



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ
ΓΕΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Δρ. Ιωάννης Γιαβάσης

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

1. ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	3-4
2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	5-6
3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΤΙΚΑ ΥΓΡΑ	7-9
4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	10-16
4.1. Μέθοδος καταμέτρησης σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	
4.2. Μέθοδος εκτίμησης του πλέον πιθανού αριθμού-MPN	
5. ΟΛΙΚΗ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΕΣΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (ΟΜΧ)	17-20
6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ	21-24
7. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΠΛΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ	25-28
8. ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM	29-30
9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΤΟΥ STAPHYLOCOCCUS AUREUS	31-35
10. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΕΡΟΥ	36-39
11. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ	40-41
12. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΕΡΑ ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	42
13. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΤΕΣΤ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ-ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ-ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ	43-44
14. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ IN VITRO (ΜΕΤΡΗΣΗ ΖΩΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ, ΜΕΘΟΔΟΣ MIC-MBC)	45-47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

1. ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Επειδή οι περισσότερες μικροβιολογικές εργαστηριακές ασκήσεις απαιτούν τη χρήση στείρων θρεπτικών υλικών, για την καλλιέργεια και ανάπτυξη των μικροβίων που μας ενδιαφέρουν, αναπόσπαστο τμήμα όλων των εργαστηριακών εργασιών είναι η χρήση αποστειρωμένων υλικών. Όλοι οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται πρέπει να θεωρούνται ως πιθανά παθογόνοι (δηλ. ικανοί να προκαλέσουν κάποια ασθένεια).

Τα παρακάτω βασικά βήματα πρέπει να ακολουθούνται **πάντα**, ώστε να μειωθούν οι κίνδυνοι, από την απανταχού παρούσα μικροβιακή χλωρίδα του εργαστηριακού περιβάλλοντος:

- I. τα ρούχα, βιβλία και άλλα προσωπικά είδη, τοποθετούνται σε καθορισμένο σημείο στο Εργαστήριο, ποτέ δε επάνω στους πάγκους εργασίας,
- II. οι πόρτες και τα παράθυρα παραμένουν κλειστά, κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής άσκησης, ώστε να αποτραπεί η μόλυνση του χώρου από τα ρεύματα αέρα,
- III. στην αρχή και τη λήξη κάθε εργαστηριακής εργασίας, οι επιφάνειες των πάγκων καθαρίζονται με ένα απολυμαντικό υγρό, που διατίθεται από το προσωπικό του Εργαστηρίου,
- IV. τα μολυσμένα (χρησιμοποιημένα) όργανα και σκεύη, όπως κρίκοι ενοφθαλμισμού, σιφώνια καθώς και άλλο γυάλινο υλικό, δεν εγκαταλείπονται στις επιφάνειες των πάγκων. Οι κρίκοι π.χ. πρέπει να αποστειρωθούν με φλόγα, ενώ τα σιφώνια να συγκεντρωθούν στα καθορισμένα δοχεία, επάνω στους πάγκους,
- V. με την ολοκλήρωση της εργαστηριακής άσκησης όλα τα υλικά και σκεύη τοποθετούνται στους ειδικούς χώρους, που έχουν υποδειχθεί από το προσωπικό του Εργαστηρίου,

Τέλος, για την πρόληψη τυχόν τραυματισμού ή μόλυνσης, πρέπει να εφαρμόζονται, πάντα, οι ακόλουθοι κανόνες

- a. πλύσιμο, πάντοτε, των χεριών με υγρό απορρυπαντικό και στέγνωμα, τόσο κατά την είσοδο, όσο και πριν από την αναχώρηση από το Εργαστήριο,
- b. τοποθέτηση των μακριών μαλλιών μέσα σε χάρτινο, ειδικό, σκουφάκι μιας χρήσης ή δέσιμο στο πίσω μέρος με μία κορδέλα ή στερέωμα με ένα κοκαλάκι, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεσή τους στη φλόγα των λύχνων,
- c. η εργαστηριακή μπλούζα, κατά την παραμονή και εργασία στο Εργαστήριο, είναι άκρως απαραίτητη για την προστασία των ρούχων από μικροβιακή μόλυνση, το κάπνισμα από αναμμένο λύχνο ή τον τυχαίο αποχρωματισμό τους από τα χρησιμοποιούμενα απολυμαντικά υγρά (χλώριο),
- d. τα κλειστά παπούτσια είναι απαραίτητα, κατά την παραμονή και εργασία στο χώρο του Εργαστηρίου,
- e. πρέπει να αποφεύγεται η χρήση καλλυντικών ή η εφαρμογή φακών επαφής μέσα στο χώρο του Εργαστηρίου,
- f. απαγορεύονται, απολύτως, το κάπνισμα, η κατανάλωση φαγητού, ποτών καθώς και αναψυκτικών ή καφέδων στο Εργαστήριο,
- g. οι μικροβιακές καλλιέργειες μεταφέρονται σε στατό δοκιμαστικών σωλήνων, το δε στατό με τους δοκιμαστικούς σωλήνες, τοποθετείται επάνω στον πάγκο εργασίας, όταν δεν

χρησιμοποιούνται. Αυτό εξυπηρετεί την αποφυγή ατυχημάτων και άρα μόλυνσης, τόσο των εργαζομένων, όσο και του περιβάλλοντος,

- h. απαγορεύεται, απολύτως, η απομάκρυνση από το Εργαστήριο υλικών και σκευών, μάλιστα δε μικροβιακών καλλιιεργειών,
- i. κάθε ατύχημα, που έχει ως συνέπεια την παρουσία μικροβιακών καλλιιεργειών επάνω στους πάγκους εργασίας και γενικά τον χώρο του Εργαστηρίου, πρέπει να αναφέρεται αμέσως στο προσωπικό του Εργαστηρίου. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται τα κατάλληλα απολυμαντικά υγρά, που υπάρχουν στους πάγκους.
- j. 10. κάθε τραύμα ή έγκαυμα πρέπει να αναφέρεται στον υπεύθυνο εκπαιδευτικό,
- k. η χρήση αυτοκόλλητων ετικετών ή κατάλληλου υαλογραφικού μαρκαδόρου, για το μαρκάρισμά των πειραματικών μικροβιακών καλλιιεργειών, είναι απαραίτητη,
- l. οι περιττές μετακινήσεις καθώς και οι δυνατές ομιλίες μέσα στο Εργαστήριο πρέπει να αποφεύγονται για να αποτρέπεται η απόσπαση της προσοχής, που μπορεί να προκαλέσει ατυχήματα.

Οι ασκούμενοι στο Εργαστήριο φοιτητές, πρέπει να λαμβάνουν γνώση όλων των κανόνων και οδηγιών για την εργαστηριακή ασφάλεια, δεσμευόμενοι για την πιστή τήρησή τους.

2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όλα τα τρόφιμα φέρουν ένα μικροβιακό φορτίο, δηλαδή μια ποικιλία μικροβίων σε διάφορους αριθμούς. Από τα μικρόβια αυτά άλλα είναι παθογόνα, αίτια τροφογενών λοιμώξεων - τοξινώσεων, και άλλα είναι σαπρόφυτα, αίτια αλλοιώσεων των τροφίμων. Έτσι γίνεται φανερό, ότι η μικροβιολογική ποιότητα ενός τροφίμου σχετίζεται με το μικροβιακό του φορτίο: ένα τρόφιμο είναι κανονικό (καλής ποιότητας), όταν: 1) δεν περιέχει παθογόνα μικρόβια και τοξίνες, 2) δεν έχει υποστεί ανεπιθύμητες χημικές μεταβολές από τη δράση των μικροβίων και 3) μπορεί να συντηρηθεί καλά.

Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα, ότι η εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας των τροφίμων περιλαμβάνει εξετάσεις για την ανίχνευση των παθογόνων μικροβίων και των τοξινών τους και εξετάσεις για τον προσδιορισμό και τη μέτρηση των δεικτών της χημικής καταστάσεως του τροφίμου (αερόβια μεσόφιλη χλωρίδα, ειδικές κατηγορίες βακτηρίων, μικροβιακούς μεταβολίτες κ.λ.π.).

Η εκτίμηση και η ερμηνεία των μικροβιολογικών αναλύσεων γίνεται με βάση πρότυπα ποιότητας, δηλαδή 'όρια τιμών' μέσα στα οποία πρέπει να βρίσκονται οι τιμές των γνωρισμάτων και των παραμέτρων των τροφίμων, ώστε να γίνουν αυτά αποδεκτά από τους καταναλωτές και την πολιτεία. π.χ. τα πρότυπα ορίζουν το μέγιστο αποδεκτό αριθμό μικροβίων ή ομάδων μικροβίων σ' ένα τρόφιμο.

2.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Γενικά

Δειγματοληψία ονομάζεται η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την εκλογή του κατάλληλου δείγματος. Το βασικό γνώρισμα της δειγματοληψίας είναι ότι προσπαθεί να εκλέξει το δείγμα έτσι ώστε να είναι αυτό όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού. Μόνο από τη μελέτη ενός τέτοιου δείγματος μπορεί να εξαχθούν ορθά συμπεράσματα για τον πληθυσμό. Απ' αυτό προκύπτει, ότι η δειγματοληψία αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες φάσεις του μικροβιολογικού ελέγχου των τροφίμων.

Μέτρα προφύλαξης

Το δείγμα πρέπει να απεικονίζει τη μικροβιολογική σύσταση του τροφίμου και γι' αυτό πρέπει να παίρνονται όλα τα κατάλληλα μέτρα ασηψίας, ώστε κατά τη συλλογή, τη μεταφορά και την ανάλυσή του να αποκλείεται η μικροβιολογική μόλυνση από εξωτερικές πηγές.

Για την ασηπτική δειγματοληψία: (α) χρησιμοποιούμε αποστειρωμένα εργαλεία και σκεύη, όπως μαχαιρίδια, λαβίδες, ειδικούς δειγματολήπτες, σιφόνια, σωλήνες, φιάλες, φιαλίδια κ.τ.λ. (β) εκτελούμε τη δειγματοληψία πλησίον λύχνου Bunsen σε απόσταση μικρότερη των 15 cm από τη φλόγα (γ) τοποθετούμε τα δείγματα, ανάλογα με τη σύσταση του προϊόντος, σε ευρύστομα φιαλίδια ή δοχεία με στεγανό κοχλιωτό πώμα. Τα στερεά δείγματα μπορεί να συσκευασθούν σε αδιάβροχο χαρτί ή αλουμινοχαρτο, εφόσον δεν απαιτείται μικροβιολογική εξέταση της επιφανειακής στιβάδας τους (δ) τα πρόσωπα που συλλέγουν τα δείγματα πλένουν τα χέρια τους πριν από τη δειγματοληψία.

Συχνότητα και σημεία της δειγματοληψίας

Η συχνότητα με την οποία παίρνουμε δείγματα για μικροβιολογική ανάλυση καθορίζεται από τον κίνδυνο που περικλείει το προϊόν: τα τρόφιμα που είναι επικίνδυνα από την άποψη της δημόσιας υγείας, π.χ. τα κατεψυγμένα αυγά, εξετάζονται συχνότερα από τα ακίνδυνα, π.χ. τους τοματοχυμούς. Όταν το

δείγμα προορίζεται μόνο για μικροβιολογική εξέταση, κανονικά δεν λαμβάνεται αντίδειγμα λόγω της εν γένει μεταβολής του μικροβιακού φορτίου σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Σημεία δειγματοληψίας. Ο μικροβιολογικός έλεγχος γίνεται στις πρώτες ύλες, στα διάφορα στάδια της γραμμής παραγωγής και στο τελικό προϊόν, είτε στον τόπο της παραγωγής, είτε κατά την αποθήκευση, τη συντήρηση, τη διακίνηση και τη διατήρηση στους χώρους καταναλώσεως του προϊόντος.

Στις περιπτώσεις όμως, που το εξεταζόμενο προϊόν βρίσκεται μη κανονικό, συνιστάται να γίνει δειγματοληψία και στον χώρο παραγωγής, στα διάφορα στάδια της επεξεργασίας, για να προσδιοριστεί το σημείο επιμόλυνσης και να εξαχθούν συμπεράσματα, ώστε να ληφθούν τα αναγκαία μέτρα.

Η ποιότητα των πρώτων υλών έχει βασική σημασία για την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Οι ακάθαρτες πρώτες ύλες όχι μόνο είναι επικίνδυνες για το τελικό προϊόν, αλλά ακόμη μολύνουν τον εξοπλισμό της βιομηχανίας και εμμέσως όλα τα προϊόντα που παράγονται. Γι' αυτό, σε μια σύγχρονη βιομηχανία είναι απαραίτητο να ελέγχεται συστηματικά η μικροβιολογική ποιότητα των πρώτων υλών. Αν διαπιστωθεί ότι είναι ακατάλληλες, πρέπει να απορρίπτονται.

Οι μικροβιολογικές εξετάσεις που γίνονται κατά τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας ελέγχουν την αποτελεσματικότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται και μας πληροφορούν συνεχώς για την ποιότητα του προϊόντος, ώστε να είναι δυνατή η έγκαιρη επέμβαση και η πρόληψη πιθανών ανωμαλιών. Πρόκειται λοιπόν για προληπτικό μικροβιολογικό έλεγχο που θεωρητικά θα έπρεπε να γίνεται σ' όλα τα σημεία της γραμμής παραγωγής. Όμως ένας τόσο εκτεταμένος έλεγχος πρακτικά είναι δύσκολος. Γι' αυτό ο προληπτικός έλεγχος γίνεται σ' ορισμένες θέσεις και χρονικές στιγμές της παραγωγής, όπως πριν από μια κατεργασία που κοστίζει πολύ, μετά από μια συγκεκριμένη φάση της παραγωγής στην οποία οι κίνδυνοι για παραγωγή ελαττωματικών ή άχρηστων προϊόντων είναι μεγάλοι κ.τ.λ.

2.3 ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα μεταφέρονται στο εργαστήριο το ταχύτερο, όπου εξετάζονται αμέσως ή διατηρούνται στους + 1 ως + 4°C μέχρι της εξετάσεώς τους. Πρέπει να αποφεύγεται η μεταφορά και η συντήρηση των δειγμάτων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, γιατί με την κατάψυξη είναι δυνατό να παρατηρηθεί σοβαρή μεταβολή στον αριθμό των μικροβίων, που είναι ικανά να αναζωογονηθούν.

Τα κατεψυγμένα δείγματα διατηρούνται κατεψυγμένα κατά τη μεταφορά τους. Πρέπει να αποφεύγεται η απόψυξη και η επανακατάψυξη του δείγματος. Επομένως, και στην περίπτωση που δε θα εξετασθούν αμέσως, θα διατηρηθούν στους -20°C.

3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

3.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ (culture media)

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται όταν οι συνθήκες, που επικρατούν γύρω από το μικροπεριβάλλον τους είναι ιδανικές για τον πολλαπλασιασμό τους. Στην πράξη η απομόνωση, διατήρηση και πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται σε θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία ονομάζουμε αλλιώς θρεπτικά υλικό/α (medium-media).

Τα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα είναι διαλύματα υγρά ή στερεοποιημένα (με άγαρ ή κάποιον παρόμοιο πηκτικό πολυσακχαρίτη), τα οποία περιέχουν θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (είτε μιας μεγάλης ομάδας αυτών είτε ορισμένων μόνο γενών ή ειδών).

Τα θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να περιέχουν τα εξής συστατικά:

Πηγή C: Σχεδόν όλοι οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα τους μονο- και δισακχαρίτες και σπανιότερα ολιγο- και πολυσακχαρίτες. Σημαντικότερη και πιο εύκολα αξιοποιήσιμη πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη.

Πηγή N: Οργανική (πρωτεΐνες – πεπτόνη, τρυπτόνη) ή ανόργανη (αμμωνία και αμμωνιακά άλατα).

Βιταμίνες: Οι μικροοργανισμοί έχουν ανάγκη από ορισμένες βιταμίνες από είδος σε είδος και κυρίως από υδατοδιαλυτές.

Ανόργανα άλατα: Σημαντικά είναι τα φωσφορικά άλατα καθώς και τα άλατα νατρίου, καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου.

Ιχνοστοιχεία: Ο σίδηρος, χαλκός, μαγγάνιο, ψευδάργυρος, μαγγάνιο και μολυβδαίνιο είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών.

Τα θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

- για την καταμέτρηση μικροοργανισμών σε τρυβλία (στερεά υποστρώματα), ή σε δοκιμαστικούς σωλήνες (υγρά υποστρώματα – μέθοδος MPN), μετά από κατάλληλη δειγματοληψία, εμβολιασμό και επώαση
- για την απομόνωση καθαρών αποικιών βακτηρίων, ζυμών ή μυκήτων (streak) σε στερεό υπόστρωμα
- για την διεξαγωγή βιοχημικών ή άλλων δοκιμών, με σκοπό την ταξινόμηση μικροοργανισμών (π.χ. έλεγχος ανάπτυξης παρουσία χολικών αλάτων, αντιβιοτικών, όξινου pH, κλπ)
- για την παραγωγή και διατήρηση υπομητρικών καλλιέργειών από μία μητρική καλλιέργεια μικροοργανισμών (συνδυασμός στερεών και υγρών υποστρωμάτων). Για παράδειγμα, στη βιομηχανία γάλακτος ή κρέατος μια αρχική μητρική καλλιέργεια γαλακτοβακίλλων που αγοράζεται σε μία μοναδική συσκευασία, πρέπει να ανακαλλιερηθεί και να δημιουργηθούν νέες γενιές βακτηρίων για επαναλαμβανόμενη χρήση.

Τα θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες:

A) Ως προς την στερεή ή υγρή φάση

A1. Υγρά (broth ή liquid media). Σε αυτά δεν προστίθεται άγαρ (π.χ. MRS broth). Το πρόβλημα με τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα είναι ότι οι μικροοργανισμοί αναμιγνύονται και συχνά ο

μικροοργανισμός στόχος δεν αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις αρκετά υψηλές, που να επιτρέπουν την ανίχνευσή του.

