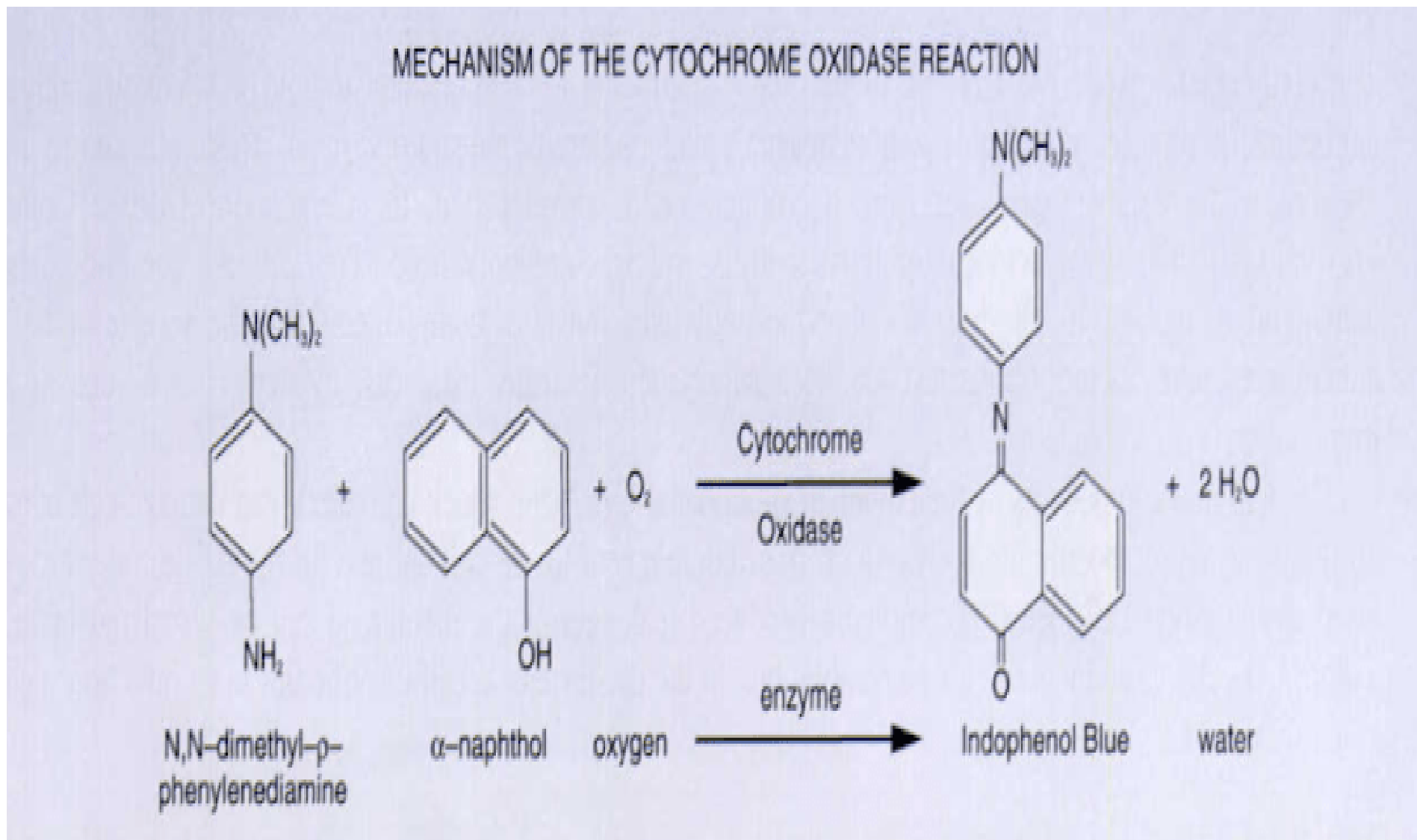
Το τεστ οξειδάσης είναι ένα παρόμοιο τεστ που αφορά ένα άλλο ένζυμο που εμπλέκεται σε οξειδωτικές αντιδράσεις και παράγεται από ορισμένους μικροοργανισμούς, την οξειδάση του κυτοχρώματος c.

Θετική αντίδραση στο τεστ οξειδάσης δίνουν επίσης και τα βακτήρια που παράγουν οξειδάση της ινδοφαινόλης. Και τα δύο αυτά ένζυμα καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων από δότες ηλεκτρονίων (π.χ. NADH, NADPH) σε δέκτες ηλεκτρονίων (π.χ. οξυγόνο).

Γενικά, τα **υποχρεωτικά αερόβια** βακτήρια και συγκεκριμένα όσα βακτήρια χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή ενέργειας **συνήθως παράγουν οξειδάση**, ενώ τα αναερόβια ή προαιρετικά αναερόβια συνήθως δεν παράγουν οξειδάση.

Το τεστ γίνεται με την προσθήκη λίγων σταγόνων από καθαρή, υγρή καλλιέργεια βακτηρίων ή από μεμονωμένη αποικία σε τρυβλίο που επιστρώνονται πάνω σε ειδικούς χάρτινους δείκτες εμποτισμένους με το αντιδραστήριο *N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD)* ή *N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD)*, τα οποία είναι δείκτες οξειδοαναγωγής. Όταν ο δείκτης οξειδώνεται (λόγω παραγωγής οξειδάσης) αποκτάει σκούρο μπλε-μωβ χρώμα, ενώ όταν δεν οξειδώνεται παραμένει άχρωμος.

Μηχανισμός της αντίδρασης οξειδάσης του κυτοχρώματος





Στην θέση 1 έχουμε αρνητικό τεστ οξειδάσης (άχρωμο) ενώ στην θέση 2 έχουμε θετικό τεστ για την παραγωγή οξειδάσης (μπλε-μωβ χρωματισμός)

Γ. Τεστ αμινοπεπτιδάσης

Η αμινοπεπτιδάση είναι ένα ένζυμο που υπάρχει αποκλειστικά στα GRAM+ βακτήρια. Συνεπώς μπορεί να αντικαταστήσει τη χρώση Gram σε ότι αφορά την κατάταξη των βακτηρίων, χωρίς όμως να δίνει στοιχεία για τη μορφολογία των κυττάρων (όπως η χρήση μικροσκοπίου με τη χρώση GRAM).

Για την διενέργεια του τεστ αμινοπεπτιδάσης τοποθετούμε σε ένα υγρό εναιώρημα κυττάρων καθαρής καλλιέργειας έναν ειδικό χάρτινο δείκτη εμποτισμένο με το κατάλληλο υπόστρωμα (L-alanine-4- nitroanilide) και επωάζουμε το δείγμα στους 30-37°C για 10-30 λεπτά. Αν υπάρχει θετική αντίδραση (παρουσία αμινοπεπτιδάσης) ο χάρτινος δείκτης χρωματίζεται κίτρινος, διαφορετικά παραμένει άχρωμος.



Αριστερά: **Θετικό τεστ αμινοπεπτιδάσης (κίτρινος χρωματισμός)**
Δεξιά: αρνητικό τεστ αμινοπεπτιδάσης (άχρωμο)