A2. Στερεά (solid media). Αυτά διαφέρουν από τα υγρά στο ότι έχει προστεθεί ένας πηκτικός παράγοντας συνήθως άγαρ –έναν πολυσακχαρίτη που εκχυλίζεται από θαλάσσια φύκη- το οποίο λειτουργεί ως πηκτική ουσία και όχι ως θρεπτικό συστατικό (π.χ. MRS agar). Το άγαρ κυκλοφορεί στο εμπόριο σε μορφή σκόνης και έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Είναι ουδέτερο συστατικό και δεν επιδρά αρνητικά ή θετικά στη φυσιολογία του μικροοργανισμού.
2. Δεν υδρολύεται από τους μικροοργανισμούς.
3. Χρησιμοποιείται συνήθως σε περιεκτικότητα 1.2-1.5%. Η χρήση του σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών λόγω μείωσης της ενεργότητας του νερού.
4. Έχει σημείο τήξης γύρω στους 100°C και σημείο πήξης γύρω στους 40-43°C. Έτσι αφού βράσουμε ή αποστειρώσουμε ένα θρεπτικό υπόστρωμα με άγαρ, αυτό θα πήξει καθώς θα ψύχεται κάτω από τους 40°C. Όταν χρησιμοποιείται για εμβολιασμό θα πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία 45-47°C, μια θερμοκρασία όπου οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αντέχουν.

Έκτος από το άγαρ ένα άλλο συστατικό, που χρησιμοποιείται ως πηκτικός παράγοντας είναι η ζελατίνη, η οποία όμως έχει τα εξής μειονεκτήματα σε σχέση με το άγαρ:

1. Προστίθεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα (12-15%)
2. Ρευστοποιείται σε θερμοκρασία >25°C.
3. Επηρεάζεται από το χαμηλό pH και συχνά υδρολύεται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα των μικροοργανισμών.

B) Ως προς την σύσταση (γνωστή ή άγνωστη)

B1. Συνθετικά. Αυτά παρασκευάζονται βιομηχανικά ή στο εργαστήριο και έχουν συγκεκριμένη, καθορισμένη σύσταση από θρεπτικά συστατικά σε καθαρή μορφή.

B2. Φυσικά / Εμπειρικά. Είναι αυτά που λαμβάνονται από φυσικές πηγές (π.χ. μελάσσα, πούλπα φρούτων, μούστος), περιέχουν μεγάλη ποικιλία θρεπτικών στοιχείων, των οποίων όμως η ακριβής συγκέντρωση είναι άγνωστη και έτσι η σύσταση και αποτελεσματικότητα αυτών των υποστρωμάτων δεν είναι σταθερή.

Γ) Ως προς το είδος εφαρμογής τους και τα είδη μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε αυτό

Γ1. Γενικής χρήσης-εφαρμογής (complex media). Σε αυτά μπορεί να αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός διαφορετικών μικροοργανισμών (π.χ. θρεπτικός ζωμός, Plate Count agar, Yeast extract).

Γ2. Εκλεκτικά (selective). Σε αυτά μπορεί να αναπτυχθεί μόνο μία μικρή ομάδα μικροοργανισμών (π.χ. MacConkey agar για κολοβακτηριοειδή) ή μόνο ένα είδος βακτηρίων (π.χ. Bacillus cereus agar). Σε αυτά τα υποστρώματα υπάρχουν ουσίες που προάγουν την ανάπτυξη κάποιων μικροοργανισμών ή/και αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων.

Γ3. Διαγνωστικά. Είναι αυτά που περιέχουν ουσίες που διευκολύνουν τον διαχωρισμό και την αναγνώριση συγκεκριμένων μικροοργανισμών, λόγω σχηματισμού χρωστικών ουσιών που χρωματίζουν τις αποικίες (π.χ. σχηματισμός κόκκινων αποικιών E. coli και άχρωμων αποικιών Salmonella σε MacConkey agar), λόγω ενζυμικής υδρόλυσης κάποιου συστατικού και σχηματισμού διαφανούς δακτυλίου (άλω) γύρω από τις αποικίες (π.χ. Baird Parker agar με λεκιθίνη αυγού, για εντοπισμό μαύρων αποικιών S. aureus με διαφανή άλω), λόγω παραγωγής αερίων, κλπ.

Παρακάτω δίνεται η σύσταση δύο συνθετικών θρεπτικών υποστρώματων (ένα γενικής χρήσης και ένα εκλεκτικό) σε g/l :

Plate Count Agar : Πεπτόνη 5.0, Εκχύλισμα ζύμης 2.5, Γλυκόζη 1.0, Άγαρ 14.0

Baird Parker Agar: Πεπτόνη 10.0, Εκχύλισμα βοδινού 5.0, Εκχύλισμα ζύμης 1.0, Χλωριούχο λίθιο 5.0, Γλυκίνη 12.0, Πυρροβικό νάτριο 10.0, Άγαρ 17.0, και κρόκο αυγού (egg yolk tellurite) 50ml/l.

3.2 ΑΡΑΙΩΤΙΚΑ ΥΓΡΑ (diluent)

Πολλά μικροβιολογικά tests έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν ποσοτικά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει (1) τη σωστή αραιώση του προς εξέταση δείγματος, το οποίο με τη σειρά του απαιτεί ένα κατάλληλο αραιωτικό και (2) τα στερεά τρόφιμα απαιτούν αρχικά την προετοιμασία αυτών ως εναιώρημα σε αραιωτικό υγρό πριν τον τελικό χειρισμό και τις περαιτέρω αραιώσεις.

Τα αραιωτικά υγρά, λοιπόν είναι αραιά διαλύματα αλάτων ή και άλλων ουσιών, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αραιώσεων σε μικροβιολογικά δείγματα. Η συγκέντρωση των αλάτων σε αυτά τα διαλύματα είναι τέτοια ώστε να διατηρούν την κατάλληλη οσμωτική πίεση εντός και εκτός των κυττάρων των μικροοργανισμών, ώστε αυτά να μην τραυματίζονται ή καταστρέφονται, κάτι που θα μπορούσε να συμβεί με τη χρήση απεσταγμένου νερού ή πυκνού αραιωτικού υγρού. Επίσης τα αραιωτικά υγρά δεν θα πρέπει να έχουν θρεπτικά στοιχεία που να επιτρέπουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων, αλλά μπορούν να έχουν ουσίες (όπως άλατα, πεπτόνη) που επιτρέπουν την επιδιόρθωση τυχόν κυτταρικών βλαβών σε τραυματισμένα κύτταρα, ώστε αυτά να μπορούν να αναπτυχθούν καλά σε θρεπτικά υποστρώματα μετά τον εμβολιασμό.

Τα κύρια αραιωτικά υγρά και η σύστασή τους (g/l) είναι:

Διάλυμα Ringer: NaCl 2.25, KCl 0.105, CaCl₂ 0.12, NaHCO₃ 0.05

Πεπτονόχο νερό: Πεπτόνη 15.0, NaCl 5.0

Πεπτονόχος φυσιολογικός ορός : Τρυπτόνη 1.0, NaCl 8.5

ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Προετοιμάστε τα υποστρώματα PCA και BPA για όγκο 500ml και 2l.
2. Υπολογίστε τον κρόκο αυγού που χρειάζεται να προσθέσουμε σε BPA για να εμβολιάσουμε 4 δεκαδικές αραιώσεις, εις διπλούν, με 15ml στερεού υποστρώματος ανά τρυβλίο.
3. Υπολογίστε τον όγκο διαλύματος Ringer που απαιτείται, και την αντίστοιχη ποσότητα αλάτων που χρειάζονται για την παρασκευή 20 δοκιμαστικών σωλήνων με αραιωτικό υγρό (όγκος 9ml αραιωτικού ανά σωλήνα).

4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Οι μέθοδοι εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου των τροφίμων διακρίνονται σε έμμεσες και άμεσες. Έμμεσοι είναι οι μέθοδοι της αναγωγής χρωστικών (methylene blue), της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, της μετρήσεως της ATP, της μικροθερμιδομετρίας, της μέτρησης βακτηριακών μεταβολιτών κ.λ.π. Οι μέθοδοι αυτοί είναι γρήγοροι και αποτελεσματικοί και επομένως μπορούν να εφαρμοσθούν στη βιομηχανία, αλλά έχουν υψηλό κόστος εγκατάστασης του εξοπλισμού. Άμεσοι είναι οι μικροσκοπικές μέθοδοι και οι μέθοδοι που βασίζονται στη μέτρηση/εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξη μετά από επώαση του δείγματος σε στερεά ή υγρά υποστρώματα, οι οποίες επομένως μετρούν τα ζωντανά μικρόβια.

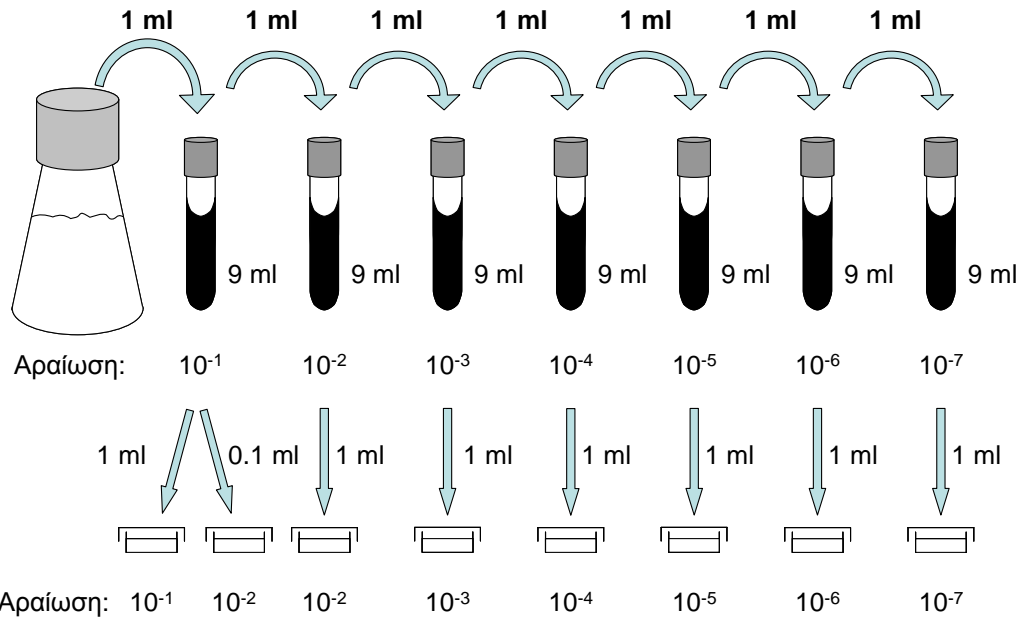
4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ ΜΕ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η εκτίμηση του ζωντανού μικροβιακού πληθυσμού των τροφίμων με τη χρήση στερεών υποστρωμάτων βασίζεται στην παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται στο άγαρ και σχηματίζει μια ορατή αποικία. Αυτή η παραδοχή δεν είναι απόλυτα σωστή διότι τα μικροβιακά κύτταρα του δείγματος ανήκουν σε διαφορετικά είδη με διαφορετικές φυσιολογικές απαιτήσεις και έτσι δεν αναπτύσσονται όλα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Μερικά μικρόβια λόγω θρεπτικών ελλείψεων του υποστρώματος, δυσμενών συνθηκών επώασης ή αντιμικροβιακών ουσιών (είτε είναι παρούσες στο υπόστρωμα είτε παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς) δεν σχηματίζουν ορατές αποικίες. Επιπλέον, μια αποικία δεν προέρχεται πάντα από ένα μικροβιακό κύτταρο. Μια αποικία μπορεί να σχηματιστεί από ένα ή περισσότερα κύτταρα.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων το δείγμα ομογενοποιείται όσο γίνεται καλύτερα για το διασκορπισμό των μικροβιακών κυττάρων. Έπειτα χρησιμοποιούνται διαφορετικά υποστρώματα και διαφορετικές συνθήκες επώασης, ώστε να καταστεί δυνατή η καταμέτρηση των διαφόρων μικροβιακών ομάδων (αερόβια, μεσόφιλα, ψυχρότροφα, κ.λ.π.) του δείγματος. Το αποτέλεσμα της εκτιμήσεως των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζεται σε Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units - CFU) / g ή ml δείγματος.

4.1.1 Περιγραφή μεθόδου καταμέτρησης αποικιών σε τρυβλία Petri

Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος και την παρασκευή της αρχικής αραιώσεως και σε σύντομο χρονικό διάστημα παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις με τη μεταφορά ενός όγκου δείγματος και 9-πλάσια ποσότητα αραιωτικού υγρού, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1. Ανάλογα το είδος του τροφίμου, χρησιμοποιείται φυσιολογικός πεπτονούχος ορός, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, διάλυμα Ringer κ.α. Πάντως όσο μεγαλύτερος όγκος υγρού μεταφέρεται τόσο η ακρίβεια της μεθόδου μεγαλώνει. Από την κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονται συνήθως δυο τρυβλία με την τεχνική της ενσωματώσεως ή την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης.



Διάγραμμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση παρασκευής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.

4.1.2. Μέτρηση των αποικιών και κανόνες αρίθμησης

Για την επιλογή των τρυβλίων και την αρίθμηση των αποικιών ακολουθούνται οι παρακάτω κανόνες

- i. Αριθμούνται όλες οι αποικίες, οποιουδήποτε μεγέθους. Απαιτείται προσοχή, ώστε να αποφεύγεται σύγχυση των αποικιών με σωματίδια του δείγματος ή ιζήματα του θρεπτικού υλικού. Αν υπάρχει αμφιβολία, η εξέταση γίνεται με τη βοήθεια φακού ή στερεοσκοπίου.
- ii. Επιλέγονται τα τρυβλία που μετά την αρίθμηση των αποικιών διαπιστώνεται ότι περιέχουν 30-300 αποικίες.
- iii. Ο αριθμός των αποικιών υπολογίζεται αν ο αριθμός αποικιών των επιλεγμένων τρυβλίων πολλαπλασιαστεί με το αντίστροφο της αντίστοιχης αραιώσης.

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

- iv. Αν από μια αραιώση έχουν ενοφθαλμιστεί δυο τρυβλία (30 - 300 αποικίες) τότε υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών και πολλαπλασιάζετε με το αντίστροφο της αραιώσης. Σε περίπτωση που μόνο ένα τρυβλίο έχει αποικίες μεταξύ 30-300, υπολογίζεται ξανά ο μέσος όρος των τρυβλίων.
- v. Εάν δυο τρυβλία από δυο διαδοχικές αραιώσεις έχουν 30-300 αποικίες, τότε για κάθε αραιώση υπολογίζεται ο αριθμός των αποικιών στο τρόφιμο (CFU/g ή ml) και εξάγεται ο μέσος όρος αυτών. Σε περίπτωση που ο λόγος του μεγαλύτερου αριθμού (CFU/g ή ml) προς τον μικρότερο αριθμού είναι μεγαλύτερος από 2, τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται μόνο με τον μικρότερο αριθμό (CFU/g ή ml).
- vi. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν λιγότερες από 30 αποικίες, το αποτέλεσμα εκφράζεται κατ'εκτίμηση με βάση των αριθμό των αποικιών του ή των τρυβλίων της μικρότερης αραιώσης.
- vii. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν περισσότερες από 300 αποικίες, επιλέγεται το τρυβλίο της μεγαλύτερης αραιώσης και αριθμούνται οι αποικίες με την βοήθεια τετραγωνισμένου πλέγματος. (πλέγμα στο οποίο το κάθε τετράγωνο έχει εμβαδό 1 cm^2 όταν υπάρχουν λιγότερες από 10 αποικίες ανά cm^2 , τότε αριθμούνται 12 τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος / cm^2 . εάν υπάρχουν περισσότερα από 10 αποικίες / cm^2 , τότε μετρούνται οι αποικίες σε 4 τετράγωνα και εξάγεται ο μέσος όρος ανά cm^2 . Κατόπιν ο μέσος όρος/ cm^2 πολλαπλασιάζετε με το συνολικό εμβαδό των τρυβλίων (συνήθως 56 ή 65 cm^2).

- viii. Εάν κανένα τρυβλίο δεν έχει αποικίες τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν < 1 επί τον συντελεστή της μικρότερης αραιώσης.
- ix. Εάν στα τρυβλία υπάρχουν αποικίες που παρουσιάζουν εξάπλωση στην επιφάνεια (spreaders), όπως του γένους *Proteus*, αριθμούνται οι αποικίες σε αντιπροσωπευτικά τμήματα μόνο. Σε περίπτωση που η εξάπλωση καλύπτει περισσότερο από το 50% της επιφάνειας του τρυβλίου, το αποτέλεσμα εκφράζεται ως εξάπλωση.
- x. Το τελικό αποτέλεσμα του αριθμού των αποικιών στρογγυλοποιείται στα 2 πρώτα ψηφία. Αν το τρίτο είναι 5 στρογγυλοποιείται στον αμέσως επόμενο αριθμό όταν το δεύτερο ψηφίο είναι περιττός και στον αμέσως μικρότερο αριθμό όταν είναι άρτιος, π.χ. ο αριθμός 185 γίνεται 180 ενώ το 135 γίνεται 140.

Πίνακας 1: Παραδείγματα υπολογισμού του αριθμού των αποικιών / g ή ml

Δείγμα	Αποικίες		Λόγος	Αποτέλεσμα CFU/g ή ml
	Αραιώση 10^{-2}	Αραιώση 10^{-3}		
1	228	23		$23 \cdot 10^3$
	240	27		
2	Εξάπλωση	34		$34 \cdot 10^3$
	Εξάπλωση	Εξάπλωση		
3	0	0		$< 10^2$
	0	0		
4	270	38	1.2	$29 \cdot 10^3$
	254	26		
5	310	26		$32 \cdot 10^3$
	354	37		
7	26	1		$\sim 27 \cdot 10^2$
	28	3		
9	295	62	2.4	$29 \cdot 10^3$
	283	76		
8	45	254		Εργαστηριακό Σφάλμα
	55	270		

4.2. Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΕΟΝ ΠΙΘΑΝΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ (MPN)

Σε αρκετές περιπτώσεις ο αριθμός των κυττάρων σε ένα δείγμα είναι πολύ χαμηλός και δεν μπορεί να καταμετρηθεί με τη μέθοδο των τρυβλίων. Για παράδειγμα αν στο νερό υπάρχουν 3 κύτταρα σε κάθε 100ml, αν κάνουμε με τη μέθοδο των τρυβλίων εμβολιασμό 1ml σε κάθε τρυβλίο με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης (βλ. σελ. 19) θα πάρουμε τελικό αποτέλεσμα $< 1 \text{ cfu/ml}$, αλλά δεν θα ξέρουμε αν στα 10 ή στα 100ml υπήρχαν μικροοργανισμοί. Σε αυτές τις περιπτώσεις, εφαρμόζουμε τη μέθοδο του πλέον πιθανού αριθμού (most probable number-MPN) που βασίζεται στην εκτίμηση του πληθυσμού ενός δείγματος υγρού ή στερεού τροφίμου, με βάση την παρουσία ή απουσία ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε μια σειρά 3 ή 5 δοκιμαστικών σωλήνων με υγρό ή στερεό υπόστρωμα. Η ανάλυση γίνεται σε 3 διαδοχικές αραιώσεις (συνήθως τις αραιώσεις 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , ή 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , και για κάθε αραιώση σημειώνουμε τον αριθμό των θετικών σωλήνων μετά από τον εμβολιασμό και την κατάλληλη επώαση του δείγματος.

4.2.1 Περιγραφής της τεχνικής MPN

Η τεχνική του πλέον πιθανού αριθμού (MPN: Most Probable Number) είναι ένας τρόπος εκτίμησης της πυκνότητας των ζωντανών μικροβίων σ' ένα δείγμα τροφίμου. Βασίζεται στη θεωρία των πιθανοτήτων. Τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης τύπου MPN σχετίζονται άμεσα με τη συχνότητα εμφάνισης μιας σειράς θετικών αποτελεσμάτων, που είναι το πιο πιθανό να συμβούν, όταν ορισμένος αριθμός μικροβίων υπάρχει στο δείγμα. Η ακρίβεια της μεθόδου αυτής δεν είναι τόσο μεγάλη. Η ακρίβεια αυτής εξαρτάται από τον αριθμό των σωλήνων (επαναλήψεις): όσο περισσότεροι σωλήνες ενοφθαλμίζονται από μια αραιώση τόσο πιο μεγάλη είναι η ακρίβεια. Θεωρητικά δεν υπάρχει όριο του αριθμού των σωλήνων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια αραιώση. Συνήθως χρησιμοποιούνται 3 ή 5 ή 10 σωλήνες. Για την εκτίμηση του MPN χρησιμοποιούνται ειδικοί πίνακες ή προγράμματα.

Η MPN εφαρμόζεται σε τρόφιμα με σχετικά μικρή μικροβιακή πυκνότητα (< 10-100 μικρόβια ή μονάδες που σχηματίζουν αποικίες ανά μονάδα δείγματος). Σε αυτή την περίπτωση δίνει μεγαλύτερης ακρίβειας τιμές από την μέθοδο των τρυβλίων. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό είτε της ολικής μικροβιακής χλωρίδας ενός τροφίμου (O.M.X) είτε ειδικών ομάδων μικροβίων χρησιμοποιώντας εκλεκτικά υποστρώματα. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η εφαρμογή της μεθόδου για την καταμέτρηση των κολοβακτηριοειδών στο νερό και γενικά στα τρόφιμα.

Η μέθοδος αυτή έχει τις εξής υποθέσεις: όλα τα μικρόβια είναι διασκορπισμένα ομοιόμορφα μέσα στο δείγμα. Τα μικρόβια είναι διαχωρισμένα, δεν είναι σε συσσωματώματα, και δεν απωθούνται μεταξύ τους. Κάθε σωλήνας που περιέχει έστω και ένα ζωντανό μικροοργανισμό θα παρουσιάσει ανιχνεύσιμη μεταβολή ή ανάπτυξη (θετικός σωλήνας). Οι σωλήνες είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους.

Το νόημα της τεχνικής MPN είναι να αραιώσουμε το δείγμα σε τέτοιο βαθμό ώστε οι σωλήνες να περιέχουν σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά όχι πάντα, ζωντανούς οργανισμούς. Επειδή στην μέθοδο MPN χρησιμοποιούνται υγρά υποστρώματα συνήθως μπορούμε να ενοφθαλμίσουμε μεγάλες ποσότητες δείγματος και αυξάνοντας τον αριθμό των σωλήνων για κάθε αραιώση αυξάνουμε την ευαισθησία της μεθόδου.

Κατά την μεθοδολογία παρασκευάζονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις δείγματος όπως και στην μέθοδο των τρυβλίων. Μετέπειτα, συγκεκριμένος όγκος δείγματος ενοφθαλμίζεται σε σωλήνες που περιέχουν κατάλληλο υπόστρωμα και γίνεται επώαση σε κλίβανους επώασης. Ένας σωλήνας από μια αραιώση θεωρείται θετικός αν παρουσιάζει μικροβιακή ανάπτυξη. Αυτή συνήθως μπορεί να διαπιστωθεί από τη θολερότητα του υποστρώματος (μικροβιακή ανάπτυξη). Μάλιστα η ένταση της θολερότητας είναι ανάλογη της μικροβιακής ανάπτυξης. Επίσης η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να εξακριβωθεί με την ανίχνευση των μεταβολικών προϊόντων των μικροβίων. Αυτό περιλαμβάνει την ανίχνευση παραγωγής αερίου (για μικροοργανισμούς που παράγουν αέριο κάτω από ορισμένες συνθήκες), ανίχνευση οξέος ή βάσεως (τιτλοδότηση ή συνήθως προσθέτουμε στο υπόστρωμα ένα δείκτη pH), αποχρωματισμό των υποστρωμάτων που περιέχουν δείκτες π.χ. δείκτες που όταν αναχθούν αλλάζουν χρώμα (αποχρωματίζονται). Ακόμα, ειδικά υποστρώματα ανιχνεύουν μεταβολικές δραστηριότητες μικροβίων π.χ. αναγωγή των νιτρικών, παραγωγή ινδόλης, υδρόλυση του αμύλου, παραγωγή H₂S κ.τ.λ.. Τέλος, συμπληρωματικές δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Αυτές περιλαμβάνουν την άμεση μικροσκοπική εξέταση του δείγματος και η δημιουργία υποκαλλιεργιών (subcultures), όπου δείγμα μεταφέρεται σε κατάλληλο υπόστρωμα και επώαζεται στις κατάλληλες συνθήκες.

4.2.2 Υπολογισμός του Πλέον Πιθανού Αριθμού (MPN)

Οι πίνακες MPN δίνουν όλους τους συνδυασμούς των θετικών αποτελεσμάτων, που είναι στατιστικά σημαντικοί. Οι πιο πολλοί πίνακες υπολογισμού του MPN δίνουν τιμές με όρια εμπιστοσύνης 95 % και 99%. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως “αριθμός μικροβίων / g ή ml δείγματος με τη MPN μέθοδο”. Ακόμη αναγράφεται και ο αριθμός των σωλήνων που χρησιμοποιούνται., π.χ. Coliforms 3 σωλήνες MPN/g = 10.

Όταν χρησιμοποιούνται περισσότερες από τρεις αραιώσεις του δείγματος, χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα μόνο τριών διαδοχικών αραιώσεων. Με βάση τους θετικούς σωλήνες της κάθε αραιώσης προκύπτει ένας συνδυασμός τριών αριθμών (βλέπε Πιν.2). Στο συγκεκριμένο πίνακα ο κάθε συνδυασμός δίνει το MPN δείκτη στην μεσαία αραιώση του συνδυασμού ανά μονάδα δείγματος (g ή ml). Στην συνέχεια, όπως και στην μέθοδο των τρυβλίων, πολλαπλασιάζουμε με το αντίστροφο της μεσαίας αραιώσης.

Πίνακας 2: Τιμή MPN για συνδυασμούς θετικών σωλήνων όταν ενοφθαλμίζονται σε 3 σωλήνες ανά αραιώση

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
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

4.2.3 Επιλογή των τριών θετικών σωλήνων

Αν επιλεγούν οι 3 κατάλληλες αραιώσεις για τον υπολογισμό των θετικών σωλήνων τότε οι πίνακες θα μας δώσουν μια εκτίμηση στατιστικά αποδεκτή του πιθανού αριθμού μικροβίων στο δείγμα.

Για την εξαγωγή του τριψήφιου συνδυασμού αριθμού, (α) μια απλή μέθοδος είναι να βρίσκουμε την μεγαλύτερη αραιώση (ο μικρότερος όγκος δείγματος) στην οποία όλοι οι σωλήνες είναι θετικοί και οι άλλες επόμενες δυο διαδοχικές αραιώσεις αποτελούν την τριάδα των αραιώσεων. Σε περίπτωση που υπάρχει ένα η περισσότερα θετικά αποτελέσματα σε μεγαλύτερη αραιώση, προσθέτουμε τον αριθμό ή αριθμούς στον αριθμό των θετικών σωλήνων της μεγαλύτερης αραιώσης (τελευταίου αριθμού στο συνδυασμό).

(β) Για την εύρεση του τριψήφιου συνδυασμού, πρώτα αφαιρείται η μεγαλύτερη αραιώση με αρνητικό αποτέλεσμα εάν η άμεσος προηγούμενη αραιώση έχει και αυτή αρνητικούς σωλήνες. Όσο αυτή η συνθήκη ισχύει και τουλάχιστον 4 αραιώσεις παραμένουν, συνεχίζουμε να αφαιρούμε τις αραιώσεις. Κατόπιν, αν μόνο τρεις αραιώσεις παραμένουν, τις χρησιμοποιούμε όπως στο παράδειγμα Α (Πίνακας 1). Στο παράδειγμα Α, αφαιρούμε τις 2 μεγαλύτερες αραιώσεις (10^{-3} και 10^{-4}) και απομένουν 3 αραιώσεις που τις χρησιμοποιούμε στον συνδυασμό.

Εάν περισσότερες από τρεις αραιώσεις απομένουν, τότε βρίσκουμε την μεγαλύτερη αραιώση με όλους τους σωλήνες θετικούς. Τότε υπάρχουν τρεις περιπτώσεις: Στην πρώτη περίπτωση, η μεγαλύτερη αραιώση με όλους τους σωλήνες θετικούς είναι μέσα στους τρεις μεγαλύτερες αραιώσεις που απομένουν. Τότε χρησιμοποιούμε αυτές τις τρεις αραιώσεις. Στο παράδειγμα Β το πρώτο βήμα αφαιρεί την μεγαλύτερη αραιώση (10^{-4}) και εφόσον η μεγαλύτερη αραιώση με όλους του σωλήνες θετικούς (10^{-1}) εμπεριέχεται στις τρεις μεγαλύτερες εναπομείναντες αραιώσεις (10^{-1} , 10^{-2} και 10^{-3}) χρησιμοποιούμε αυτές. Στο παράδειγμα Γ, η μεγαλύτερη αραιώση με όλους τους σωλήνες θετικούς (10^{-3} αραιώση) είναι μέσα στις τρεις μεγαλύτερες αραιώσεις (10^{-2} , 10^{-3} και 10^{-4}).

Στην δεύτερη περίπτωση, η μεγαλύτερη αραιώση με όλους τους σωλήνες θετικούς δεν βρίσκεται στις τρεις εναπομείναντες μεγαλύτερες αραιώσεις. Τότε, επιλέγουμε τις 2 επόμενες μεγαλύτερες αραιώσεις από την αραιώση με όλους τους σωλήνες θετικούς. Επιπλέον, προστίθενται στην τελευταία αραιώση του συνδυασμού όλοι οι θετικοί σωλήνες των μεγαλύτερων αραιώσεων. Στο παράδειγμα Δ, η μεγαλύτερη αραιώση με όλους του σωλήνες θετικούς είναι η 10^0 . Επιλέγουμε τις δυο αμέσως επόμενες αραιώσεις (10^{-1} και 10^{-2}). Στην αμέσως επόμενη αραιώση προστίθενται οι εναπομείναντες θετικοί σωλήνες των μεγαλύτερων αραιώσεων.

Στην τρίτη περίπτωση, δεν υπάρχει καμία αραιώση με όλους τους σωλήνες θετικούς. Στην περίπτωση αυτή, τότε διαλέγουμε τις δυο μικρότερες αραιώσεις και προστίθεται το άθροισμα των

θετικών σωλήνων των μεγαλύτερων αραιώσεων στην τρίτη αραιώση. Για παράδειγμα, στο παράδειγμα Ε καμία αραιώση δεν έχει όλους τους σωλήνες θετικούς. Οι δυο μικρότερες αραιώσεις είναι 10^0 και 10^{-1} και το άθροισμα των θετικών σωλήνων των μεγαλύτερων αραιώσεων χρησιμοποιείται για την εύρεση του αριθμού των σωλήνων για το τελευταίο νούμερο του συνδυασμού.

Τέλος εάν ο επιλεγθείς συνδυασμός δεν υπάρχει στους πίνακες (στην περίπτωση 3 σωλήνων όταν υπάρχει ο αριθμός 4 στο συνδυασμό) τότε κατά την διαδικασία των αραιώσεων κάτι δεν πήγε καλά. Αυτό είναι μια προειδοποίηση, ότι το αποτέλεσμα είναι ακατάλληλο και αντίθετο από τις βασικές υποθέσεις της μεθόδου MPN. Εάν μια MPN τιμή είναι παρόλα αυτά επιθυμητή τότε χρησιμοποιούμε τις επόμενες τρεις μεγαλύτερες αραιώσεις. Στο παράδειγμα Ζ οι τρεις μεγαλύτερες αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του συνδυασμού. Αν και αυτές δεν είναι στους πίνακες τότε χρησιμοποιούμε τις μεγαλύτερες αραιώσεις με έστω και ένα θετικό σωλήνα.

Πίνακας 3: Παραδείγματα υπολογισμού του τριμήφιου συνδυασμού των θετικών τιμών με την μέθοδο MPN. Με “χ” απεικονίζονται οι αραιώσεις που δεν χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του συνδυασμού. Σε κάθε παράδειγμα υπάρχουν 3 σωλήνες σε κάθε αραιώση.

Παράδειγμα	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Συνδυασμός
A	2	1	0	0	0	210χχ
B	3	3	1	0	0	χ310χ
Γ	3	3	2	3	1	χχ231
Δ	3	2	2	1	1	χχ222
E	2	1	0	1	0	211χχ
Z	2	2	1	2	1	χχ121

5. ΟΛΙΚΗ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΕΣΟΦΙΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (ΟΜΧ)

5.1 Γενικά

Ο πληθυσμός των αερόβιων μεσόφιλων μικροβίων, τα οποία με τη χρήση ορισμένου υποστρώματος και σε ορισμένη θερμοκρασία και χρόνο επώασης (η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι μεταξύ 30 °C και 37 °C), μπορούν να αναπτυχθούν και να δώσουν από μία ορατή αποικία, χαρακτηρίζεται ως "Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ)" ή "Συνολικός Αριθμός Μεσόφιλων (ΣΑΜ)", έχει δε ως σκοπό την εκτίμηση της υγιεινής κατάστασης των προϊόντων. Η ανεύρεση μεγάλου αριθμού, έστω και μη παθογόνων μικροβίων, φανερώνει συνθήκες επεξεργασίας και συντήρησής τους όχι ικανοποιητικές.

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, που είναι γνωστός και με το όνομα "μικροβιακό φορτίο", εκφράζεται ανά γραμμάριο ή κυβικό εκατοστό (ml) τροφίμου, είναι δε μικρότερος ή μεγαλύτερος, ανάλογα με :

- τη χημική σύσταση
- τη μηχανική σύσταση ή υφή
- την περιεκτικότητά του σε παράγοντες που παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων (αλάτι, συντηρητικά, μπαχαρικά, αντιβιοτικά, κ.τ.λ.)
- την περιεκτικότητά του σε υγρασία και κατ' επέκταση την ενεργότητα του νερού
- 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 της κατανάλωσής του κ.τ.λ..

Γενικά, τα τρόφιμα που έχουν συντηρηθεί κατά τον ένα ή τον άλλο τρόπο (ξήρανση - αφυδάτωση, ψύξη - κατάψυξη, προσθήκη συντηρητικών, ακτινοβολήση, κονσερβοποίηση) φέρουν μικροβιακό φορτίο κατά πολύ μικρότερο από ότι τα μη επεξεργασμένα (πρώτη ύλη). Ακόμη όμως και τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα δεν είναι τελείως στείρα.

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, γιατί όσο μικρότερο είναι το μικροβιακό φορτίο τόσο καλύτερο, ποιοτικά, είναι το τρόφιμο. Και τούτο, γιατί τα μικρόβια, αναπτυσσόμενα στα τρόφιμα, καταναλώνουν συστατικά, που είναι πολύτιμα για την ορθολογική διατροφή του ανθρώπου, ενώ παράλληλα σχηματίζουν ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα μεταβολισμού, κατά κανόνα δύσοσμα και κακόγευστα ή οπωσδήποτε ξένα προς τα κανονικά συστατικά των τροφίμων.

Σε ειδικές μάλιστα περιπτώσεις τα ενδιάμεσα προϊόντα μπορεί να είναι τοξίνες ή άλλα προϊόντα μεταβολισμού, που είναι επικίνδυνα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Άλλοτε, τέλος, τα τρόφιμα είναι απλοί φορείς παθογόνων μικροβίων για τον άνθρωπο.

Τα ανωτέρω δεν έχουν εφαρμογή στην περίπτωση προϊόντων που υπόκεινται σε ζύμωση, γιατί τότε, το αυξημένο μικροβιακό φορτίο, ανά γραμμάριο υποστρώματος, οφείλεται σε μικρόβια που θα επιτελέσουν τη ζύμωση και είναι δείκτης ορθής μεταχείρισης, από την πλευρά του μικροβιολόγου τροφίμων.

Στόχοι της αρίθμησης των μικροβίων στα τρόφιμα

Οι στόχοι της αρίθμησης είναι τρεις:

- 1) Η εκτίμηση του συνολικού μικροβιακού φορτίου, χωρίς να ενδιαφέρουν οι διάφορες κατηγορίες και τα είδη.
- 2) Η εκτίμηση τοξινογόνων μικροβίων στο τρόφιμο.

3) Η ανίχνευση και αρίθμηση παθογόνων για τον άνθρωπο μικροβίων, τα οποία μεταφέρονται παθητικά με το τρόφιμο, χωρίς να μπορούν να πολλαπλασιασθούν και να προξενήσουν σ' αυτό αλλοιώσεις.

Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ειδικά θρεπτικά υποστρώματα (εκλεκτικά) και εφαρμόζονται ειδικές τεχνικές.

Το συνολικό μικροβιακό φορτίο με οποιαδήποτε μέθοδο και αν εκτιμηθεί, αναφέρεται σε μια ορισμένη χρονική στιγμή της όλης εμπορικής ζωής του τροφίμου, γιατί υπόκειται σε συνεχείς μεταβολές. Στο κρέας υπό ψύξη π.χ. σημειώνεται αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού σε σχέση με την αρχική τιμή, ενώ στα αποξηραμένα και στα κατεψυγμένα τρόφιμα σημειώνεται μείωση.

Σε κάθε χώρο υπάρχουν κανονισμοί, αγορανομικές διατάξεις και κριτήρια (standards), που καθορίζουν, για κάθε προϊόν, τα όρια ανοχής σε μικρόβια. Γενικά, όμως, θα μπορούσε να λεχθεί ότι, ένα τρόφιμο με μικροβιακό φορτίο 10^7 - 10^8 μικροβίων ανά γραμμάριο έχει ήδη εισέλθει στο στάδιο της αλλοίωσης.

Με την εκτίμηση του ολικού μικροβιακού φορτίου 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. Με την ίδια μικροβιακή ανάλυση μπορούν να εντοπιστούν πηγές μόλυνσης και ρύπανσης των τροφίμων σε κάποιο σημείο της γραμμής επεξεργασίας.

5.2 Τεχνική μέτρησης OMX

Θρεπτικό υλικό

Plate Count Agar (PCA)

Peptone from casein	5,0 g
Yeast extract	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0g
D.W	1000,0 ml

pH $7,0 \pm 0,2$

Αποστείρωση στους $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 min.

Μέτρηση μικροβίων μέσα σε μάζα στερεού θρεπτικού υλικού σε τρυβλία

Ο εμβολιασμός ενός βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται με δύο ποσοτικές τεχνικές: με την τεχνική της **επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique)** και την τεχνική της **ενσωμάτωσης (pour plate technique)**.

Η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης αφορά εξάπλωση γνωστού όγκου βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό. Εφαρμόζεται, γενικά στους αερόβιους μικροοργανισμούς.

Η τεχνική της ενσωμάτωσης αποτελείται από τα εξής στάδια: α) τοποθέτηση γνωστού όγκου βακτηριακού εναιωρήματος σε τρυβλίο και β) απόχυση θρεπτικού υλικού, που περιέχει άγαρ και είναι σε θερμοκρασία $42-45^{\circ}\text{C}$ (ρευστή κατάσταση). Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς.

Μέθοδος ενσωμάτωσης

Ρευστοποίηση του θρεπτικού υλικού σε υδατόλουτρο που βράζει. Ψύξη στους $45 - 47\text{ }^{\circ}\text{C}$. Διανομή ανά $1,0\text{ ml}$ από το προϊόν-δείγμα, όπως είναι ή από τις αραιώσεις του, σε τρυβλία, με την τεχνική του ενοφθαλμισμού των τρυβλίων. Προσθήκη $12-15\text{ ml}$ θρεπτικού υλικού. Προσεκτική ανακίνηση των

τροβλίων, με περιστροφικές κινήσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις (προς τη φορά των δεικτών του ωρολογίου και αντίθετα), καθώς επίσης και με σταυροειδείς κινήσεις ή με μηχανικό ανακινητήρα. Παραμονή των τροβλίων, για στερεοποίηση, σε απόλυτα οριζόντια θέση. Αναστροφή και επώαση των τροβλίων στους 35 - 37 °C, για 48h ή 32 °C, για 72h.

Μετά την διανομή στα τροβλία του υλικού που εξετάζεται, η προσθήκη του θρεπτικού υλικού σ' αυτά πρέπει να γίνει το γρηγορότερο δυνατό και σε χρόνο όχι περισσότερο από 10 min.

Το αποτέλεσμα της μέτρησης δεν εκφράζει αριθμό μικροβίων, αλλά αριθμό αποικιών, που αναπτύχθηκαν σε ορισμένο χρόνο και θερμοκρασία, από συγκεκριμένη ποσότητα προϊόντος (cfu / g ή ml - colony forming units).

Ο αριθμός των αποικιών που ανευρίσκονται, είναι μικρότερος από τον αριθμό των μικροβίων (ζώντων), που υπάρχουν πραγματικά μέσα στο δείγμα (Total Viable Count-TVC), γιατί:

- 1) Τα μικρόβια βρίσκονται μέσα στο "μείγμα" μεμονωμένα, με μορφή αθροισμάτων ή αλυσίδων.
- 2) Πιθανόν, τα υποχρεωτικά αερόβια μικρόβια δεν αναπτύσσονται μέσα στη μάζα του θρεπτικού υλικού, από έλλειψη οξυγόνου.
- 3) Είναι δυνατό να καταστραφούν τα θερμοευαίσθητα μικρόβια, όταν προστεθεί το θρεπτικό υλικό και μέχρι την ψύξη του (~45 °C).
- 4) Μερικά από αυτά δεν αναπτύσσονται στη θερμοκρασία επώασης, που έχει επιλεγεί, σε κάθε περίπτωση.
- 5) Ορισμένα. μπορεί να έχουν εκτεθεί σε σχεδόν θανατηφόρες για αυτά συνθήκες, παρόλα αυτά διατηρούν τη ζωτικότητα τους, χωρίς να μπορούν όμως να σχηματίσουν αποικίες.

Τα μικρόβια αυτά (1, 2, 4, 5) θα αποκατασταθούν στο ακέραιο, αν βρεθούν υπό ευνοϊκές, ώστε να επουλώσουν τα τραύματά τους.

Μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης

Ρευστοποίηση του θρεπτικού υλικού σε υδατόλουτρο που βράζει. Ψύξη στους 45 - 47 °C. Απόχυση ποσότητας θρεπτικού υλικού 12-15 ml σε κάθε τροβλίο. Παραμονή των τροβλίων, για στερεοποίηση, σε απόλυτα οριζόντια θέση. Εξάπλωση με τον κρίκο ενοφθαλμισμού 0.1 ml δείγματος σε όλη την επιφάνεια του στερεού υποστρώματος κάνοντας κυκλικές κινήσεις. Επώαση των τροβλίων στους 35 - 37 °C, για 48h ή 32 °C, για 72h.

Παρατηρήσεις

Η εκλεκτικότητα των θρεπτικών υλικών προκαλεί μείωση της ικανότητάς τους για την ανάπτυξη των μικροβίων. Για τον περιορισμό των μειονεκτημάτων απαιτούνται:

- Χρησιμοποίηση υλικών, που περιέχουν παράγοντες θρεπτικούς και ανασταλτικούς, καθορισμένης, γνωστής και ελεγχμένης ποιότητας.
- Ακριβής καθορισμός της συγκέντρωσης των παραπάνω παραγόντων μέσα στα θρεπτικά υλικά.
- Έλεγχος των θρεπτικών υλικών. με χρησιμοποίηση γνωστών στελεχών μικροβίων.
- Επιτρέπεται μια φορά μόνο η ρευστοποίηση στερεού θρεπτικού υλικού και η χρησιμοποίησή του μέσα σε 3h, το αργότερο, από την τοποθέτησή του στο υδατόλουτρο, διότι η άσκοπη και επαναλαμβανόμενη υπερθέρμανση των θρεπτικών υλικών προκαλεί μείωση της εκλεκτικότητας και επηρεάζει την εξειδίκευσή τους.
- Αν θρεπτικό υλικό, μετά τη ρευστοποίησή του, παρουσιάζει ίζημα, δεν χρησιμοποιείται, ως ακατάλληλο.



Εικόνα 1. Τρυβλίο με PCA για μέτρηση OMX (οι διαφορετικοί οργανισμοί που αναπτύσσονται δημιουργούν αποικίες διαφορετικού μεγέθους, σχήματος και χρώματος)

6. 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.

Μηχανικό μέρος ή στατό

Αυτό περιλαμβάνει :

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. Μέσα στο κουτί υπάρχει σύστημα πρισμάτων που διαιρεί τη φωτεινή δέσμη που προέρχεται από τον αντικειμενικό φακό σε δύο παράλληλες δέσμες, μια για κάθε προσοφθάλμιο φακό. 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. Σχηματίζει κάτι σαν καπάκι και έχει έκκεντρη θέση σε σχέση με το σωλήνα. Η ζώνη του δίσκου που αντιστοιχεί στο σωλήνα φέρει ισοδιαμετρική μ' αυτόν οπή. Ο κάτω δίσκος είναι συγκεντρικός προς τον άνω δίσκο και ο άξονας της περιστροφής του είναι στερεωμένος ακριβώς στο κέντρο αυτού (του άνω δίσκου). 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. Ο εξωτερικός μεγάλος κοχλίας (αδρός κοχλίας) προκαλεί γρήγορη μετακίνηση, ενώ ο εσωτερικός (μικρομετρικός κοχλίας) προκαλεί ελάχιστη μετακίνηση και χρησιμεύει για την ακριβή ρύθμιση του οργάνου και την ευκρινή παρατήρηση του παρασκευάσματος.
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. Η μετακίνηση του παρασκευάσματος έχει μεγάλη σημασία γιατί επιτρέπει την εξέταση όλης της επιφάνειάς του.

Οπτικό μέρος

Αυτό περιλαμβάνει. το φωτιστικό σύστημα, τον πυκνωτή και τους φακούς.

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. Στην κάτω επιφάνειά του υπάρχει διάφραγμα με το οποίο μπορούμε να ρυθμίσουμε την ποσότητα του φωτός που μπαίνει σ'αυτόν.

Ο συμπυκνωτής είναι σύστημα από δύο ή περισσότερους φακούς και χρησιμεύει, για να δέχεται τη φωτεινή δέσμη από την πηγή φωτός και να τη συμπυκνώνει σε έναν κώνο, του οποίου η κορυφή φωτίζει μια επιφάνεια του παρασκευάσματος ίση προς το οπτικό πεδίο του αντικειμενικού φακού.

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. Ο σκοπός που χρησιμοποιείται, αντί για να φακό, σύστημα από φακούς είναι να εξουδετερωθούν τα μειονεκτήματα των φακών. 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*. Η διαφορά τους οφείλεται στο μέσο που παρεμβάλλεται μεταξύ του μετωπικού φακού του συστήματος και του παρασκευάσματος. Στους ξηρούς φακούς το μέσο που παρεμβάλλεται είναι ο αέρας, ενώ στους καταδυτικούς χρησιμοποιούμε κεδρέλαιο.

Το όλο σύστημα των φακών φέρεται μέσα σε σωλήνα και αποτελεί ένα αντικειμενικό φακό. Κάθε φακός βιδώνεται με το άνω άκρο του στον περιστρεφόμενο δίσκο του σωλήνα.

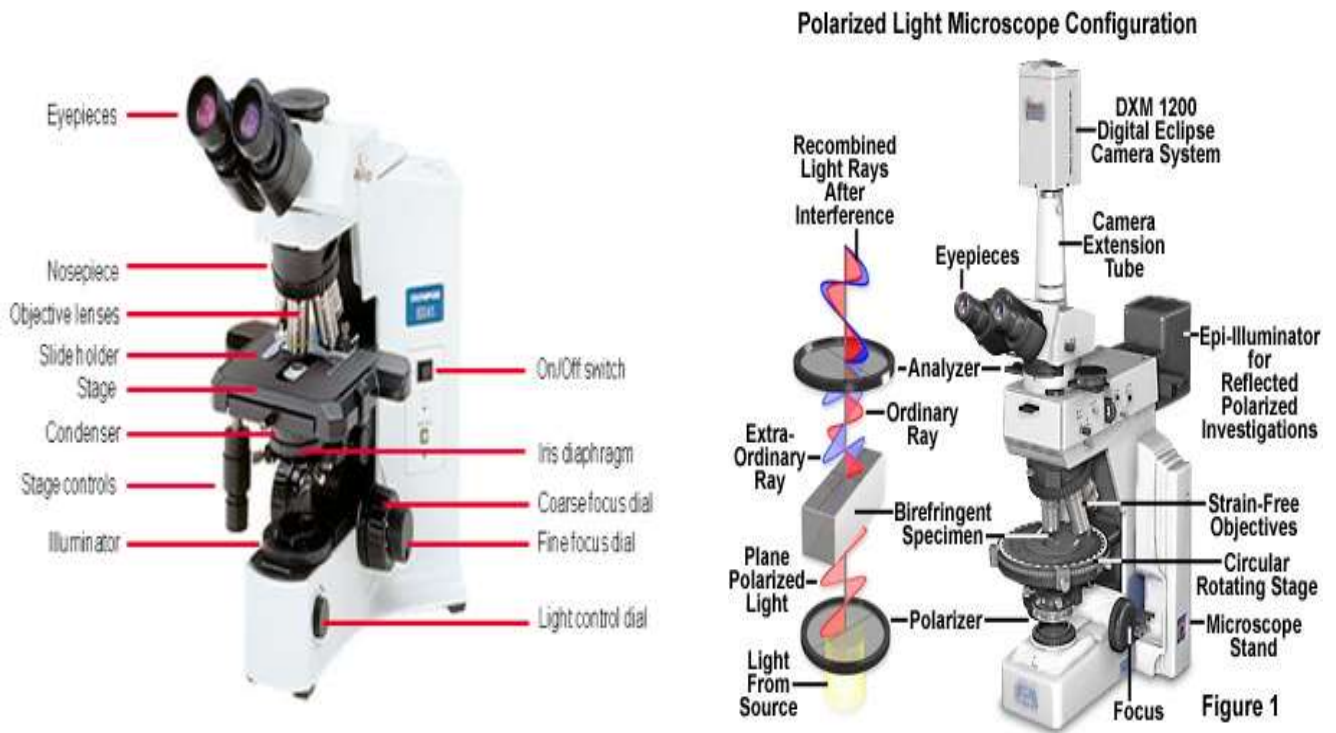
Σε κάθε μικροσκόπιο υπάρχουν συνήθως τρεις ξηροί φακοί διάφορων μεγεθύνσεων π.χ. X10, X20, X40 και ένας καταδυτικός, π.χ. X100 ή X120.

Στους αντικειμενικούς φακούς υπάρχουν διάφοροι αριθμοί, που φανερώνουν τη μεγέθυνση (ή την εστιακή απόσταση), το αριθμητικό άνοιγμα του φακού και το πάχος της αντικειμενοφόρου πλάκας.

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.

Υπάρχουν διάφορων τύπων προσοφθάλμιοι. Κανονικά, οι προσοφθάλμιοι έχουν μεγέθυνση από X5 ως X15. Η χρησιμοποίηση όμως φακών με συντελεστή μεγεθύνσεως μεγαλύτερο από X10 σε συνδυασμό με συνηθισμένους αντικειμενικούς φακούς πρέπει να αποφεύγεται. κι αυτό γιατί οι συνηθισμένοι αντικειμενικοί φακοί δίνουν εικόνα που δεν μπορεί να δεχθεί δεύτερη σημαντική μεγέθυνση.



Εικόνα 2. Διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο

Ολική Μεγέθυνση Μικροσκοπίου

Η 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

Από την παραπάνω σχέση προκύπτει ότι, για να αυξήσουμε τη διαχωριστική ικανότητα του μικροσκοπίου πρέπει

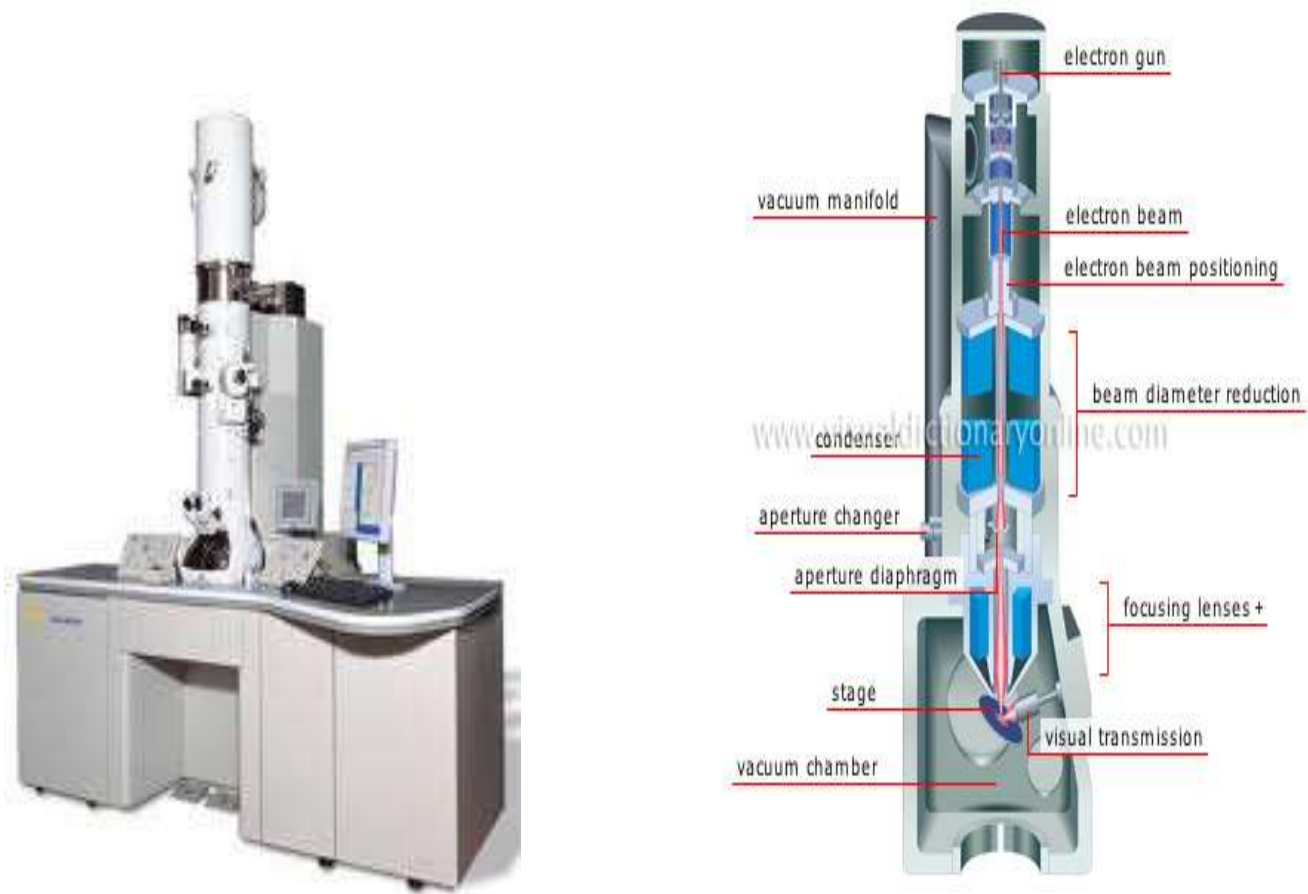
α) Να ελαττώσουμε το λ , δηλαδή να χρησιμοποιήσουμε μονοχρωματικό φως μικρού μήκους κύματος, π.χ. υπεριώδες (μικροσκόπιο υπεριώδους φωτός). Ακόμη μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αντί για φως, δέσμη ηλεκτρονίων (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο).

β) Να αυξήσουμε το δείκτη διαθλάσεως n . Γι'αυτό το σκοπό χρησιμοποιούμε καταδυτικό φακό και υγρό με υψηλό δείκτη διαθλάσεως.

γ) Να αυξήσουμε τη γωνία β . Αυτό το πετυχαίνουμε χρησιμοποιώντας αντικειμενικούς φακούς, που έχουν μετωπικό φακό επίπεδο κυρτό. Όταν η επίπεδη επιφάνεια του φακού αυτού είναι στραμμένη προς το αντικείμενο, εισέρχεται σε αυτό δέσμη φωτός με μεγάλο άνοιγμα.

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

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



Εικόνα 3. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα του μικροσκοπίου

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.

7. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΠΛΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

7.1. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

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 πρωτόπλασμα τους, η δομή τους γενικά και τα διάφορα συστατικά τους ειδικότερα, διατηρούνται στις κανονικές τους θέσεις. Με την άσκηση αυτή θα μονιμοποιήσετε μικροοργανισμούς από δικές σας καλλιέργειες και αφού τους χρωματίσετε, θα τους παρατηρήσετε στο μικροσκόπιο.

Υλικά και συσκευές

Χρωστικές: Μπλε του μεθυλενίου, Κρυσταλλικό ιώδες, Φουξίνη και εωζίνη

Αντικειμενοφόροι πλάκες

Καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων

Μικροβιολογικός κρίκος

Αποσταγμένο νερό

Υδροβολείς

Λεκάνες χρώσης

Μικροσκόπια

Πειραματικό μέρος

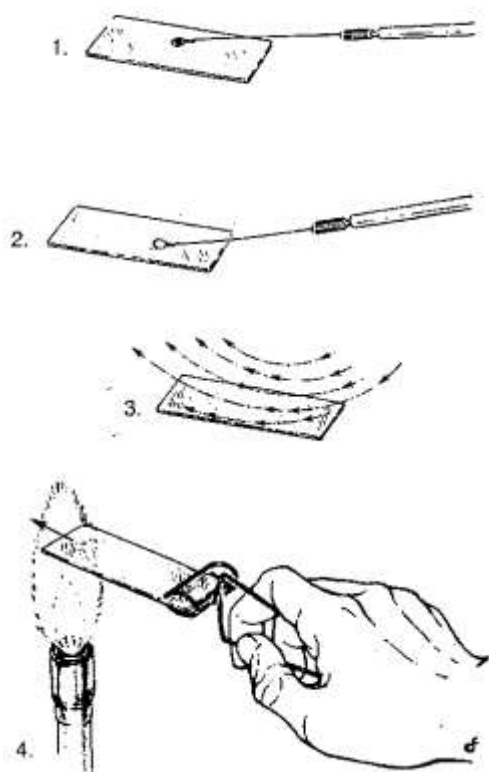
Η μέθοδος μονιμοποίησης των παρασκευασμάτων που περιγράφεται πιο κάτω φαίνεται στο σχήμα 1.

1. Με το μικροβιολογικό κρίκο μεταφέρετε σε μια καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα μια μικρή σταγόνα από καθαρή καλλιέργεια. Στην περίπτωση που μεταφέρονται μικρόβια μιας αποικίας από στερεό υπόστρωμα, προσθέστε στην αντικειμενοφόρο πλάκα μια σταγόνα αποσταγμένου νερού και μετά τα μικρόβια.

2. Η σταγόνα απλώνεται με τον κρίκο στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Θα πρέπει το στρώμα των μικροβίων που θα σχηματισθεί να είναι αρκετά αραιό ώστε να είναι δυνατή η μικροσκοπική παρατήρηση μονών οργανισμών.

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 αντικειμενοφόρος πλάκα μετά το πέρασμα από τη φλόγα θα πρέπει να είναι ζεστή, όχι καυτή. Για να βεβαιωθείτε πόσο γρήγορα πρέπει να γίνεται το πέρασμα από τη φλόγα, εξασκηθείτε χρησιμοποιώντας μια άλλη αντικειμενοφόρο πλάκα.



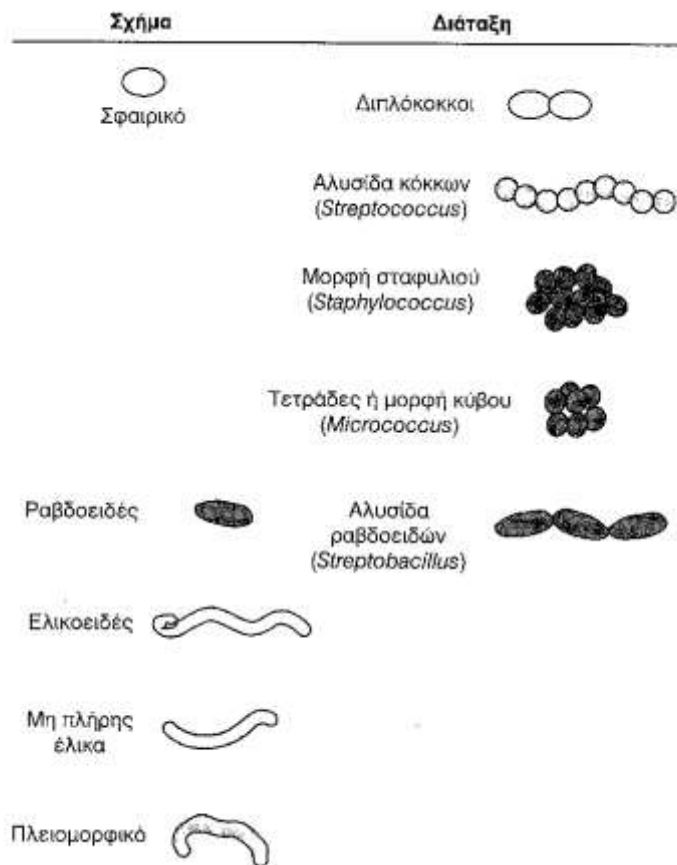
Εικόνα 4. Μονιμοποίηση παρασκευάσματος

7.2. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΠΛΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Α. 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 διάσταση ως εξής: $XMM \rightarrow MM^+ + X^-$. Το χρώμα δηλαδή της χρωστικής συνοδεύει το κατιόν του άλατος (MM^+). 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. Γενικά όσο ελαττώνεται η οξύτητα του περιβάλλοντος (όσο δηλαδή αυξάνεται το pH) αυξάνεται το ποσό των αρνητικών φορτίων του κυττάρου, γι' αυτό και η σύνδεση των αλκαλικών χρωστικών γίνεται ευκολότερα. Το αντίθετο ισχύει για τις όξινες χρωστικές.

Στην άσκηση αυτή θα χρησιμοποιήσετε τις αλκαλικές χρωστικές, μπλε του μεθυλενίου, κρυσταλλικό ιώδες και φουξίνη. Οι 3 αυτές χρωστικές διαφέρουν μεταξύ τους σε ό,τι αφορά την ταχύτητα και το βαθμό με τον οποίο χρωματίζουν τα κύτταρα. Το μπλε του μεθυλενίου για να χρωματίσει κατάλληλα ένα επίχρισμα σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα χρειάζεται 60 δευτερόλεπτα, ενώ οι απαραίτητοι χρόνοι για το κρυσταλλικό ιώδες και την φουξίνη είναι 10-30 και 10 δευτερόλεπτα αντίστοιχα.



Εικόνα 5. Μορφολογία και διάταξη βακτηριακών κυττάρων

Πειραματικό μέρος

1. Με το μικροβιολογικό κρίκο μεταφέρετε ένα μικρό δείγμα μικροοργανισμών σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα και ακολουθήστε την πορεία που περιγράφηκε προηγουμένως, για μονιμοποίηση του δείγματος.
2. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα, όπως κι αυτές που μονιμοποιήθηκαν προηγουμένως, στην ειδική λεκάνη χρώσης.
3. Καλύψτε τα μονιμοποιημένα επιχρίσματα με 2-3 σταγόνες χρωστικής. Κάθε επίχρισμα μένει με μια από τις 3 χρωστικές τον απαραίτητο χρόνο (60" για το μπλε του μεθυλενίου, 10-30 για το κρυσταλλικό ιώδες και 10" για τη φουξίνη).
4. Πλύνετε τα επιχρίσματα με αρκετό νερό.
5. Στεγνώστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με διηθητικό χαρτί.
6. Παρατηρήστε τα παρασκευάσματα στο μικροσκόπιο. Σημειώστε το σχήμα και τη διάταξη των μικροοργανισμών που παρατηρείτε σύμφωνα με τις πληροφορίες του σχήματος 2

B. Χρώση με όξινες χρωστικές (Έμμεση Χρώση)

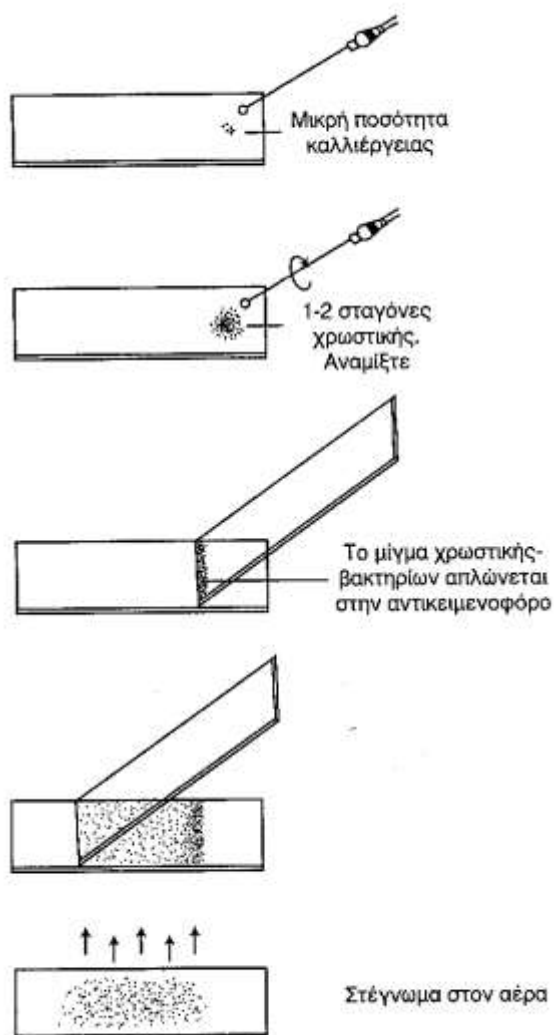
Η πιο κοινή όξινη χρωστική είναι η εωζίνη που χρησιμοποιείται ως διαλυτό άλας (νάτριο της εωζίνης που διίσταται στα κατιόντα νατρίου και ανιόντα εωζίνης). Η ισχυρή χρωστική ικανότητα της εωζίνης οφείλεται στα ανιόντα της.

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. Παρόλο που η χρώση αυτή

δεν χρησιμοποιείται πολύ στη Μικροβιολογία, βρίσκει εφαρμογή στις περιπτώσεις που τα βακτήρια δεν χρωματίζονται επαρκώς με άλλες χρώσεις.

Πειραματικό μέρος

- Μεταφέρετε με το μικροβιολογικό κρίκο βακτήρια από τις καλλιέργειες σας σε μια καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Αποστειρώστε το μικροβιολογικό κρίκο.
- Προσθέστε μικρή ποσότητα μιας όξινης χρωστικής
- Αναμίξτε τα βακτήρια με τη χρωστική.
- Χρησιμοποιώντας μια άλλη αντικειμενοφόρο πλάκα, απλώστε το μίγμα στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας. Το στρώμα των μικροοργανισμών που θα σχηματιστεί πρέπει να είναι λεπτό.
- Αφήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα να στεγνώσει στον αέρα.
- Παρατηρήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 6. Έμμεση χρώση

8. ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM

Η χρώση με ειδικές χρωστικές βασίζεται σε διαφορές που εμφανίζουν τα βακτηριακά κύτταρα και συνεπώς ομαδοποιούν τα βακτήρια, γεγονός που συμβάλλει στην ταυτοποίησή τους. Έτσι, η κατά Gram χρώση, που για πρώτη φορά εφαρμόστηκε από τον Δανό μικροβιολόγο H.C. Gram (1853-1938), είναι το πρώτο στάδιο που εφαρμόζεται στην ταυτοποίηση των βακτηρίων και με αυτήν τα βακτήρια χωρίζονται σε δυο μεγάλες ομάδες: κατά Gram θετικά, που χρωματίζονται ιώδη, και κατά Gram αρνητικά που χρωματίζονται ροζ. Στο πρώτο στάδιο της χρώσης αυτής τα βακτηριακά κύτταρα βάφονται με μια αλκαλική χρωστική (κρυσταλλικό ιώδες) και στη συνέχεια προστίθεται ένα στερεωτικό χρώσης (ιώδιο) το οποίο αυξάνει τη συγγένεια σύνδεσης της χρωστικής με το κύτταρο. Το επόμενο στάδιο είναι η προσθήκη ενός αποχρωματικού παράγοντα (αιθανόλη ή ακετόνη), ο οποίος οδηγεί στον αποχρωματισμό των κατά Gram βακτηρίων, όχι όμως και των κατά Gram+ βακτηρίων τα οποία διατηρούν το χρώμα της αρχικής χρωστικής (κρυσταλλικό ιώδες). Στο τελευταίο στάδιο τα κύτταρα χρωματίζονται με μια αλκαλική χρωστική (αντιχρωστική) που έχει διαφορετικό χρώμα από την πρώτη, όπως είναι η σαφρανίνη (ροζ). Έτσι, τα κατά Gram - βακτήρια χρωματίζονται ροζ από τη τελευταία χρωστική (σαφρανίνη) ενώ τα κατά Gram+ βακτήρια διατηρούν το χρώμα της αρχικής χρωστικής (ιώδες), αφού δεν έχουν αποχρωματιστεί.

Οι διαφορές στη χρώση των Gram+ και Gram- βακτηρίων οφείλεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Εάν πριν τη χρώση απομακρυνθεί το κυτταρικό τοίχωμα των Gram + βακτηρίων συμπεριφέρονται και αυτά όπως τα Gram -. Πιστεύεται ότι η προσθήκη αλκοόλης συστέλλει τους πόρους του παχέως στρώματος πεπτιδογλυκάνης που χαρακτηρίζει τα Gram+ βακτήρια, με αποτέλεσμα το σύμπλοκο ιωδίου-κρυσταλλικού ιωδίου να διατηρείται και να μην απομακρύνεται με την αλκοόλη. Αντίθετα, τα Gram- βακτήρια έχουν πολύ λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και γι' αυτό μεγαλύτερους πόρους. Η προσθήκη της αλκοόλης οδηγεί στην απομάκρυνση λιποειδών συμβάλλοντας ακόμη περισσότερο στην αύξηση του μεγέθους των πόρων. Λόγω των διαφορών αυτών η απομάκρυνση του συμπλόκου ιωδίου-κρυσταλλικού ιωδίου γίνεται εύκολα στα Gram - βακτήρια, τα οποία στη συνέχεια θα χρωματισθούν ροζ με την αντιχρωστική.

Υλικά και συσκευές

Βακτηριακές καλλιέργειες (τρυβλία με streaking)

Λύχνος Bunsen

Μικροβιολογικός κρίκος

Αντικειμενοφόρες πλάκες

Διηθητικό χαρτί

Λεκάνη χρώσης

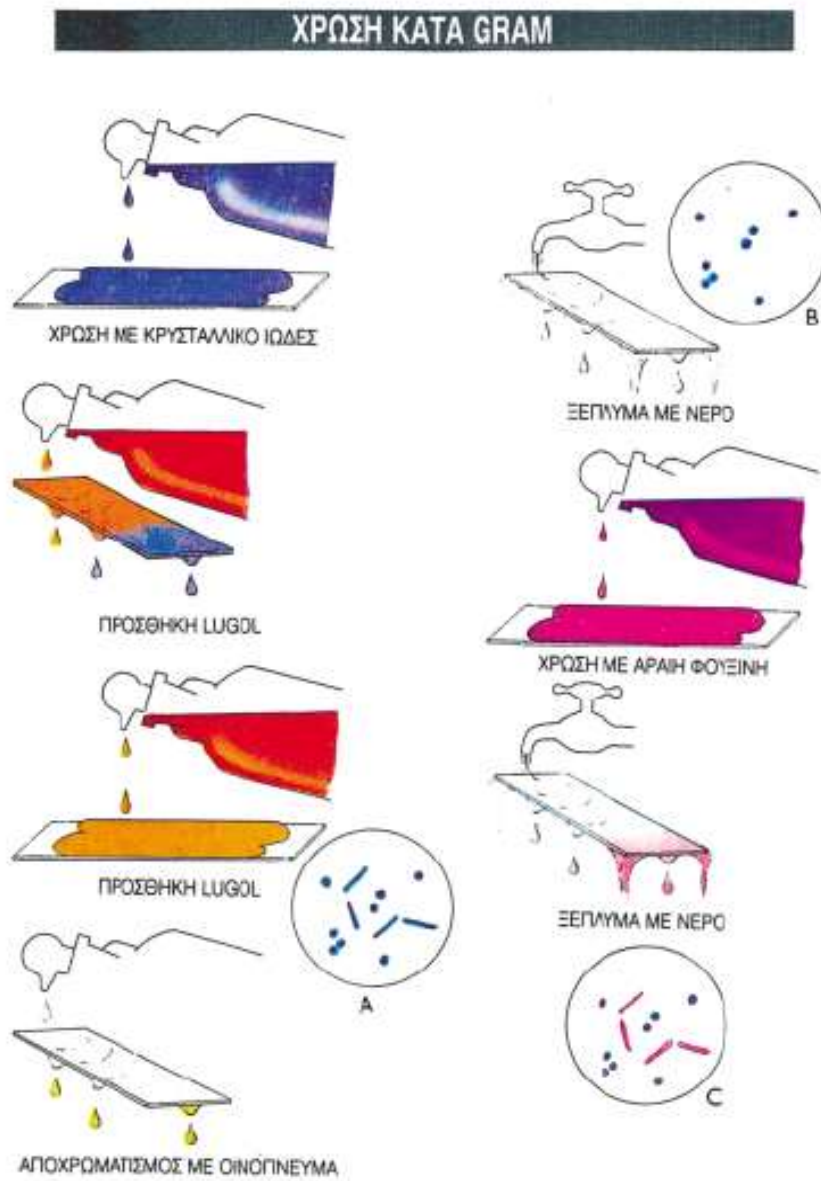
Κρυσταλλικό ιώδιο, αιθανόλη, Lugol-ιώδιο και σαφρανίνη

Μικροσκόπιο

Πειραματικό μέρος

1. Μονιμοποιήστε σε αντικειμενοφόρο πλάκα τα βακτηριακά κύτταρα.
2. Καλύψτε το στρώμα των βακτηρίων με κρυσταλλικό ιώδες για 30".
3. Καλύψτε το στρώμα των βακτηρίων με διάλυμα Lugol-ιώδιο για 30-60".
4. Αφαιρέστε το διάλυμα Lugol-ιωδίου.
 5. Καλύψτε το στρώμα των βακτηρίων με 95% αιθανόλη για 10-20" (όταν το στρώμα των κυττάρων είναι παχύ απαιτείται περισσότερος χρόνος).
6. Σταματήστε τον αποχρωματισμό με αλκοόλη, ξεπλένοντας το βακτηριακό επίχρισμα με νερό.

7. Καλύψτε το στρώμα των βακτηρίων με σαφρανίνη για 30"
8. Ξεπλύνετε με νερό και στεγνώστε την αντικειμενοφόρο με διηθητικό χαρτί.
9. Παρατηρήστε τα παρασκευάσματα στο μικροσκόπιο.

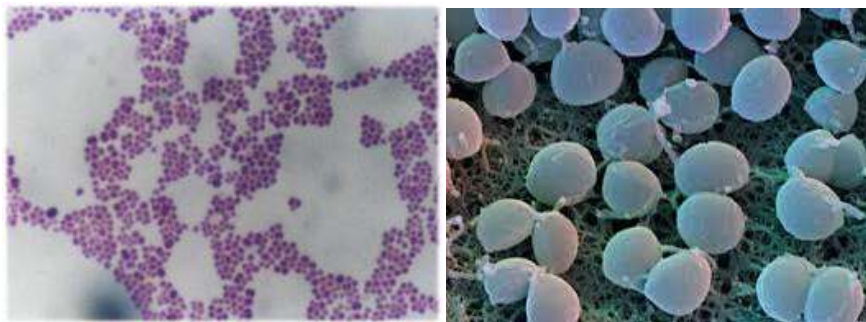


Εικόνα 7. Χρώση Gram

9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΤΟΥ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

9.1 Γενικά

Ο *Staphylococcus aureus* (Σταφυλόκοκκος ο χρυσίζων) ανήκει στο γένος *Staphylococcus*, της οικογένειας Micrococcaceae. Στο γένος *Staphylococcus* περιλαμβάνονται πολλά είδη. Ο *Staphylococcus aureus* είναι Gram θετικός κόκκος, που διατάσσεται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς, σε τετράδες άτακτα. Είναι κόκκος ακίνητος, άσπορος, αερόβιος και χωρίς έλυτρο.



Εικόνα 8. *Staphylococcus aureus* στο οπτικό (αριστερά) και στο ηλεκτρονικό (δεξιά) μικροσκόπιο

Οι σταφυλόκοκκοι είναι πολύ διαδεδομένοι στο περιβάλλον. Ως κύρια πηγή τους θεωρείται ο βλεννογόνος του ρινοφάρυγγα, τα αποστήματα και το δέρμα, γενικά, του ανθρώπου και των ζώων. 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 σταφυλοκοκκική τοξίνωση (σταφυλοκοκκίαση) οφείλεται στην κατανάλωση τροφίμων, που μέσα τους έχουν παραχθεί, από στελέχη σταφυλόκοκκων, εξωτοξίνες (εντεροτοξίνες) οι οποίες είναι απλές πρωτεΐνες. Δεν καταστρέφονται τελείως με βρασμό για 30 min, ενώ καταστρέφονται στους 120 °C για 20 μέχρι 30 min, είναι δε πολύ τοξικές. Γενικά, οι συνθήκες του τροφίμου (a_w , pH, σύσταση) ή οι επεξεργασίες του, που ελαττώνουν ή εξαφανίζουν τον υπεύθυνο για την παραγωγή τοξίνης πληθυσμό *S. aureus*, δεν επιδρούν στις εντεροτοξίνες. Γι' αυτό, δεν είναι σπάνιο να συμβεί κρούσμα σταφυλοκοκκικής τροφοτοξίνωσης, από τρόφιμο στο οποίο δεν ανιχνεύονται σταφυλόκοκκοι.

Υπάρχουν διάφοροι αντιγονικοί τύποι εντεροτοξινών, που σημειώνονται με τα γράμματα A, B, C, D κ.τ.λ. Συχνότερα συναντάται ο τύπος A, που συνδέεται κυρίως με τη σταφυλοκοκκική τοξίνωση και B, που συνδέεται, πιθανότερα, με την πρόκληση εντερίτιδας. Εκτός από αυτούς, υπάρχουν και οι τύποι C και D, που μεταξύ τους παρατηρούνται “διασταυρούμενες” αντιδράσεις.

Η μόλυνση των τροφίμων με σταφυλόκοκκους οφείλεται συνήθως στον άνθρωπο και τα ζώα. 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. Για να παραχθεί τοξίνη, σε αρκετή ποσότητα και να προκαλέσει συμπτώματα, πιστεύεται ότι ο αριθμός των σταφυλόκοκκων ανά g, πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 500.000.

Επειδή η αναζήτηση των εντεροτοξινών σ' ένα τρόφιμο είναι εργασία πολύπλοκη, δαπανηρή και απαιτεί χρόνο και ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό, ο υγειονομικός έλεγχος περιορίζεται στην αναζήτηση και αρίθμηση του *S. aureus*, και μόνο σε ειδικές περιπτώσεις (ύποπτο τρόφιμο) γίνεται διερεύνηση για την ύπαρξη εντεροτοξινών. Γενικά και στην καθημερινή πράξη, όταν δεν είναι δυνατή η αναζήτηση της εντεροτοξίνης, για να χαρακτηριστούν οι σταφυλόκοκκοι ως παθογόνοι (τοξινογόνοι), γίνεται η δοκιμή πηκτάσης (κοαγκουλάσης). Στην περίπτωση που αυτή είναι αρνητική και επειδή παρατηρείται αύξηση

του αριθμού των παθογόνων στελεχών, που δεν παράγουν πηκτάση (ίσως από τη δράση αντιβιοτικών), γίνεται η δοκιμή δεσοξυριβονουκλεάση.

Ο προσδιορισμός του *S. aureus*, στα τρόφιμα 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.

2. Για να προσδιορισθεί ο κίνδυνος πρόκλησης τροφικής δηλητηρίασης.

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*.

9.2 Μέθοδοι Προσδιορισμού του *Staphylococcus aureus*

Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται, κυρίως, για τον προσδιορισμό του *S. aureus* στα τρόφιμα: ο προσδιορισμός σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και ο προσδιορισμός σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, με τη μέθοδο MPN.

Η εκλογή της κατάλληλης μεθόδου προσδιορισμού των σταφυλόκοκκων, εξαρτάται από τον αριθμό του *S. aureus* ανά γραμμάριο τροφίμου. Αν ο αριθμός του *S. aureus* αναμένεται να είναι μεγαλύτερος του 100/g, ο προσδιορισμός γίνεται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ αν ο πληθυσμός αναμένεται να είναι μικρότερος, γίνεται με τη μέθοδο του περισσότερου πιθανού αριθμού (MPN).

Προσδιορισμός του *staphylococcus aureus* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του *S. aureus* σε νωπά ή επεξεργασμένα τρόφιμα.

Ποσότητα 0,1 ml από δύο ή περισσότερες δεκαδικές αραιώσεις του ομογενοποιημένου δείγματος που εξετάζεται εμβολιάζονται με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία, που φέρουν στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα.

Για τον προσδιορισμό του σταφυλόκοκκου χρησιμοποιούνται δυο υποστρώματα: το Baird - Parker Egg Yolk Agar και το Charman. Στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Charman άγαρ (περιέχει 7,5% NaCl) δίνει αποικίες μικρές, συμπαγείς και φουσκωτές, κίτρινες λόγω της ζύμωσης της μαννιτόλης. Εμφανίζει χρυσίζουσα χρωστική στο στερεό αυτό θρεπτικό υλικό, η οποία γίνεται εντονότερη, όταν το 24ωρο καλλιέργημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου. Το θρεπτικό όμως υπόστρωμα που συνήθως χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του *S. aureus* είναι το Baird - Parker Egg Yolk Agar

Baird - Parker Agar Base

Peptone	10,0 g/l
Meat Extract	5,0 g/l
Yeast Extract	1,0 g/l
Lithium Chloride	5,0 g/l
Glycine	12,0 g/l
Sodium Pyruvate	10,0 g/l
Agar	15,0 g/l
Distilled Water	1000,0 mL

pH 6.8 +/- 0,2

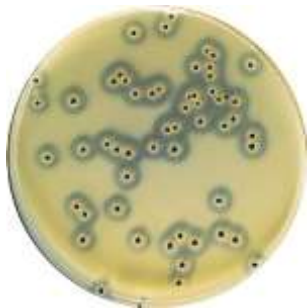
Αποστείρωση στους 121 °C. για 15 min.

Το υπόστρωμα αυτό ψύχεται, μετά την αποστείρωσή του, στους 45 - 50⁰ C και προστίθενται, με ασηπτικό τρόπο, 50 ml Egg-Yolk Tellurite Emulsion. Αναμειγνύεται καλά και διανέμεται σε τρυβλία. Στην εργαστηριακή πράξη μπορούμε εναλλακτικά να χρησιμοποιήσουμε 50 ml εναιωρήματος κρόκου αυγού 1:3 περίπου (ενσωματώνουμε τον κρόκο ενός αυγού σε 100 ml απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού) και 10 ml διαλύματος 1% Τελλουριώδους Καλίου (K₂TeO₃), που αποστειρώνεται με διήθηση. Τα δύο αυτά υλικά προστίθενται με ασηπτικό τρόπο στο βασικό υπόστρωμα, το οποίο αναμειγνύεται καλά και διανέμεται σε τρυβλία. Το Τελλουριώδες Κάλιο (K₂TeO₃) προστίθεται ως εκλεκτικός παράγοντας, χρωματίζοντας τις αποικίες του *S. aureus* μαύρες. Επίσης, ο κρόκος αυγού προστίθεται με τη μορφή εναιωρήματος, ώστε να έχουμε διάσταση της λεκιθίνης του κρόκου του αυγού (δοκιμή λεκιθινάσης).

Στη συνέχεια τα τρυβλία ξηραίνονται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C για 30 min. Εμβολιάζονται με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης, με τη βοήθεια ειδικής κεκαμμένης, γυάλινης ράβδου (hokey stick) και επωάζονται στους 37 °C. για 24 - 48h.

Ο *S. aureus* σχηματίζει μαύρες γυαλιστερές αποικίες διαμέτρου 1-5 mm, που περιβάλλονται από διαυγή ζώνη (άλω) πλάτους 2 - 5 mm. Τα άλλα είδη σταφυλόκοκκων σχηματίζουν μαύρες αποικίες, που περιβάλλονται, μερικές φορές, από μικρή διαυγή ζώνη.

Οι μικρόκοκκοι σχηματίζουν πολύ μικρές, καφέ - γκρι έως μαύρες αποικίες.



Εικόνα 9. Χαρακτηριστικές αποικίες *S. aureus* σε Baird Parker agar + egg yolk tellurite.

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.



Εικόνα 10. Latex test για επιβεβαίωση αποικιών *S. aureus*.

9.3 Βιοχημικές δοκιμές

Ο *S. aureus* παράγει:

- ο 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.
- ο 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).
- ο Μια θερμοανθεκτική δεσοξυριβονουκλεάση (Dnase). Η ιδιότητα αυτή είναι χαρακτηριστική του *S. aureus*, όπως και η παραγωγή κοαγκουλάσης.
- ο Διασπά τη γλυκόζη και τη μαννιτόλη κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Πίνακας 1: Βιοχημικές ιδιότητες του *S. aureus*

	Παραγωγή καταλάσης	Παραγωγή κοαγκουλάσης	Παραγωγή Dnase	Διάσπαση Γλυκόζης	Διάσπαση Μαννιτόλης
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+

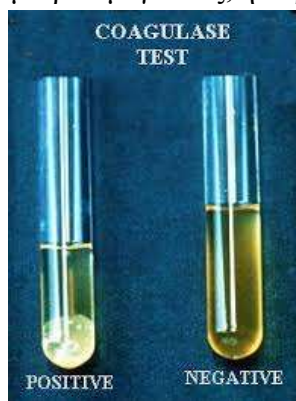
Δοκιμή πηκτάσης ή κοαγκουλάσης

Οι αποικίες που έχουν τα χαρακτηριστικά του *S. aureus* μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 0,3 ml Brain Heart Infusion και αναμειγνύονται καλά. Επωάζονται στους 35 – 37 °C: για 18 - 24h.

Προστίθενται 0.5 ml πλάσμα αίματος (Coagulase Plasma) στις καλλιέργειες που έχουν επωαστεί και αναμειγνύονται καλά. Ακολουθεί επώαση στους 35 – 37 °C για 6h.

Σε περίπτωση σχηματισμού πηγματος (όπως φαίνεται στο σχήμα) η δοκιμή θεωρείται θετική.

Αν σχηματισθεί πήγμα μικρού μεγέθους, η παρουσία του *S. aureus* επιβεβαιώνεται και με άλλες δοκιμές.



Εικόνα 11. Αποτελέσματα της δοκιμής κοαγκουλάσης (Θετικό-αριστερά, Αρνητικό-δεξιά)

Σημείωση:

Εναλλακτικά, αντί για ανοσολογικές ή βιοχημικές δοκιμές για την επιβεβαίωση ύποπτων αποικιών μπορεί ο *S. aureus* να καλλιεργηθεί σε Baird-Parker agar στο οποίο αντί για egg yolk tellurite προστίθεται Rabbit plasma fibrinogen (RPF supplement), στο οποίο ο προστιθέμενος ορός αίματος οδηγεί στη δημιουργία αποικιών με χαρακτηριστική διάφανη ζώνη, που είναι αποτέλεσμα της δράσης της κοαγκουλάσης (η οποία προκαλεί πήξη του ορού γύρω από τις αποικίες). Η ανάπτυξη σε αυτό το υπόστρωμα δεν απαιτεί επιβεβαιωτικές δοκιμές και προτιμάται σε πολλές περιπτώσεις λόγω της οικονομίας χρόνου.



Εικόνα 12. Χαρακτηριστικές αποικίες *S. aureus* σε Baird Parker agar + RPF supplement.

9.4 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. Στο αιματούχο άγαρ παράγει αποικίες λευκές, κυκλικές, με διαφορετικού βαθμού αιμόλυση. Μερικά στελέχη παράγουν μια βλενώδη ουσία (slime) και κάνουν γλοιώδεις αποικίες. Αναπτύσσεται, όπως και ο *S. aureus* στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Charman, αλλά οι αποικίες του είναι λευκές και όχι κίτρινες, επειδή δε διασπά τη μαννιτόλη.

Παράγει το ένζυμο καταλάση, όπως και οι άλλοι Σταφυλόκοκκοι. 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 βλενώδεις ουσίες που παράγει τον προστατεύουν από τη δράση των αντιβιοτικών.

10. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΕΡΟΥ

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.

A. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ-ΚΡΙΤΗΡΙΑ

A1. Ως μικροβιολογικοί δείκτες ποιότητας του νερού χρησιμοποιούνται :

- Τα ολικά και τα θερμοάντοχα κολοβακτηριοειδή (coliforms)
- Η *Escherichia coli* (η οποία είναι παθογόνος και έχει ως φυσικό βιότοπο τα κόπρανα)
- Ο συνολικός πληθυσμός *Enterococcus* κοπρανώδους προέλευσης (*E. faecalis*, *E. faecium*)
- Η ολική αερόβια χλωρίδα στους 37°C και στους 22°C
- Το ψυχρόφιλο, παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*
- Το αναερόβιο, σπορογόνο και παθογόνο βακτήριο *Clostridium perfringens* (ανθεκτικό σε θερμικές και χημικές επεξεργασίες όπως η χλωρίωση)
- Η παρουσία βακτηριοφάγων ιών

Γενικά χαρακτηριστικά κολοβακτηριδίων :

- Οικογένεια *Enterobacteriaceae*, Gram- βακτήρια εντερικής προέλευσης (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*)
- Gram- , μη σπορογόνοι βάκιλλοι, αναπτύσσονται παρουσία αλάτων χολής, οξειδάση αρνητικοί.
- Πολλαπλασιάζονται στους 37°C ζυμώνοντας την λακτόζη (παραγωγή β-γαλακτοξειδάσης) με παραγωγή αερίου σε 24-48h. Επιπλέον, η *E. coli* παράγει και β-γλουκουρονιδάση.
- Χρησιμοποιούνται σαν δείκτης αποτελεσματικότητας των επεξεργασιών και σαν δείκτης περιβαλλοντικής ρύπανσης από 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%).

Γενικά χαρακτηριστικά Εντεροκόκκων

- Οικογένεια *Streptococcaceae*, θερμοάντοχοι Gram+ κόκκοι εντερικής προέλευσης
- Έχουν αντοχή στο NaCl και στο αλκαλικό και όξινο pH, 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

Γενικά χαρακτηριστικά ολικής αερόβιας χλωρίδας

- Δεν έχει σχέση με την προέλευση της ρύπανσης. Σχετίζεται με την διαπίστωση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης (πόσιμα νερά), και της διαδικασίας εμφιάλωσης (εμφιαλωμένα νερά).
- Δεν ενδιαφέρει τόσο η συγκέντρωσή τους (δεν υπάρχει όριο στη νομοθεσία του πόσιμου νερού) αλλά η σταθερότητα της συγκέντρωσης.
- Σε ορισμένες περιπτώσεις μετράμε μόνο τα σπορογόνα μετά από θέρμανση στους 60-70°C

Γενικά χαρακτηριστικά *P. aeruginosa*

- Gram- , οξειδάση θετικός, μη σπορογόνος βάκιλλος
- Μεγάλη εξάπλωση στο περιβάλλον (νερό, έδαφος, λύματα) όπου πολλαπλασιάζονται παρουσία λίγων οργανικών ουσιών (ολιγοτροφικά). Δεν αποτελούν δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης.
- Στο νερό αλλοιώνουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες
- Είναι **δυσήκτα 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 δείκτες παρουσίας πρωτοζώων και ειδικά του εντεροπαθογόνου *Cryptosporidium parvum*

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.

A2. Μικροβιολογικά Κριτήρια Νομοθεσίας

1. Πόσιμο νερό δικτύου ύδρευσης

- Ιοί που χρησιμοποιούν κύτταρα βακτηρίων ως ξενιστές. Πολλοί από αυτούς προέρχονται από αστικά/βιομηχανικά λύματα.
- Ολικά κολοβακτηριοειδή/100ml : απουσία
- *E.coli*/ 100 ml : απουσία
- Εντερόκοκκοι/ 100 ml : απουσία
- *Clostridium perfringens* /100ml απουσία
- Ολική ψυχρόφιλη (22°C/48h) χλωρίδα : όχι ασυνήθιστη μεταβολή

2. Εμφιαλωμένα (επιτραπέζια) νερά

- *E.coli*/ 250 ml : απουσία
- εντερόκοκκοι/ 250 ml : απουσία

- *Clostridium perfringens* /100ml απουσία
- *Pseudomonas aeruginosa*/250 ml: απουσία
- Ολική ψυχρόφιλη (22°C/48h) χλωρίδα :100cfus/ml.
- Ολική μεσόφιλη (37°C/48h) χλωρίδα (ενδεικτικό όριο): 20cfus/ml.

3. Θαλάσσια νερά

- Το 95% των δειγμάτων σε μια περιοχή δεν πρέπει να υπερβαίνει τα κάτωθι όρια:
- Ολικά κολοβακτηριοειδή/100 ml: 10.000
- Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή/ 100ml: 500
- Σαλμονέλλα /λίτρο: απουσία

4. Κολυμβητικές Δεξαμενές

- Ολική μεσόφιλη (37°C/24h) χλωρίδα : 200cfus/ml.
- Ολικά κολοβακτηριοειδή/100 ml: 15
- Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή/ 100ml: απουσία

B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1. Μέθοδος ενσωμάτωσης 1ml ή επίστρωσης 0,1ml σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (όταν τα κριτήρια αφορούν ποσότητα 1ml δείγματος νερού). Μέτρηση έως και 300 αποικιών (ενσωμάτωση) ή 200 αποικιών (επίστρωση) ανά τρυβλίο.

2. Μέθοδος μεμβρανών: διήθηση υπό κενό 100 ή 250, ή 500ml δείγματος νερού μέσω αποστειρωμένων μεμβρανών με πορώδες 0,45μm, οι οποίες κατακρατούν τα μικροβιακά κύτταρα. Οι μεμβράνες επιστρώνονται αντεστραμμένες σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Μέτρηση έως 200 αποικιών ανά τρυβλίο.

2.1. Μέθοδος μεμβρανών για E. coli : διήθηση 100/250/500ml νερού, σε προ-αποστειρωμένο γυάλινο ή μεταλλικό δοχείο, τοποθέτηση μεμβράνης σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Lactose TTC με sodium heptadecylsulfate (Tergitol), επώαση στους 37°C για 24h (coliforms). Για καταμέτρηση χωριστά της E. coli, κάνουμε επώαση στους 44°C και επιβεβαίωση με τεστ ινδόλης. Η καταμέτρηση κολοβακτηριδίων μπορεί να γίνει επίσης σε MacConkey agar στους 37°C για 24h. Εναλλακτικά, επώαση στο χρωμογόνο υπόστρωμα Rose Gal-BCIG agar στους 37°C για 24h. Η E. coli εμφανίζει μωβ αποικίες, ενώ τα κολοβακτηρίδια εμφανίζονται ροζ.

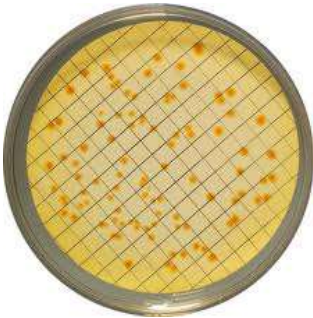
2.2. Μέθοδος μεμβρανών για Enterococcus: διήθηση 100/250/500ml νερού, σε προ-αποστειρωμένο γυάλινο ή μεταλλικό δοχείο, τοποθέτηση μεμβράνης σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz & Bartley agar, επώαση στους 37°C για 48h. Εμφάνιση αποικιών: σκούρες κόκκινες. Τελική επιβεβαίωση αποικιών σε Bile Aesculine Azide agar όπου οι αποικίες εμφανίζονται σκούρες καφέ με μαύρη ζώνη.

2.3. Μέθοδος μεμβρανών για P. aeruginosa: διήθηση 100/250/500ml νερού, σε προ-αποστειρωμένο γυάλινο ή μεταλλικό δοχείο, τοποθέτηση μεμβράνης σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Pseudomonas agar base με CN supplement (cetrimide) και επώαση στους 35°C για 48 h. Εμφάνιση μπλε-πράσινων αποικιών που φθορίζουν στο υπεριώδες φως. Εναλλακτικά, επώαση σε Cetrimide agar στους 30-35°C για 48 h και εμφάνιση πράσινων αποικιών που φθορίζουν. Για επιβεβαίωση, ανακαλλιέργεια σε Tryptone Soy agar και επιβεβαιωτικές δοκιμές οξειδάσης (θετική), φθορισμού σε King's medium παραγωγής αμμωνίας από acetamide broth μετά από προσθήκη αντιδραστηρίου Nessler (αλλαγή χρώματος σε κίτρινο έως καφεκόκκινο).

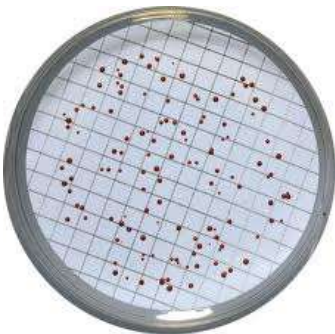
2.4. Μέθοδος μεμβρών για *C. perfringens*: Επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone-Sulfite Cycloserine agar (TSC) και επώαση υπό αναερόβιες συνθήκες στους 44 °C για 24 και 48h. Η εκλεκτικότητα βελτιώνεται αν προστεθεί ένα λεπτό στρώμα βασικού υλικού (χωρίς cycloserine) πάνω από την μεμβράνη. Καταμέτρηση των γκρι-μαύρων αποικιών. Επιβεβαίωση θετικών αποικιών με τεστ κινητικότητας σε δοκιμαστικό σωλήνα με στερεό υπόστρωμα (θετικό), τεστ αναγωγής νιτρικών σε νιτρώδη (θετικό), τεστ υδρόλυσης λακτόζης και ζελατίνης (θετικό).



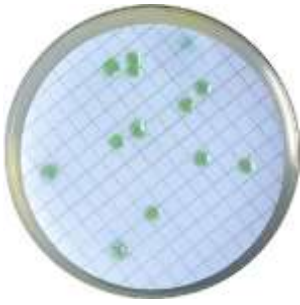
Εικόνα 13. Συστοιχία διήθησης υπό κενό για μικροβιολογική ανάλυση νερού



Εικόνα 14. Coliforms σε Tergitol agar +TTC supplement



Εικόνα 15. Enterococcus σε Slanetz & Bartley agar



Εικόνα 16. *Pseudomonas aeruginosa* σε Cetrimide (CN) agar

11. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

Τεχνική επιγρίσματος (Swab test – τεχνική του βαμβακοφορέα)

Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε συγκεκριμένη επιφάνεια.

Απαιτούμενος εξοπλισμός

Για τη δειγματοληψία κάθε σημείου που θα επιλεγεί απαιτούνται ένα αποστειρωμένο βύσμα, 10 ml αραιωτικού υγρού και ένας μαρκαδόρος.

1. Αποστειρωμένο βύσμα
2. Δοκιμαστικός σωλήνας με πόμα
3. Μαρκαδόρος
4. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
5. Θρεπτικό υλικό Plate Count Agar
6. Διάλυμα NaCl - Peptone
7. Τρυβλία μίας χρήσεως
8. Σιφόνια, πιπέτες
9. Αποστειρωμένο ψαλίδι

Προετοιμασία

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 10 ml διαλύματος NaCl – Peptone (Peptone Water). Οι σωλήνες πωματίζονται και αποστειρώνονται. Αφήνονται να κρυώσουν και τοποθετούνται στο ψυγείο έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Εκτέλεση

⇒ Για στεγνή επιφάνεια:

Αφού ανοιχτεί η συσκευασία του βύσματος, το βύσμα εξέρχεται και εισέρχεται στο σωληνάκι με το αραιωτικό υγρό ώστε να εμποτισθεί το βαμβάκι. Στη συνέχεια, στραγγίζεται με πίεση στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα και σαρώνεται μία επιφάνεια διαστάσεων 10 cm x 10 cm (εμβαδό 100 cm²) δέκα φορές από πάνω προς τα κάτω εφαρμόζοντας σταθερή πίεση. Στη συνέχεια το βύσμα κόβεται με αποστειρωμένο ψαλίδι και μεταφέρεται μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα με το αραιωτικό υγρό.

⇒ Για υγρή επιφάνεια χρησιμοποιείται στεγνό βύσμα και ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία.

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων πρέπει να αρχίσει εντός 24 ωρών από τη δειγματοληψία και τα δείγματα στο μεσοδιάστημα να διατηρηθούν υπό ψύξη (0-4°C).

Ο δοκιμαστικός σωλήνας ανακινείται καλά για να σχηματισθεί εναιώρημα μικροοργανισμών, το οποίο εξετάζεται για Ολική μικροβιακή χλωρίδα. Δημιουργούνται δεκαδικές αραιώσεις, ανάλογα με

τον αριθμό των μικροοργανισμών που αναμένουμε να έχει η επιφάνεια. Εμβολιάζεται ποσότητα 1 ml από κάθε αραιώση στο τρυβλίο και ακολουθεί η έγχυση του θρεπτικού υλικού Plate Count Agar. Τα τρυβλία που έχουν εμβολιαστεί επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά cm^2 εμβαδού επιφανείας (cfu/cm^2).

Υπολογισμός αποτελέσματος: Αν μετρήθηκαν 40 αποικίες σε 1ml από τα 10ml του αραιωτικού υγρού, τότε $\text{cfu}=40 \times 10=400/100 \text{ cm}^2$, ή $\text{cfu}=4/\text{cm}^2$



Εικόνα 17. Βαμβακοφόροι στείλεοί (swabs) για λήψη επιχρίσματος από επιφάνειες

Λήψη επιχρίσματος από επιφάνειες σφάγιων

Για επιφάνειες σφάγιων αντί του βαμβακοφόρου στείλεού χρησιμοποιούνται αποστειρωμένοι σπόγγοι, οι οποίοι εμβαπτίζονται σε 100ml αποστειρωμένου αραιωτικού υγρού (ή προεμπλουτιστικού υγρού στην περίπτωση ανίχνευσης Salmonella) προτού γίνει η λήψη επιχρίσματος από μια συγκεκριμένη επιφάνεια (συνήθως 100cm^2 ή μεγαλύτερη). Στη συνέχεια γίνονται εφόσον χρειάζεται οι απαραίτητες δεκαδικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αραιωτικό υγρό, και ο εμβολιασμός και επώαση των τρυβλίων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cfu/cm^2 , όπως περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 18. Αποστειρωμένος σπόγγος για λήψη επιχρίσματος από επιφάνεια σφάγιου

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που γίνονται στα σφάγια με αυτή την μέθοδο είναι :

- Μέτρηση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε Plate Count Agar
- Μέτρηση Ολικών Εντεροβακτηριδίων (Enterobacteriaceae) σε Violet Red Bile Glucose Agar
- Ανίχνευση Salmonella σε εκλεκτικά υποστρώματα, μετά από προεμπλουτισμό και εμπλουτισμό του δείγματος.

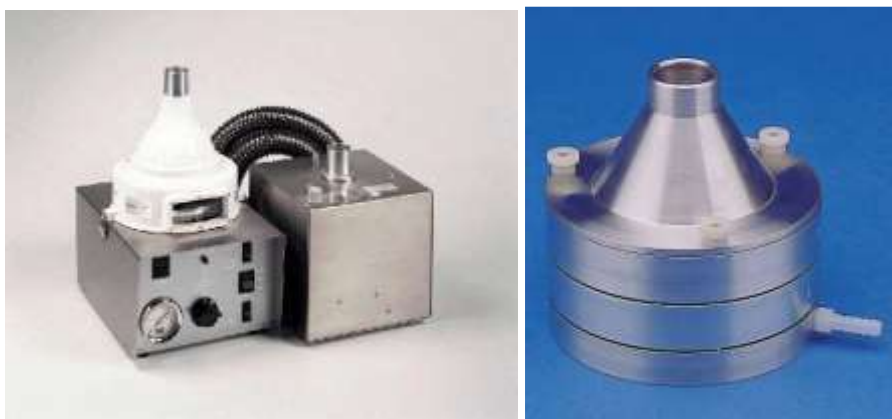
12. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΕΡΑ ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

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

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. Με τον τρόπο αυτό κάποιοι μικροοργανισμοί του αέρα επικάθονται στην επιφάνεια του υλικού. 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 τεχνική απλή και ποιοτική, όχι ποσοτική.

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/ltr αέρα.

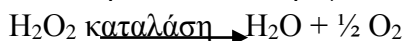


Εικόνα 19. Συσκευή κενού για μέτρηση μικροχλωρίδας του αέρα (αριστερά). Το τρυβλίο τοποθετείται στο εσωτερικό της συσκευής (δεξιά)

13. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΤΕΣΤ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ-ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ-ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ

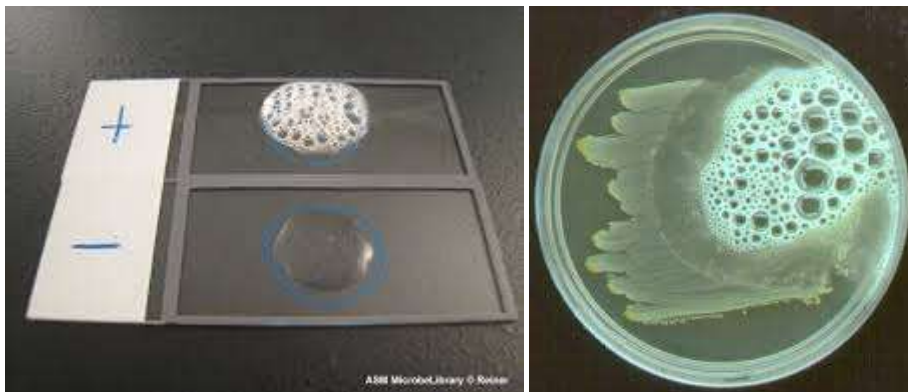
Τα βιοχημικά τεστ χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών και την ταξινόμησή του γένη-είδη-υποείδη. Πολλά από τα βιοχημικά τεστ αφορούν την παρουσία/απουσία συγκεκριμένων ενζύμων στο κύτταρων των μικροοργανισμών που διερευνώνται, όπως η καταλάση, η οξειδάση και η αμινοπεπτιδάση.

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 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 (βλ. Εικόνα 20).

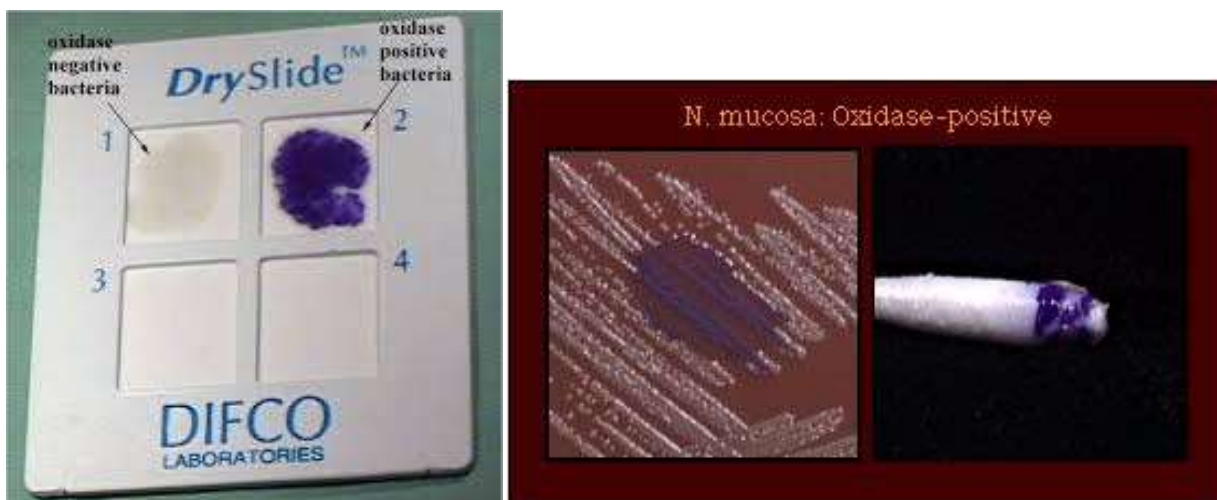


Εικόνα 20. Θετικό και αρνητικό τεστ καταλάσης. Ο αφρισμός συνεπάγεται παραγωγή καταλάσης.

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 (βλ. Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Αρνητικό (αριστερά, θέση 1) και θετικό (αριστερά, θέση 2) τεστ καταλάσης με διαφορετικά βακτήρια. Δεξιά φαίνεται το τεστ οξειδάσης σε καλλιέργεια *Neisseria mucosa*.

Το τεστ αμινοπεπτιδάσης είναι ένα τεστ που αφορά την ανίχνευση αμινοπεπτιδάσης της L-αλανίνης που διασπά την L-αλανίνη από διάφορα πεπτίδια, και η οποία εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα κύτταρα των Gram αρνητικών βακτηρίων. Συνεπώς το τεστ αμινοπεπτιδάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί για τη Χρώση Gram για την κατάταξη των βακτηρίων σε Gram θετικά και Gram αρνητικά (χωρίς ωστόσο να μας δίνει στοιχεία μορφολογίας του κυττάρου όπως η Χρώση Gram), με εξαίρεση τα γένη κυρίως *Campylobacter* και *Bacteroides* που μας δίνουν αρνητική αντίδραση αν και είναι Gram αρνητικά.

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 (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Θετικό (αριστερά) και αρνητικό (δεξιά) τεστ αμινοπεπτιδάσης.

14. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ IN VITRO (ΜΕΘΟΔΟΣ MIC-MBC, ΜΕΤΡΗΣΗ ΖΩΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ)

Σε πολλές περιπτώσεις μελέτης ή ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών ή αντιμικροβιακών γενικά ουσιών (όπως τα συντηρητικά των τροφίμων) ή για τη μελέτη της επίδρασης φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών στους μικροοργανισμούς (όπως τα αιθέρια έλαια, οι φαινολικές ουσίες, οι βακτηριοσίνες, κλπ) υπάρχει η ανάγκη συγκριτικής μελέτης της δράσης των ουσιών αυτών για να διακριβωθεί ποια ουσία έχει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση ή σε ποια συγκέντρωση έχουμε επαρκή αντιμικροβιακή δράση, ή ποια είναι ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για την αντιμικροβιακή δράση.

Η αντιμικροβιακή δράση των παραπάνω ουσιών διακρίνεται σε αυτή που προκαλεί:

A) Αναστολή ανάπτυξης των μικροοργανισμών (βακτηριοστατική, μυκοστατική, ή γενικώς μικροβιοστατική δράση), δηλαδή σταματάει την περαιτέρω αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών χωρίς να προκαλεί ουσιαστική μείωση στον πληθυσμό τους. Αυτό μπορεί να συμβεί π.χ. λόγω αναστολής της δράσης σημαντικών ενζύμων του μεταβολισμού

B) Καταστροφή (θανάτωση) των μικροοργανισμών (βακτηριοκτόνος, μυκητοκτόνος, η γενικώς μικροβιοκτόνος δράση), δηλαδή προκαλείται δραστική μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών, π.χ. λόγω διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης ή καταστροφής του γενετικού υλικού.

Κάποιες ουσίες προκαλούν μόνο αναστολή και κάποιες απευθείας καταστροφή των κυττάρων, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η αντιμικροβιακή δράση ξεκινάει με αναστολή σε χαμηλές συγκεντρώσεις και εξελίσσεται σε θανάτωση σε υψηλές συγκεντρώσεις. Για αυτό το λόγω πολλές φορές χρειάζεται να γνωρίζουμε την Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC-Minimum Inhibitory Concentration) και την MLC (Minimum Lethal Concentration) ή MBC αν πρόκειται για βακτήρια (Minimum Bacteriocidal Concentration).

Μέτρηση Ζωνών Αναστολής

Για τη συγκριτική μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης (με αναστολή ανάπτυξης) διαφορετικών ουσιών ταυτόχρονα χρησιμοποιούμε συνήθως τη μέθοδο της μέτρησης των ζωνών αναστολής, η οποία μας δίνει ποιοτικό αλλά και ποσοτικό αποτέλεσμα, σε ότι αφορά την ουσία με τη μεγαλύτερη αναστολή. Η μέθοδος έχει ως εξής:

Σε τρυβλία με κατάλληλο πλούσιο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα κοινής χρήσης (π.χ. Nutrient agar, Columbia agar, κλπ), ή ορισμένες φορές και εκλεκτικό υπόστρωμα για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (π.χ. Campylobacter selective agar για Campylobacter) επιστρώνουμε ή ενσωματώνουμε 0,1ml εναιωρήματος καθαρής καλλιέργειας από τον μικροοργανισμό-στόχο και έπειτα ανοίγουμε μία τρύπα («πηγαδάκι» ή «βοθρίο») διαμέτρου ~0,5cm στο κέντρο του στερεοποιημένου υποστρώματος όπου τοποθετούμε την αντιμικροβιακή ουσία (ποσότητα ~20μl) που θέλουμε να μελετήσουμε (αν χρειαστεί κάνουμε διαφορετικές αραιώσεις αυτής της ουσίας). Επωάζουμε σε συνθήκες θερμοκρασίας-χρόνου κατάλληλες για τον μικροοργανισμό-στόχο και στη συνέχεια μετράμε στα τρυβλία τις λεγόμενες ζώνες αναστολής (εάν υπάρχουν), δηλαδή τα mm της διάμετρου της ζώνης πέρα από το άκρο του πηγαδιού (βοθρίου) στην οποία δεν παρατηρείται εξάπλωση των αποικιών του μικροοργανισμού. Αυτή η μέθοδος ονομάζεται Well-Diffusion Assay, καθώς έχει να κάνει με την διάχυση της αντιμικροβιακής ουσίας από το βοθρίο στο κέντρο του τρυβλίου προς το υπόλοιπο υπόστρωμα (Εικ. 22α). Εναλλακτική μέθοδος είναι το Paper Diffusion Assay όπου χωρίς να ανοίξουμε

τρύπα στο υπόστρωμα αντί για πηγαδάκια προστίθενται στο κέντρο του τρυβλίου αποστειρωμένα χαρτάκια σε σχήμα κύκλου (διαμέτρου ίσης με τα θοθρία) τα οποία έχουν εμποτιστεί με τη αντιμικροβιακή ουσία προς μελέτη. Στην Ιατρική Μικροβιολογία αυτή η δεύτερη τεχνική χρησιμοποιείται συχνά για να γίνει το λεγόμενο αντιβιογράμμα για την επιλογή του αποτελεσματικότερου αντιβιοτικού, ανάλογα με τον μικροοργανισμό-στόχο (Εικ. 22β).



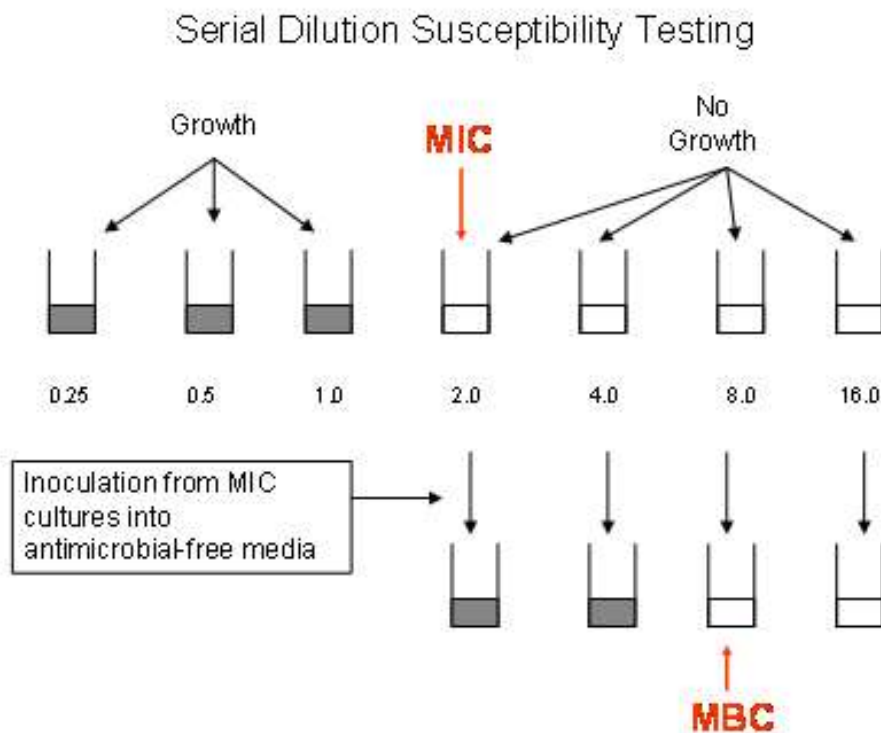
Εικόνα 22. (α) διαφορετικές ζώνες αναστολής μετά από προσθήκη διαφορετικών αντιμικροβιακών ουσιών με τη μέθοδο των πηγαδιών (well diffusion assay), (β) αντιβιογράμμα για τη μελέτη αντιβιοτικής δράσης έναντι της ζύμης *Candida albicans* με τη μέθοδο του εμποτισμένου χαρτιού (paper diffusion assay).

Μέτρηση της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC) και Ελάχιστης Θανατηφόρου Συγκέντρωσης (MLC)

Κατά τη μέθοδο αυτή ενσωματώνουμε την αντιμικροβιακή ουσία προς μελέτη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης (π.χ. Tryptone Soya Broth, Nutrient Broth, κλπ), σε διαδοχικές αύξουσες συγκεντρώσεις μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν συγκεκριμένο όγκο υποστρώματος (π.χ. 10ml). Στη συνέχεια εμβολιάζουμε μία μικρή ποσότητα εμβολίου (π.χ. 0,1ml εναιώρημα κυττάρων) από τον μικροοργανισμό-στόχο και επωάζουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε κατάλληλη θερμοκρασία και χρόνο ανάλογα με τον μικροοργανισμό. Κάνουμε επιπλέον και έναν μάρτυρα με το ίδιο εμβόλιο αλλά χωρίς την αντιμικροβιακή ουσία, για να βεβαιωθούμε ότι υπάρχει ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο συγκεκριμένο υπόστρωμα όταν απουσιάζει η αντιμικροβιακή ουσία.

Έστω ότι έχουμε προσθέσει την αντιμικροβιακή ουσία σε διαδοχικές συγκεντρώσεις 0 (μάρτυρας), 0,5, 1, 2, 3, 5 g/l. Αν για παράδειγμα μετά την επώαση παρατηρήσουμε ανάπτυξη του μικροοργανισμού υπό τη μορφή ιζήματος/θολώματος (για βακτήρια/ζύμες) ή επιφανειακή ανάπτυξη μυκηλίου (για μύκητες) στις συγκεντρώσεις 0, 0,5, 1 g/l αλλά δεν υπάρχει ανάπτυξη στις επόμενες συγκεντρώσεις τότε η MIC=2g/l (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση). Για να βρούμε την ελάχιστη θανατηφόρο συγκέντρωση ανακαλλιεργούμε μια μικρή ποσότητα εμβολίου από τους σωλήνες όπου παρατηρήσαμε αναστολή (δηλ. από τους σωλήνες που είχαν 2, 3 και 5g/l) σε αντίστοιχους νέους σωλήνες με φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιέχει την αντιμικροβιακή ουσία, ή σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς την αντιμικροβιακή ουσία. Για να δούμε αν το εμβόλιο ήταν ζωντανό, επωάζουμε αυτή τη δεύτερη σειρά σωλήνων ή τρυβλίων και η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούμε ανάπτυξη είναι η ελάχιστη θανατηφόρος συγκέντρωση. Π.χ. αν μετά την ανακαλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς την ανασταλτική ουσία παρατηρήσουμε ανάπτυξη από το εμβόλιο που προήλθε από τον αρχικό σωλήνα με συγκέντρωση

3g/l, αλλά δεν παρατηρήσουμε ανάπτυξη για τις συγκεντρώσεις 3 και 5g/l, τότε η MLC=3 g/l. Η μέθοδος περιγράφεται συνοπτικά στην Εικόνα 23.



Εικόνα 23. Σχηματική περιγραφή της μεθόδου MIC/MBC. Το σκούρο χρώμα στους σωλήνες σημαίνει μικροβιακή ανάπτυξη, το λευκό σημαίνει αδυναμία ανάπτυξης. Στο παραπάνω παράδειγμα η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση-MIC (πρώτη σειρά σωλήνων με αντιμικροβιακή ουσία) είναι η συγκέντρωση 2 (π.χ. g/l), ενώ η Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση-MBC (δεύτερη σειρά σωλήνων χωρίς την αντιμικροβιακή ουσία) είναι η 8 (π.χ. g/l).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bell, C., Neaves, P., and Williams A. P., (2005). “Food microbiology and laboratory practice”. Blackwell Science, London.

Blodgett, R. J. (2005). “Serial dilution with a confirmation step”. *Food Microbiology* 22: 547-552.

Cappucino J. and Sherman N. (1999). *Microbiology – A laboratory manual*. Benjamin/Cummings Science Publishing, California.

Garthright, W. E., and Blodgett, R. J. (2003). “FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet”. *Food Microbiology* 20: 439-445.

Harley J. P. and Prescott L.M. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition. The McGraw–Hill Co.

McLandsborough, L., (2005). “Food microbiology laboratory”, CRC Press, London

Peeler, J. T., G. A. Houghtby, and A. P. Rainosek. (1992). “The most probable number technique”, in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd Ed., Vanderzant, C. and Spittsoesser, D. F., Eds., American Public Health Association, Washington, D. C.

Swanson, K. M. J., Busta, F. F., Peterson, E. H., and Johnson, M.G., (1992). “Colony count methods”, in *Compendium for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd ed. Vanderzant, C. and Spittsoesser, D. F., Eds., American Public Health Association, Washington, D. C.

Απόφαση 2001/471/ΕΚ της Επιτροπής των Ε.Κ. – Κανόνες για τη διεξαγωγή τακτικών ελέγχων γενικής υγιεινής στις εγκαταστάσεις κρέατος.

Δελιγκάρης, Ν., (1992). “Μικροβιολογικός Έλεγχος των τροφίμων”. ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Καραγκούνη-Κύρτσου Α. 2012. *Γενική Μικροβιολογία*, Εκδόσεις Σταμούλη.

Κολιαής, Σ., και Σιβροπούλου, Α., (2001). “Ασκήσεις Μικροβιολογίας”. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Νυχάς Γ., “Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων”, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Παπαντωνίου Δ. (1995). *Εργαστηριακές ασκήσεις μικροβιολογίας και υγιεινής τροφίμων*. ΑΤΕΙΘ, Θεσσαλονίκη.

Σπηλιώτης Β., Γιαβάσης Ι. 2010. *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Επιμέλεια μετάφρασης και έκδοσης στα ελληνικά του βιβλίου “Food Microbiology-An Introduction”, Thomas Montville and Karl Matthews (ASM Press, Washington D.C., 2005), εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα.

Χίνη, Θ., Τύμπης, Δ., και Πετράκης, Ε., (2006). “Εργαστηριακές Ασκήσεις Μικροβιολογίας Τροφίμων”. ΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα.