



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Δρ.ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΒΑΣΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΑΤ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΛΙΚΗ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΕΡΟΒΙΩΝ ΜΕΣΟΦΙΛΩΝ (ΟΜΧ), ΨΥΧΡΟΦΙΛΩΝ ΚΑΙ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ESHERICHIA COLI

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΖΥΜΩΝ- ΜΥΚΗΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΥΚΗΛΙΑΚΩΝ ΥΦΩΝ ΣΕ ΤΟΜΑΤΟΠΟΛΤΟ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΧΥΜΟΥΣ ΚΑΤΑ HOWARD

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΕΡΟΒΙΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ SALMONELLA SPP. ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 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 κάψιμο 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 καλλιεργειών,
- i. κάθε ατύχημα, που έχει ως συνέπεια την παρουσία μικροβιακών καλλιεργειών 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. 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 καλλιεργειών, 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, ενυπόγραφα, όλων των κανόνων και οδηγιών για την εργαστηριακή ασφάλεια, δεσμευόμενοι για την πιστή τήρησή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

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.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

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, σιφώνια, 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 αλουμινόχαρτο, 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.

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.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:ΟΛΙΚΗ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΕΡΟΒΙΩΝ ΜΕΣΟΦΙΛΩΝ (ΟΜΧ), ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ, ΨΥΧΡΟΦΙΛΩΝ ΚΑΙ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

3.1. Εισαγωγή

Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που εμφανίζονται στα τρόφιμα, είτε ως μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας, είτε ως επιμολύνσεις από άλλες πηγές είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί και με εξαίρεση τα ζυμούμενα τρόφιμα (όπου είναι επιθυμητή η ανάπτυξη μικροοργανισμών ζύμωσης), ο πληθυσμός τους αποτελεί συνήθως δείκτη της μικροβιολογικής ποιότητας.

Τα αερόβια βακτήρια, ανάλογα με τις θερμοκρασίες που αναπτύσσονται χωρίζονται σε :

- Μεσόφιλα : όρια ανάπτυξης 8-45°C, άριστη θ°C ανάπτυξης 30-37°C
- Θερμόφιλα: όρια ανάπτυξης 45-75°C, άριστη θ°C ανάπτυξης 55°C
- Ψυχρότροφα: όρια ανάπτυξης 0-30°C, άριστη θ°C ανάπτυξης 21°C
- Ψυχρόφιλα: όρια ανάπτυξης (-2)-15°C, άριστη θ°C ανάπτυξης 7°C

Ανάλογα με το είδος του τροφίμου και την επεξεργασία που έχει υποστεί ή τη θερμοκρασία που συντηρείται, μία ή περισσότερες από τις παραπάνω κατηγορίες μικροοργανισμών είναι σημαντικό να καταμετρούνται σε ένα μη εκλεκτικό υπόστρωμα (καθώς πρόκειται για ομάδες πολλών διαφορετικών μικροοργανισμών σε κάθε περίπτωση).

Ο πληθυσμός των αερόβιων μεσόφιλων μικροβίων (ΟΜΧ) ιδιαίτερα, 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)", 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.

3.2. 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 ± 0,2

Αποστείρωση στους 121 °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°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 °C. Διανομή ανά 1,0 ml από το προϊόν-δείγμα, όπως είναι ή από τις αραιώσεις του, σε τρυβλία, με την τεχνική του ενοφθαλμισμού των τρυβλίων. Προσθήκη 12-15 ml θρεπτικού υλικού. Προσεκτική ανακίνηση των τρυβλίων, 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 τρυβλίων, για στερεοποίηση, σε απόλυτα οριζόντια θέση. Αναστροφή και επώαση των τρυβλίων στους 35 - 37 °C, για 48h ή 32 °C, για 72h.

Μετά την διανομή στα τρυβλία 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 τρυβλίο. Παραμονή των τρυβλίων, 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 τρυβλίων στους 35 - 37 °C, για 48h ή 32 °C, για 72h.

Παρατηρήσεις

1. Αν αντί για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα μετράμε Θερμόφιλα, Ψυχρότροφα, ή Ψυχρόφιλα Βακτήρια, ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης είναι αντίστοιχα:

- Θερμόφιλα: 55°C x 5μέρες
- Ψυχρότροφα: 22°C x 2 μέρες
- Ψυχρόφιλα: 6,5°C x 7μέρες

Κατά τα άλλα, η επώαση γίνεται στο ίδιο μη εκλεκτικό υπόστρωμα (Plate Count Agar) και μετράμε και πάλι όλες τις αποικίες βακτηρίων.



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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ, ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ *ESCHERICHIA COLI*

4.1. Εισαγωγή

Τα εντεροβακτηρίδια είναι Gram- βακτήρια εντερικής προέλευσης που ανήκουν στη οικογένεια Enterobacteriaceae, η οποία περιλαμβάνει σημαντικά αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Yersinia*). Το ολικά εντεροβακτηρίδια, καθώς και τα κολοβακτηρίδια ή κολοβακτηριοειδή που αποτελούν υποομάδα της οικογένειας Enterobacteriaceae, αποτελούν δείκτες υγιεινής και μικροβιολογικής ποιότητας σε πολλά τρόφιμα και στο νερό. Τα κολοβακτηριοειδή είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να ζυμώνουν τη λακτόζη (σε αντίθεση με τα υπόλοιπα γένη της οικ. Enterobacteriaceae), παράγοντας οξέα και αέριο (διοξειδίο του άνθρακα). Αυτό σε πολλά τρόφιμα δημιουργεί αλλοιώσεις (π.χ. οξίνιση λαχανικών, διόγκωση συσκευασμένων τροφίμων, σκάσιμο τυριών, κλπ).

Η παρουσία τους στα τρόφιμα υποδηλώνει συνήθως εντερική μόλυνση του τροφίμου, καθώς αποτελούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου ανθρώπων και ζώων. Ειδικά η *Escherichia coli* που είναι σημαντικό παθογόνο βακτήριο, αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης, καθώς βρίσκεται πάντα στα κόπρανα ανθρώπων και ζώων. Γενικότερα οι υψηλοί πληθυσμοί εντερικών βακτηρίων υποδηλώνουν εντερική μόλυνση των τροφίμων άμεσα (με απευθείας επαφή με κόπρανα) ή έμμεσα (π.χ. μέσω μολυσμένου νερού) και συνεπώς ελλιπείς συνθήκες υγιεινής, και ενδέχεται να προκαλέσουν αλλοιώσεις σε τρόφιμα ή να συνοδεύονται από υψηλούς πληθυσμούς παθογόνων βακτηρίων εντερικής προέλευσης, για αυτό και ο προσδιορισμός τους είναι σημαντικός. Καταστρέφονται με ήπια θερμική επεξεργασία, αφυδάτωση ή κατάψυξη και η παρουσία τους στα επεξεργασμένα τρόφιμα οφείλεται σε επιμόλυνση μετά τη θερμική επεξεργασία.

Τα εντεροβακτηρίδια και τα κολοβακτηριοειδή, είναι αρκετά διαδεδομένα σε ζωικά (κυρίως) αλλά και σε φυτικά τρόφιμα καθώς χρησιμοποιούν σαν πηγή ενέργειας μεγάλο αριθμό υδατανθράκων και άλλων οργανικών ενώσεων, αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 10-46° C, προκαλούν ζύμωση των σακχάρων και παράγουν μεγάλη ποσότητα οξέος και αερίου, παράγουν ανεπιθύμητες οσμές στα τρόφιμα. Στα κολοβακτηριοειδή ανήκουν στα γένη *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, και *Klebsiella*.

Το είδος *Escherichia coli* (τύπος I) προέρχεται πάντα από τον εντερικό σωλήνα, όπου σαπροφυτεί, πολλαπλασιάζεται και συνήθως βρίσκεται σε υψηλούς πληθυσμούς στα κόπρανα. Σχεδόν το 100% των στελεχών του προκαλούν ζύμωση της λακτόζης, με παραγωγή αερίου και ινδόλης στους 44.5° +/-0.2°. Ειδικά ο ορότυπος *E. coli* O157:H7 είναι από τα σημαντικότερα τροφοπαθογόνα βακτήρια και προκαλεί πολλές τροφικές δηλητηριάσεις κυρίως σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Το γένος *Enterobacter* βρίσκεται σπάνια στα κόπρανα, θεωρείται μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας των φυτών και γι' αυτό η παρουσία του στα τρόφιμα και το νερό δεν σημαίνει πάντοτε, μόλυνση από κόπρανα. Το γένος *Citrobacter* θεωρείται μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εδάφους. Τα βακτήρια της οικ. Enterobacteriaceae *Erwnia*, *Serratia*, *Aeromonas* δεν θεωρούνται κοπρανώδους προέλευσης. Το γένος *Klepsiella* βρίσκεται στα κόπρανα σε αναλογία 45% και είναι ο

δεύτερος, σε σειρά συχνότητας, μικροοργανισμός που βρίσκεται στα κόπρανα. Απομονώνεται επίσης από τα φυτά όπου αποτελεί μέρος της φυσικής χλωρίδας τους. Γενικά, εκτός από το κολοβακτηρίδιο του εντέρου (*Escherichia coli*) η παρουσία των υπολοίπων κολοβακτηριοειδών στα τρόφιμα και στο νερό δεν μπορεί να χρησιμεύσει σαν απόλυτη ένδειξη εντερικής μόλυνσης, ωστόσο οι υψηλοί πληθυσμοί αυτών μπορούν να συνδεθούν με πλημμελείς συνθήκες υγιεινής (χρήση μη χλωριωμένου νερού στη βιομηχανία, κακή ατομική υγιεινή σε χειριστές τροφίμων, επιμολύνσεις κρεάτων κατά τη σφαγή)

4.2. ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ, ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ *ESCHERICHIA COLI*

Η αρίθμηση των εντεροβακτηριδίων, κολοβακτηριοειδών και της *E. coli*, μπορεί να γίνει με περισσότερες από μία μεθόδους και με τη χρήση και με τη χρήση διαφορετικών συνδυασμών θρεπτικών υποστρωμάτων. Συνήθως όμως για τις αναλύσεις τροφίμων γίνεται καταμέτρηση μετά από εμβολιασμό σε τρυβλία όπου χρησιμοποιούνται αντίστοιχα τα υποστρώματα Violet Red Bile Glucose agar, Violet Red Bile Lactose agar, και TBX agar. Το TBX agar είναι εκλεκτικό και διαγνωστικό υπόστρωμα στο οποίο προσδιορίζεται η παρουσία β-γλουκουρονιδάσης, ενός ενζύμου χαρακτηριστικού για όλους τους ορότυπους *E. coli*. Ειδικότερα για την εκλεκτική καταμέτρηση της *E. coli* O157:H7 χρησιμοποιείται αντί του TBX agar το SMAC-BCIG agar, το οποίο περιέχει αντί για λακτόζη, σορβιτόλη, την οποία ο ορότυπος O157:H7 δεν μπορεί να ζυμώσει, σε αντίθεση με τους άλλους ορότυπους της *E. coli*.

Παρατηρήσεις σχετικά με την εκλεκτικότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων:

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 ελεγμένης 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.

**Απαιτούμενα υποστρώματα, εμβολιασμός, συνθήκες επώασης
και εμφάνιση αποικιών**

Μικροοργανισμοί	Υπόστρωμα	Σύσταση g/l	Εμβολιασμός	επώαση	Εμφάνιση αποικιών
Enterobacteriaceae	Violet Red Bile Glucose agar (VRBGA)	Yeast extract 3.0 Balanced peptone No.1 7.0 Sodium chloride 5.0 Bile Salts No. 3 1.5 Lactose 10.0 Neutral red 0.03 Crystal violet 0.002 Agar No. 2 12.0	Με ενσωμάτωση 1ml και προσθήκη και 2 ^{ου} στρώματος άγαρ	37°Cx1 8-24h	Ροζ-μωβ αποικίες με μέγεθος μεγαλύτερο από 0,5mm
Coliforms	Violet Red Bile (Lactose) agar (VRBA)	Yeast extract 3.0 Balanced peptone No.1 7.0 Sodium chloride 5.0 Bile Salts No. 3 1.5 Glucose 10.0 Neutral red 0.03 Crystal violet 0.002 Agar No. 2 12.0	Με ενσωμάτωση 1ml και προσθήκη και 2 ^{ου} στρώματος άγαρ	37°Cx1 8-24h	Ροζ-μωβ αποικίες με μέγεθος μεγαλύτερο από 0,5mm
E. coli	TBX agar	Peptone 20.0 Sorbitol 10.0 Bile salts no.3 1.5 Sodium chloride 5.0 Neutral red 0.03 Crystal violet 0.001 Agar 12.0	Με ενσωμάτωση 1ml	44°Cx1 8-24h	Γαλαζοπράσινες αποικίες
E. coli O157:H7	SMAC-BCIG agar	Peptone 20.0 Sorbitol 10.0 Bile salts 1.5 Sodium chloride 5.0 Neutral red 0.03 Crystal violet 0.001 Agar 12.0	Με ενσωμάτωση 1ml	37°Cx1 8-24h	Λευκές-μπεζ αποικίες

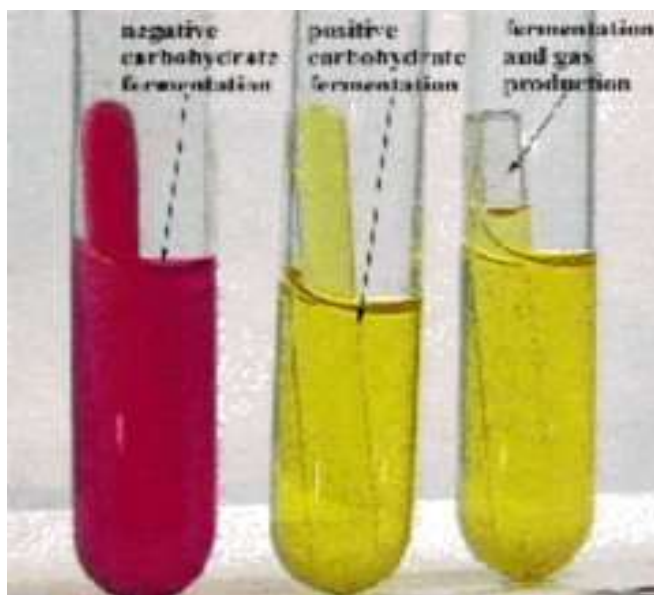


Εικόνα 2. Coliforms σε VRBA agar



Εικόνα 3. Escherichia coli σε TBX agar

Ειδικά για την περίπτωση προσδιορισμού των κολοβακτηριδίων, εκτός από την μέθοδο εμβολιασμού σε τρυβλία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος MPN, όταν οι αναμενόμενοι πληθυσμοί είναι πολύ χαμηλοί (<10cfu/g). Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Minerals Modified Glutamate broth, MacConkey broth, EC broth, ή Brilliant Green Lactose Bile Broth, μαζί με αντεστραμμένους σωλήνες Durham όπου συσσωρεύεται τυχόν παραγόμενο αέριο. Μετά από εμβολισμό 3 σωλήνων από 3 διαδοχικές αραιώσεις, τα ολικά κολοβακτηρίδια επωάζονται στους 35°Cx48h, ενώ τα κολοβακτηρίδια κοπρανώδους προέλευσης (*E. coli*) επωάζονται στους 44°Cx48h. Οι θετικοί σωλήνες αποκτούν θόλωμα και στους σωλήνες συσσωρεύεται αέριο (CO₂).



Εικόνα 4. Σωλήνες με αντεστραμμένους σωλήνες Durham όπου υπάρχει παραγωγή οξέων από τη ζύμωση σακχάρων (κίτρινο χρώμα) ή/και παραγωγή οξέων και συσσωρευση αερίου (3^{ος} σωλήνας).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΖΥΜΩΝ-ΜΥΚΗΤΩΝ

5.1. Εισαγωγή

Οι μύκητες και οι ζύμες αποτελούν δείκτη των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης των όξινων και ξηρών των τροφίμων. Όταν βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό έχουν δυσμενή επίδραση στην καλή συντήρηση τους, κυρίως των προϊόντων με χαμηλό pH, όπως: χυμοί φρούτων, αεριούχα ποτά, όξινα λαχανικά, σκληρά τυριά, γιαούρτι, κ.τ.λ., καθώς και εκείνων με υψηλή οσμωτική πίεση (ή χαμηλή ενεργότητα νερού-aw), όπως π.χ. μέλι, μαρμελάδες, συμπυκνωμένο γάλα/χυμοί και ξηρά όσπρια, σιτηρά, ξηροί καρποί, έντονα αλατισμένα (παστά) προϊόντα. Στα τρόφιμα αυτά η καταμέτρηση ζυμών-μυκήτων δίνει μια συνολική εικόνα για το μικροβιακό φορτίο, αντίστοιχη με αυτή της ΟΜΧ σε τρόφιμα που ευνοείται η ανάπτυξη βακτηρίων.

Οι ζύμες και οι μύκητες ως παράγοντες αλλοίωσης παράγουν δυσάρεστη δυσοσμία μούχλας, γεώδη γεύση, οσμή αμμωνίας (ζύμες), προκαλούν μαλάκωμα υφής και έντονη πρωτεόλυση και λιπόλυση. Επίσης, κάποιοι ελάχιστοι μύκητες παράγουν μυκοτοξίνες (αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες, εργοτοξίνη, πατουλίνη, κιτρινίνη, κλπ) κυρίως σε ζωοτροφές, σιτηρά και όσπρια, οι οποίες είναι ισχυρές καρκινογόνες, αλλεργιογόνες ή ηπατοτοξικές ουσίες και αφορούν άμεσα την ασφάλεια των τροφίμων. Από την άλλη πολλοί μύκητες είναι ασφαλείς και μάλιστα κάποιοι χρησιμοποιούνται σε ζυμούμενα τρόφιμα ως καλλιέργειες ζύμωσης. Οι ζύμες δεν είναι ποτέ τροφοπαθογόνες και πολλές ζύμες είναι εδώδιμες και χρησιμοποιούνται σε ζυμούμενα τρόφιμα (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae* σε κρασί, ψωμί, κλπ).

Η ανάπτυξη των ζυμών προκαλεί ανεπιθύμητες μεταβολές των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων, των ποτών και της άλμης, που εκδηλώνονται με την παρουσία γλοιωδών μεμβρανών, θολερότητας, ιζημάτων, με την ανάπτυξη ανωμάλων οσμών και γεύσεων, καθώς και με τη μεταβολή της οξύτητας των τροφίμων, επειδή αποδομούνται τα οργανικά οξέα. Πολλά είδη ζυμών μπορούν να μεταβολίζουν το γαλακτικό, το οξικό και το κιτρικό οξύ, τα οποία συμβάλουν στη δημιουργία του χαρακτηριστικού αρώματος, αλλά κυρίως στη συντήρηση ορισμένων τροφίμων. Αυτό έχει ως συνέπεια την άνοδο του pH και τη δημιουργία καταλλήλων συνθηκών για την ανάπτυξη βακτηρίων.

Κοινά χαρακτηριστικά των ζυμών και των μυκήτων στα οποία βασίζεται η καταμέτρησή τους στα θρεπτικά υποστρώματα είναι η ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε χαμηλές τιμές pH (3,0-4,0) και η ανθεκτικότητά τους σε χαμηλές τιμές δραστηριότητας νερού.

Λίγα είδη ζυμών και μυκήτων συμβάλουν στην παραγωγή ορισμένων τροφίμων π.χ. *Penicillium roqueforti*, *Penicillium caseicolum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida kefyri* κ.ά. Τα περισσότερα είδη έχουν σημασία σαν μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα, ενώ οι μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες έχουν σημασία σαν παθογόνοι μικροοργανισμοί.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΡΙΘΜΗΣΗΣ

Για την αρίθμηση των ζυμών και των μυκήτων χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι:

- ✓ Η μέθοδος ενσωμάτωσης

✓ Η μέθοδος τις επιφανειακής εξάπλωσης

Τα κυριότερα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ζυμών και των μυκήτων στα τρόφιμα είναι το Sabourand Dextrose agar και το Potato Dextrose Agar.

Sabourand Dextrose agar

Mycological peptone	10.0
Glucose (dextrose)	40.0
Agar	15.0
Απεσταγμένο νερό	1L
pH 5.6 ± 0.2 @ 25°C	
Αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά	

Potato Dextrose Agar

Εκχύλισμα πατάτας	4g
Γλυκόζη	20g
Άγαρ	15g
Απεσταγμένο νερό	1L
pH:5,6	

Απαιτούμενα υλικά

1. Αραιωτικό υγρό
2. Potato Dextrose Agar
3. Rose Bengal Chloramphenicol Agar
4. Sabourand Dextrose Agar

Προετοιμασία δεκαδικών αραιώσεων

Γίνεται όπως και για των προσδιορισμό της ΟΜΧ

Μέθοδος ενσωμάτωσης

Ενοφθαλμίζεται διπλή σειρά τρυβλίων με όγκο ενοφθαλμίσματος 1mL από κάθε αραιώση. Το ενοφθάλμισμα ενσωματώνεται σε 15-20 mL υποστρώματος Potato Dextrose Agar θερμοκρασίας 45°C.

Η επώαση γίνεται στους 22-25°C, για 4-5 ημέρες.

Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Οι αποικίες των μυκήτων παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές υφές, ενώ οι αποικίες των ζυμών μοιάζουν με τις αποικίες των βακτηρίων. Σε περίπτωση αμφιβολίας, η διαφοροποίηση γίνεται με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου.

Για τον υπολογισμό του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων, πολλαπλασιάζεται ο μέσος όρος των αποικιών τους στο κατάλληλο τρυβλίο, με τον αντίστοιχο συντελεστή αραιώσης.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται ανά mL ή g τροφίμου.

Μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης

Εμβολιάζεται διπλή σειρά τρυβλίων με Rose Bengal Chloramphenicol Agar. Ο όγκος του εμβολιάσματος είναι 0,1-0,2 mL και η εξάπλωσή του γίνεται με τη βοήθεια ράβδου που προηγουμένως έχει αποστειρωθεί σε φλόγα. Το υπόστρωμα (εντός των τρυβλίων), πριν χρησιμοποιηθεί, παραμένει σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C για 3 ώρες, προκειμένου να στεγνώσει καλά η επιφάνειά του. Το υπόστρωμα αυτό έχει το πλεονέκτημα ότι περιορίζει την εξάπλωση των αποικιών, δίνοντας έτσι την ευκαιρία να αναπτυχθούν, παράλληλα, τόσο τα στελέχη που αναπτύσσονται γρήγορα, όσο και τα στελέχη που αναπτύσσονται αργά.

Εάν το τρόφιμο, που εξετάζεται με τη μέθοδο αυτή είναι αρκετά αλκαλικό, πρέπει προηγουμένως να ρυθμίζεται σε pH 7,0-7,5, γιατί διαφορετικά ελαχιστοποιείται η ανασταλτική δράση του αντιβιοτικού.

Η επώαση γίνεται στους 22-25°C, για 4-5 ημέρες.



Εικόνα 5α: Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* σε Potato Dextrose Agar



Εικόνα 5β: Αποικίες Μυκήτων σε Potato Dextrose Agar

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΥΚΗΛΙΑΚΩΝ ΥΦΩΝ ΣΕ ΤΟΜΑΤΟΠΟΛΤΟ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΧΥΜΟΥΣ ΚΑΤΑ HOWARD

6.1. Εισαγωγή

Η μέθοδος ελέγχου των υφών μυκήτων σε τομάτες και άλλα λαχανικά αλλά και φρούτα, είναι η εμπειρική μέθοδος κατά HOWARD, η οποία επινοήθηκε από τον B.J. Howard το 1911, ως ένας τρόπος εκτίμησης της ποιότητας του ketchup στις Η.Π.Α, άρχισε δε να εφαρμόζεται από το 1916, από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. Περιλαμβάνεται ήδη στις επίσημες μεθόδους ανάλυσης (Official Methods of Analysis) του AOAC International (Association of Official Analytical Chemists). Σε υγιείς φυτικούς ιστούς δεν αναπτύσσονται μυκηλιακές υφές σε σημαντικές ποσότητες, εκτός αν υπάρχει τραυματισμός του φρούτου ή λαχανικού ή ακατάλληλη ή πολύ παρατεταμένη συντήρηση (π.χ. σε υψηλή θερμοκρασία). Επιπλέον σε θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα οι μύκητες καταστρέφονται άρα δεν μπορεί κανείς να καταλάβει αν υπήρχε μούχλα στην α' ύλη. Συνεπώς ότι η παρουσία μυκηλιακών υφών μυκήτων, σε προϊόντα όπως επεξεργασμένος χυμός τομάτας, χυμός φρούτων, αποτελεί απόδειξη ότι χρησιμοποιήθηκε, από την αρχή, σάπια πρώτη ύλη.

Επίσης, το ποσοστό των μυκηλιακών υφών, που βρίσκονται σε τοματοπολτό, αποτελεί ένδειξη για την καθαριότητα και την κατάλληλη ή μη μεταχείριση της τομάτας από τον κονσερβοποιό, κατά τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας.

Η άμεση μικροσκοπική αυτή μέθοδος επιχειρήθηκε να αντικατασταθεί από άλλη, που θα στηριζόταν στη εκτίμηση της χιτίνης, η οποία είναι χαρακτηριστικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, ωστόσο υπάρχει και στα κύτταρα εντόμων ενώ η ποσότητά χιτίνης εξαρτάται από το είδος και την ηλικία του κάθε μύκητα, συνεπώς αυτή η εναλλακτική μέθοδος εγκαταλείφθηκε γιατί δεν δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα..

Ο παρακάτω πίνακας δίνει την σχέση μεταξύ του ελάχιστου ποσοστού σάπιας πρώτης ύλης, που αντιστοιχεί σ' ένα ποσοστό μυκηλιακών υφών, που βρέθηκε στο τελικό προϊόν, κατά τη μέθοδο Howard. Από τον πίνακα αυτό φαίνεται ότι π.χ. για ένα ποσοστό 60% θετικών πεδίων, το ελάχιστο ποσοστό σάπιας πρώτης ύλης είναι 4,0%.

Σύμφωνα με τις προδιαγραφές, το επιτρεπόμενο όριο σε μυκηλιακές υφές (εκφραζόμενο σε εκατοστιαίο ποσοστό), ανέρχεται σε 40% θετικά πεδία (επί των μετρηθέντων), για όλα τα προϊόντα τομάτας, εκτός από τον τοματοχυμό, όπου οι προδιαγραφές είναι πιο αυστηρές και το επιτρεπόμενο όριο κατέρχεται σε 20%.

Ποσοστό μυκηλιακών υφών (%)	Ελάχιστο ποσοστό σάπιας πρώτης ύλης (%κ.β.)
10	0,5
20	0,5
30	1,2
40	2,2
50	3,0
60	4,0
70	9,0
80	15
90	26

6.2. Μέθοδος Ανάλυσης

Απαιτούμενα μέσα

1. Σύνθετο διοφθάλμιο μικροσκόπιο.
2. Ειδικοί προσοφθάλμιοι φακοί.
3. Ειδική αντικειμενοφόρος πλάκα Howard με την αντίστοιχη καλυπτρίδα Howard που περιέχει 25 οπτικά πεδία (5x5 τετράγωνα).

Μέθοδος

Απλώνουμε το προς ανάλυση δείγμα μετά από τυχόν αραίωση που μπορεί να χρειαστεί (ώστε να έχει ~8,5°Brix) στην αντικειμενοφόρο Howard και τοποθετούμε από πάνω απαλά μια καλυπτρίδα Howard.

Αν και οι μυκηλιακές υφές φαίνονται χωρίς χρώση, μπορούμε αν θέλουμε να προσθέσουμε λίγες σταγόνες από χρωστική όπως σαφρανίνη ή φουξίνη για να είναι πιο έντονο το χρώμα των μυκηλίων.

Τοποθετούμε την πλάκα στο μικροσκόπιο και παρατηρούμε το δείγμα με τον φακό 10x, σκανάροντας το καθένα από τα 25 τετράγωνα για να δούμε την ύπαρξη έστω και μικρού μέρους μυκηλιακών υφών.

Παρατηρούμε κάθε πεδίο και το χαρακτηρίζουμε ως θετικό αν παρατηρήσουμε μικκυλιακές υφές.

Οι μυκηλιακές υφές έχουν γενικά τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

A. μακριά, λεπτή, κυλινδρική κατασκευή, η οποία στο μικροσκόπιο φαίνεται να είναι επίπεδη,

B. διπλά, παράλληλα τοιχώματα, που πρέπει να έχουν το ίδιο πάχος και να κάμπτονται προς αυτή την κατεύθυνση,

Γ. υλικά μεταξύ των τοιχωμάτων, που συχνά διαχωρίζονται σε τμήματα ή εμφανίζονται κοκκώδη,

Δ. στρογγυλά ή τετράγωνα άκρα

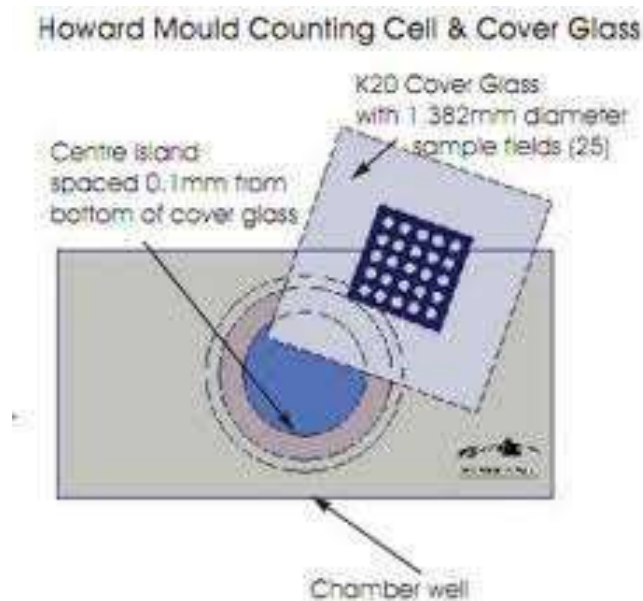
Ε. ευδιάκριτες διακλαδώσεις και

ΣΤ. κενά τμήματα μεταξύ των τοιχωμάτων σε ορισμένους μύκητες

Υπολογίζεται ο αριθμός των θετικών πεδίων και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως εξής:

$$\text{Αριθμός HOWARD} = \frac{\text{αριθμός θετικών πεδίων}}{\text{Σύνολο εξετασθέντων πεδίων}} \times 100$$

Η εξέταση γίνεται επί δύο πλακών. Αν η διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων (αριθμός θετικών πεδίων) είναι η μεγαλύτερη των δύο θετικών πεδίων, τότε εξετάζεται και τρίτη πλάκα. Στην περίπτωση αυτή, η έκφραση του αποτελέσματος γίνεται και πάλι με την εφαρμογή του ίδιου, ως άνω, τύπου λαμβανομένου όμως υπόψη του συνολικού αριθμού μετρηθέντων πεδίων.



Εικόνα 6α: Αντικειμενοφόρος Howard

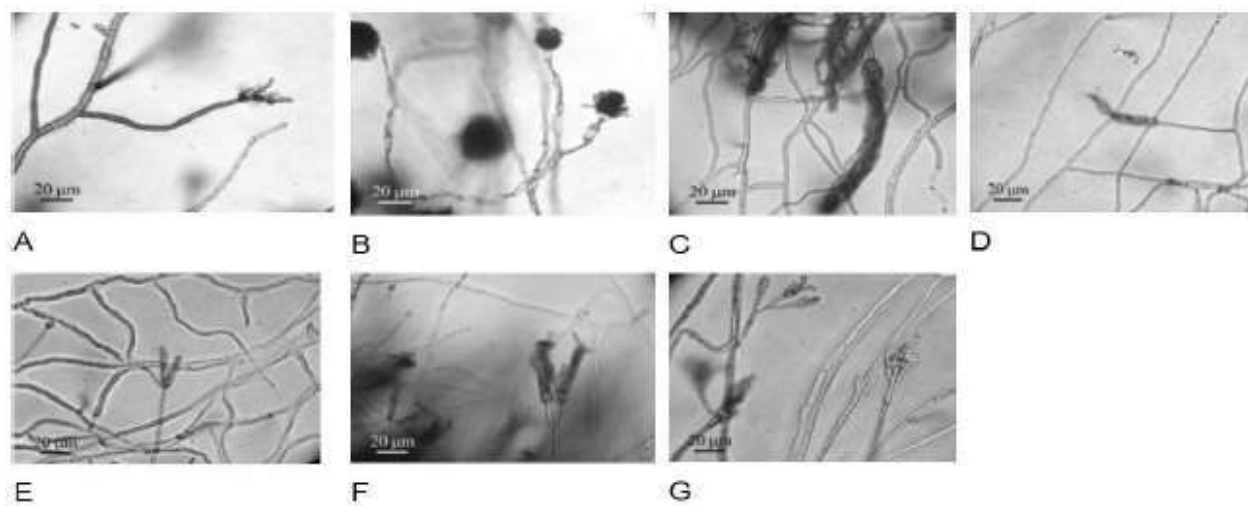


Figure 2 - Development of reproductive structures in Malt Extract agar. Microscopical analyses were performed after incubation for five days at $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. A: Filamentous fungus 4 - *Cladosporium* sp.; B: Filamentous fungus 10 - *Aspergillus fumigatus*; C: Filamentous fungus 5 - *Penicillium* sp.; D: Filamentous fungus 9 - *Penicillium* sp.; E: Filamentous fungus 11 - *Penicillium* sp.; F: Filamentous fungus 12 - *Penicillium* sp.; G: Filamentous fungus 13 - *Penicillium* sp.

Εικόνα 6β: Διάφορα είδη μυκηλιακών υφών στο οπτικό μικροσκόπιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

7.1. Εισαγωγή

Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB - lactic acid bacteria) χαρακτηρίζονται ως οξυάντοχα, μη παθογόνα, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Είναι σημαντική ομάδα των Gram⁺ βακτηρίων που έχουν ως φυσικό βιότοπο τα φυτά και από εκεί μεταφέρονται στο γάλα, στο κρέας και στα προϊόντα τους. Χρησιμοποιούνται σε Το κοινό χαρακτηριστικό των γαλακτικών βακτηρίων είναι ότι μπορούν να παράγουν γαλακτικό οξύ από την αναερόβια ζύμωση της λακτόζης ή της γλυκόζης ή σακχαρόζης και είναι τα πιο οξυάντοχα βακτήρια (ανάπτυξη έως και σε pH 3,8). Αποτελούνται από τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, αλλά συχνά σε αυτά περιλαμβάνονται και οι εντερικοί Στρεπτόκοκοι (*Enterococcus*), αλλά και άλλα γένη που προέκυψαν από το γένος *Lactobacillus* (π.χ. *Carnobacterium*) ή *Pediococcus* (*Tetragenococcus*). Τα LAB χωρίζονται σε ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά. Τα ομοζυμωτικά είναι τα γαλακτικά βακτήρια που μπορούν να παράξουν γαλακτικό οξύ χωρίς CO₂ όπως για παράδειγμα *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Ενώ τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια παράγουν γαλακτικό οξύ με την βοήθεια του CO₂ όπως για παράδειγμα το *Leuconostoc*. Γενικά όλα τα γαλακτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται ως GRAS (Generally Recognised as safe) είναι δηλαδή ασφαλή για κατανάλωση και χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε πολλά ζυμούμενα τρόφιμα όπως ζυμούμενα γαλακτοκομικά (γιαούρτι, ξυνόγαλαο, τυριά), αλλαντικά (σαλάμια αέρος, προσούτο) ή και ζυμούμενα λαχανικά (τουρσί, πράσινες ελιές). Επιπλέον πολλά είδη γαλακτικών είναι και προβιοτικά δηλαδή ενισχύουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και ρυθμίζουν την εντερική μικροχλωρίδα όπως ο *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* subs. *diacetylactis* και *Enterococcus faecalis*. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις η ανάπτυξη τους σε μη ζυμούμενα τρόφιμα οδηγεί σε αλλοίωση, π.χ. λόγω ανεπιθύμητης οξίνισης ή διόγκωσης/παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα.

Η παραγωγή CO₂ μπορεί να είναι επιθυμητή όπως για τα τυριά *Emmental*, κεφαλοτύρι, γραβιέρα αλλά μπορεί και να προκαλέσει αλλοιώσεις όπως σχίσιμο του τυροπήγματος και καταστροφή της υφής της φέτας, τρύπες σε ζυμούμενα αλλαντικά, διόγκωση σε συσκευασμένα τρόφιμα, αφρισμό σε χυμούς κ.ά. Το γαλακτικό οξύ δίνει ευχάριστη όξινη γεύση, μειώνει το pH, συμβάλει στην συντήρηση και ασφάλεια των ζυμούμενων τροφίμων. Είναι επιθυμητό στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά, αλλαντικά, ελιές, τουρσί, όπου τα γαλακτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ζύμωσης, φυσική ζύμωση με ενδογενή γαλακτικά βακτήρια και ζύμωση με καλλιέργειες εκκίνησης. Το γαλακτικό οξύ μπορεί όμως και να προκαλέσει αλλοιώσεις όπως στο νωπό γάλα, στο κρέας και τα αλλαντικά ιδίως αν είναι συσκευασμένα υπό κενό, στο λευκό κρασί, στην μπύρα, στους χυμούς.

7.2. Μέθοδος Καταμέτρησης Γαλακτικών Βακτηρίων

Η καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων γίνεται σε εκλεκτικά υποστρώματα και η επώαση τους γίνεται στους 37°Cx3d ή 30°Cx5d. Μερικά

από τα υποστρώματα που χρησιμοποιούμε είναι το MRS agar, Lactobacillus Selective agar, M17 agar, Tomato juice agar.

Το MRS agar χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη όλων των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Είναι πιο εκλεκτικό για το γένος Lactobacillus αν τα επωάσουμε σε μικραερόφιλο περιβάλλον δηλαδή παρουσία CO₂.

MRS Agar

Peptone	10,0 g
Beef extract	10,0g
Yeast extract	4,0 g
Dextroze	20,0 g
Tween 80	1,0 ml
Di-potassium Hydrogen Phosphate	2,0 g
Sodium Acetate (3H ₂ O)	5,0 g
Di-ammonium Hydrogen Citrate	2,0 g
Magnesium Sulfate (7H ₂ O)	0,2 g
Maganese Sulfate (4H ₂ O)	0.04 g
Agar	14,0 g
D.W. q.s.p	1000,0 ml

Ph 5,7 +/- 0,2

Αποστείρωση στους 121° C, για 15 min.

Το M17 agar είναι ελαφρώς εκλεκτικό για Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus.

M17agar

Pancreatic Digest of Casein	5.0 g
Soy Peptone	5.0 g
Beef Extract	5.0 g
Yeast Extract	2.5 g
Ascorbic Acid.....	0.5 g
Magnesium Sulfate.....	0.25 g
Disodium-β-glycerophosphate.....	19.0 g
Agar.....	11.0 g
Απεσταγμένο νερό.....	950ml

Αποστείρωση στους 121° C, για 15 min.

Το Lactobacillus Selective agar είναι εκλεκτικό για τα γένη Lactobacillus λόγω του όξινου pH που επιτυγχάνεται με την προσθήκη οξέος.

Lactobacillus Selective agar

Enzymatic Digest of Casein.....	10 g
Yeast Extract.....	5 g
Monopotassium Phosphate.....	6 g
Ammonium Citrate.....	2 g
Dextrose.....	20 g
Sodium Acetate Hydrate.....	25 g
Magnesium Sulfate.....	0.575 g
Manganese Sulfate.....	0.12 g
Ferrous Sulfate.....	0.034 g
Polysorbate 80.....	1 g
Agar.....	15 g
Final pH: 5.5 ± 0.2 at 25°C	
Αποστείρωση στους 121° C, για 15 min	
Supplement: Glacial acetic acid 1.32ml	

Το Tomato Juice agar είναι κατάλληλο για όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια ιδίως των Lactobacillus φυτικής προέλευσης.

Tomato Juice agar

Σύσταση/lt	
Tomato Juice Solids.....	20 g
Enzymatic Digest of Casein.....	10 g
Peptonized Milk.....	10 g
Agar.....	11 g
Απεσταγμένο νερό.....	1000ml
Final pH: 6.1 ± 0.2 at 25°C	
Αποστείρωση στους 121° C, για 15 min.	



Εικόνα 7: Pediococcus acidilactici σε MRS agar

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

8.1. Εισαγωγή

Σε πολλές περιπτώσεις εκτός από την καταμέτρηση είναι επιθυμητή και η ταυτοποίηση γενών (ή και ειδών) των γαλακτικών βακτηρίων (LAB), ώστε :

- να διαπιστωθεί η καθαρότητα μια καθαρής καλλιέργειας γαλακτικών βακτηρίων (αποφυγή επιμολύνσεων),
- να διαπιστωθεί ποια γένη απαρτίζουν την αυτόχθονη χλωρίδα σε ένα ζυμούμενο προϊόν (π.χ. τυρί ή σαλάμι φυσικής ωρίμανσης), ή
- να διαπιστωθεί αν έχουμε ομοζυμωτικά ή ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια, εκ των οποίων τα πρώτα (ομοζυμωτικά) παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ από τη γλυκόζη χωρίς CO₂, ενώ τα ετεροζυμωτικά παράγουν εκτός από γαλακτικό και CO₂, H₂O₂, ή και αλκοόλη, προϊόντα που άλλοτε είναι επιθυμητά και άλλοτε ανεπιθύμητα (αποτελούν παράγοντα αλλοίωσης).

Για να γίνει με συμβατικές μεθόδους αυτός ο διαχωρισμός χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό μικροσκοπικές και βιοχημικές αναλύσεις, ή έτοιμα πολλαπλά βιοχημικά τεστ (τύπου API τεστ). Διαφορετικά, μπορεί να γίνει με σύγχρονες μεθόδους ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους με τη χρήση τεχνικών Μοριακής Βιολογίας και τον προσδιορισμό του γενετικού υλικού (μέθοδος Real-time-PCR).

Για παράδειγμα, από όλα τα γένη των γαλακτικών βακτηρίων τα *Lactobacillus* (και *Carnobacterium* που παλιότερα ανήκαν στους *Lactobacillus*) είναι τα μοναδικά ραβδία, ενώ τα υπόλοιπα LAB είναι κόκκοι. Επίσης, ετεροζυμωτικά είναι όλα τα *Leuconostoc* και κάποιοι *Lactobacillus*. Τα *Pediococcus* (και τα *Tetragenococcus* που είναι υποομάδα των *Pediococcus*) αναπτύσσονται σε τετράδες. Τα πιο οξυάντοχα είναι τα *Lactobacillus* (και *Pediococcus*), ενώ τα πιο αλοάντοχα (ανθεκτικά σε αλάτι) είναι τα *Tetragenococcus* και *Enterococcus*.

Πίνακας 1. Διαφορετικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά γαλακτικών βακτηρίων

Χαρακτηριστικά	Carno-bacterium	Lacto-bacillus	Entero-coccus	Lactococcus/Vagococcus	Leuconostoc/Oenococcus	Pedio-coccus	Strepto-coccus	Tetragenococcus
Σχηματισμός τετράδων	-	-	-	-	-	+	-	+
Παραγωγή CO ₂ από την γλυκόζη	-	±	-	-	+	-	-	-
Ανάπτυξη στους 10°C	+	±	+	+	+	±	-	+
Ανάπτυξη στους 45°C	-	±	+	-	-	±	±	-

Ανάπτυξη παρουσία 6,5% NaCl	ND	±	+	-	±	±	-	+
Ανάπτυξη παρουσία 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	+
Ανάπτυξη σε pH 4,4	Ns	±	+	±	±	+	-	-
Ανάπτυξη σε pH 9,4	-	-	+	-	-	-	-	+
Γαλακτικό οξύ	L	D, L, DL	L	L	D	L,DL	L	L

8.2. Ταυτοποίηση Γαλακτικών βακτηρίων

Με βάση το Διάγραμμα 1 (βλ. παρακάτω) μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός των γαλακτικών βακτηρίων του κρέατος σε διαφορετικά γένη. Μια άγνωστη αποικία γαλακτικών βακτηρίων που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε μεταφέρεται από το τρυβλίο (MRS agar) σε θρεπτικό ζωμό (MRS broth, ή M17 broth). Γίνονται κάποια τεστ για να αποκλειστεί η πιθανότητα να μην είναι γαλακτικά βακτήρια (χρώση Gram, τεστ καταλάσης) και στη συνέχεια ελέγχουμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο για να δούμε αν πρόκειται για ραβδιά, κόκκους, κοκοβακίλους, ή κόκκους σε τετράδες. Επίσης ελέγχουμε την τυχόν παραγωγή CO₂ (ετεροζυμωτικά βακτήρια) με αντεστραμμένους σωλήνες Durham σε θρεπτικό ζωμό, όπου η παραγωγή αερίου φαίνεται υπό τη μορφή φυσαλίδων που μαζεύονται στο σωλήνα Durham και τον αναγκάζουν να επιπλέει. Εναλλακτικά, προσθέτουμε ποσότητα εμβολίου των κυττάρων σε υγροποιημένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (MRS agar) σε δοκιμαστικούς σωλήνες και μετά την επώαση κοιτάμε αν υπάρχουν ρωγμές ή τρύπες στο agar, κάτι που υποδηλώνει παραγωγή αερίου (CO₂). Στη συνέχεια, η επώαση του άγνωστου γαλακτικού βακτηρίου σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (MRS broth, M17 broth) σε διαφορετικές θερμοκρασίες και σε συγκέντρωση άλατος 6,5%, σε συνδυασμό με τη μελέτη της μορφολογίας και τον έλεγχο παραγωγής CO₂ μας βοηθάει να κατατάξουμε τα γαλακτικά βακτήρια σε γένη, σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.

Διάγραμμα 1. Διάγραμμα διαχωρισμού των γαλακτικών βακτηρίων του κρέατος σε διαφορετικά γένη

Identification of meat lactics

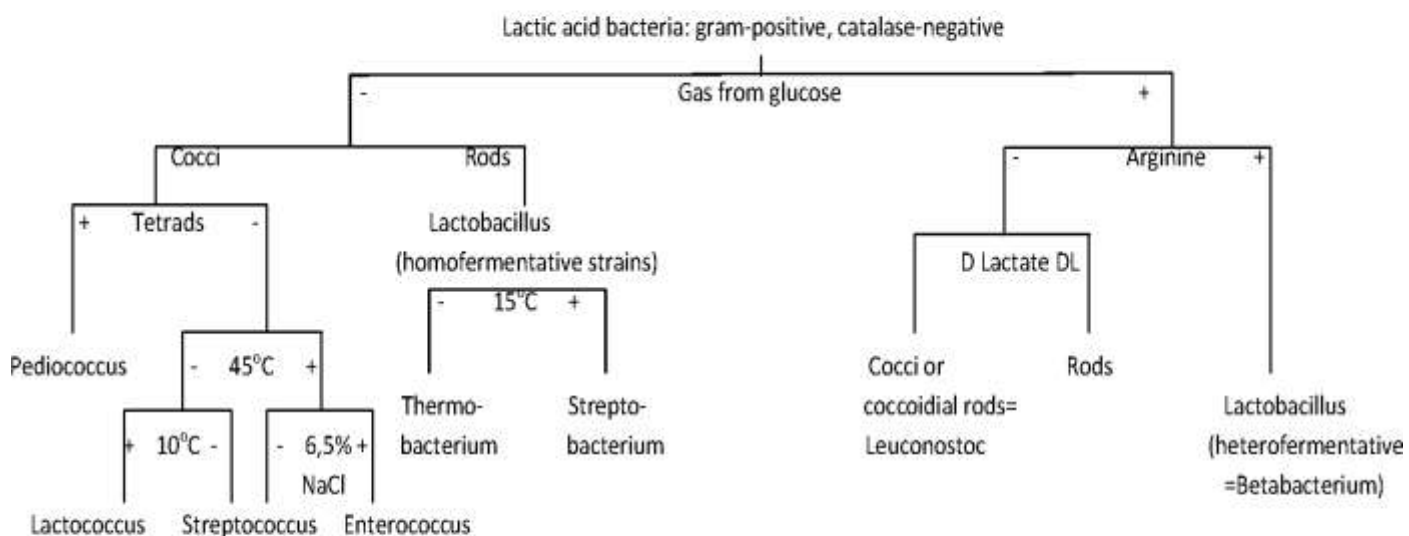


FIGURE 1. Differentiation scheme for lactic acid bacteria.

(Adapted from Dr. Schillinger, identification of Lactobacillie from Meats 1987. Academic Press, London.)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΕΡΟΒΙΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

9.1. Εισαγωγή

Τα κύρια αναερόβια βακτήρια που εμφανίζονται στα τρόφιμα ανήκουν στο γένος *Clostridium* και στο γένος *Desulfotomaculum*. Το γένος *Desulfotomaculum* είναι πολύ συγγενές με το *Clostridium* και το πιο διαδεδομένο είδος του *D. nigrificans* ανήκε παλιότερα στο γένος *Clostridium*. Είναι και τα δύο υποχρεωτικά αναερόβια, θερμοάντοχα σπορογόνα Gram+ βακτήρια του εδάφους, τα οποία δεν καταστρέφονται με παστερίωση, αντίθετα μη ήπια θέρμανση παράγουν σπόρια που καταστρέφονται μόνο σε θερμοκρασίες αποστείρωσης. Η βασική διαφορά των δύο γενών είναι ότι το γένος *Clostridium* έχει δύο σημαντικά παθογόνα είδη, το *C. botulinum* και το *C. perfringens* που παράγουν τοξίνες (καθώς και πολλά αλλοιογόνα είδη, π.χ. *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*), ενώ το γένος *Desulfotomaculum* δεν έχει παθογόνα είδη, αλλά προκαλεί αλλοιώσεις σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα (δυσσομίες λόγω παραγωγής υδρόθειου και σχηματισμό μαύρου χρώματος σε μεταλλικές κονσέρβες που περιέχουν σίδηρο). Τα κλωστρίδια είναι αρκετά διαδεδομένα στο έδαφος, στη σκόνη, την θαλάσσια ίλυ, αλλά και στο γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων και ζώων. Από αυτές τις πηγές μπορούν να μολυνθούν το νερό, τα φυτά και ζωικά τρόφιμα, και να προκληθούν σε αυτά είτε αλλοιώσεις είτε επικίνδυνες τροφικές δηλητηριάσεις.

Η νευροτοξίνη που παράγει το *C. botulinum* είναι η ισχυρότερη τοξίνη στη φύση και προκαλεί θάνατο λόγω νευρομυϊκής παράλυσης εντός λίγων ωρών αν δεν ληφθεί άμεσα αντιτοξίνη (αντίδοτο). Η ασθένεια αυτή είναι γνωστή ως βουτιλισμός ή αλλαντίαση, γιατί παλαιότερα συνέβαινε συχνά μετά από κατανάλωση αλλαντικών (τα οποία σήμερα παράγονται με την προσθήκη νιτρωδών αλάτων που αναστέλλουν την εκβλάστηση σπορίων του *Clostridium*). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί οκτώ διαφορετικοί αντιγονικοί τύποι αλλαντικής τοξίνης με διαφορετικό μοριακό βάρος αντιγονικά χαρακτηριστικά και τοξικότητα, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως A, B, C1, C2, D, E, F και G και παράγονται από τα αντίστοιχα στελέχη που χαρακτηρίζονται με τα ίδια γράμματα. Σημειώτέον ότι ένα τρόφιμο μπορεί να περιέχει ζωντανά κύτταρα ή σπόρους του *CL.botulinum* χωρίς να περιέχει τοξίνη. Τοξίνη παράγεται μόνον όταν εκβλαστάνουν οι σπόροι και πολλαπλασιάζονται οι βλαστικές μορφές. Επίσης η παρουσία τοξίνης δεν συνοδεύεται απαραίτητα και από εμφανή αλλοίωση.

Ο χρόνος επώασης της αλλαντίασης κυμαίνεται από 8h μέχρι και λίγες ημέρες (μέσος όρος 18-36h). Στα αρχικά συμπτώματα στάδια μπορεί να παρατηρηθούν ναυτία, έμετος και διάρροια, αλλά ακολουθεί ίλιγγος, ξηρότητα και πόνος στο στόμα και το φάρυγγα, διαταραχές της όρασης και ομιλίας, παράλυση των φαρυγγικών μυών και ασφυξία.

Το *C. botulinum* χρησιμοποιείται ως δείκτης επαρκούς αποστείρωσης, καθώς καταστρέφεται μόνο από θέρμανση αρκετών λεπτών στους 121°C και αποτελεί το πλέον θερμοάντοχο παθογόνο βακτήριο. Αν και τα περισσότερα στελέχη είναι μεσόφιλα και δεν παράγουν τοξίνη υπό ψύξη, ο τύπος E (*C. botulinum* type E) είναι ψυχρότροφο βακτήριο και αναπτύσσεται στο ψυγείο. Το τελευταίο εμφανίζεται κυρίως σε θερμικώς επεξεργασμένα αλιεύματα.

Επίσης το όριο pH για την ανάπτυξη *C. botulinum* σε τρόφιμα είναι το 4,6 (συνεπώς σε όξινα τρόφιμα με $\text{pH} < 4,6$ δεν υπάρχει κίνδυνος αλλαντίασης)

Οι βουτιλικές τοξίνες είναι άκρως επικίνδυνο υλικό και αν καταποθεί, εισπνευθεί, ή διεισδύσει από το βλεννογόνο του οφθαλμού ή από το δέρμα (σε περίπτωση τραύματος), μπορεί να προκαλέσει θάνατο. Γι αυτό και ο χειρισμός τροφίμων που είναι ύποπτα για παρουσία *C. botulinum* απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή και αυστηρά μέτρα ασφαλείας. Η τοξίνη αυτή καταστρέφεται εύκολα με θέρμανση, ενώ το σπόρια των κλωστριδίων καταστρέφονται αποτελεσματικά κατά την απολύμανση με χλωρίνη.

Το *Clostridium perfringens* μπορεί να προκαλέσει μια εντερική τοξίνωση όταν τα βλαστικά κύτταρα ή τα σπόρια αυτών βρεθούν σε υψηλούς πληθυσμούς στα τρόφιμα (απαιτούνται συνήθως περισσότερα από 10^6 cfu/g τροφίμου). Η ασθένεια αυτή είναι λιγότερο επικίνδυνη από το βουτιλισμό και σπανίως θανατηφόρα, με συμπτώματα έντονης γαστρεντερίτιδας εντός 8-18 ωρών συνήθως. Η ανάπτυξη του αναστέλλεται σε θερμοκρασίες $< 15^\circ\text{C}$. Οι θερμοκρασίες κατάψυξης ελάχιστα επηρεάζουν τα σπόρια, αδρανοποιούν όμως τα βλαστικά κύτταρα του βακτηρίου. Το *Cl. perfringens* δεν αναπτύσσεται σε pH χαμηλότερο του 5,0 ή μεγαλύτερο του 9,0.

Άνθρωποι και ζώα είναι συνήθως παροδικοί φορείς του *C. perfringens* και σε πολλές περιπτώσεις η μόλυνση των τροφίμων προέρχεται από τους χειριστές τους. Επίσης διαδεδομένη είναι η μόλυνση των κρεάτων στα σφαγεία με *C. perfringens* που υπάρχει στο γαστερνετρικό σύστημα των ζώων. Επίσης τα κλωστρίδια (όπως όλα τα σπορογόνα βακτήρια) είναι διαδεδομένα στα καρυκεύματα. Τροφική δηλητηρίαση προκαλείται του *Cl. perfringens* που παράγουν εντεροτοξίνη.

Τα βασικά χαρακτηριστικά των κλωστριδίων που επηρεάζουν τις συνθήκες καλλιέργειας και απομόνωσής τους είναι αφενός ή απαίτηση για αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης (απουσία οξυγόνου), αφετέρου η παραγωγή υδρόθειου από την υδρόλυση πρωτεϊνών ή την αναγωγή του θειώδους νατρίου, το οποίο αντιδρά με άλας σιδήρου και παράγει θειούχο σίδηρο που χρωματίζει μαύρες τις αποικίες των βακτηρίων. Οι προδιαγραφές της νομοθεσίας αφορούν συνήθως τον ολικό πληθυσμό θειοαναγωγικών κλωστριδίων (που παράγουν υδρόθειο) και όχι ειδικά του *C. botulinum* ή του *C. perfringens*.

9.2. Μέθοδοι Αναερόβιας επώασης (αναεροβίωσης):

Οι μέθοδοι επίτευξης αναερόβιων συνθηκών καλλιέργειας (αναεροβίωσης) είναι:

A. Με αναερόβια συστήματα μιας χρήσης τύπου Gaspack.

Τα συστήματα αυτά είναι αεροστεγή δοχεία 12 ή περισσότερων θέσεων όπου τα τρυβλία τοποθετούνται μαζί ειδικούς φακέλους δέσμωσης του οξυγόνου και παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου (περιέχουν sodium bicarbonate και sodium borohydride, καθώς και παλλάδιο ως καταλύτη).

B. Με αναερόβιους θαλάμους CO₂

Είναι επωαστικοί θάλαμοι που είναι συνδεδεμένοι με φιάλη αζώτου ή CO₂ ή μίγματος αυτών, ώστε με την επιλογή του κατάλληλου μίγματος αερίων να εξασφαλίζονται αναερόβιες συνθήκες επώασης. Η συσκευή φέρει ιδιαίτερα ανθεκτικό μεταλλικό κάλυμμα, μανόμετρο και βαλβίδα πίεσης. Εναλλακτικά αν δεν υπάρχει διαθέσιμη παροχή CO₂ ή N₂, μπορούν να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες μέσα σε θάλαμο ή σε δοχεία με τη χρήση ενός κεριού, το οποίο θα ανάψει μέχρι να καταναλώσει το διαθέσιμο οξυγόνο και να σβήσει. Με αυτόν τον εμπειρικό τρόπο η ατμόσφαιρα που δημιουργείται έχει 5-10 % CO₂.

Γ. Με αναερόβιους δοκιμαστικούς σωλήνες

Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας κλωστριδίων (π.χ. για βιοχημικές δοκιμές) ή χρήσης υγρού ή στερεού υποστρώματος στη μέθοδο του πλέον πιθανού αριθμού (MPN), οι αναερόβιες συνθήκες επώασης μπορούν να επιτευχθούν αν πάνω από τη στοιβάδα του υγρού ή στερεού υποστρώματος προστεθούν λίγα ml αποστειρωμένης παραφίνης ή αποστειρωμένου άγαρ, ώστε να μην επιτρέπεται η είσοδος οξυγόνου στο υπόστρωμα.

9.3. Τεχνική προσδιορισμού κλωστριδίων σε τρόφιμα με χρήση στερεού υποστρώματος

Μετά από κατάλληλες αραιώσεις του δείγματος εμβολιάζουμε το δείγμα με ενσωμάτωση σε στερεό υπόστρωμα TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) agar, ή SPS (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine) agar και επωάζουμε στους 37° C για 48h σε αναερόβιο περιβάλλον. Μετά από επώαση καταμετρούμε τις μαύρες αποικίες που σχηματίζονται λόγω παραγωγής υδρόθειου (το οποίο αντιδρά με άλατα σιδήρου και παράγει μαύρο άλας θειούχου σιδήρου).

Σύσταση Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar

Tryptose	15,0g
Soytone	5,0g
Yeast Extract	5,0g
Sodium Disulfite	1,0g
Ammonium Iron (II) Citrate	1,0g
Agar	15,0g
D.W. q.s.p	1000,ml

Σημείωση: Για την εκλεκτική απομόνωση *C. perfringens* στο βασικό υπόστρωμα προστίθεται 1.0 ml αποστειρωμένου διαλύματος D-Cycloserine 4%.



Εικόνα 8. Αποικίες *Clostridium* σε TSC agar



Εικόνα 9. Ανίχνευση θειοαναγωγικών κλωστριδίων σε TSC agar (με παραφίνη)



Εικόνα 10. Δοχεία αναερόβιας επώασης τύπου Gaspack

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ SALMONELLA spp. ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

10.1 Εισαγωγή

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Είναι Gram – προαιρετικά αναερόβια, με ή χωρίς έλυτρο, συνήθως κινητά με βλεφαρίδες βακτηρίδια (εκτός των *S. pyllorum* και *S. gallinarum*, που είναι ακίνητες). Οι *S. typhi*, *S. paratyphi* και *S. gallinarum*, που παράγουν ένα ειδικό περίβλημα σαν έλυτρο. Οι Σαλμονέλλες δεν αποικοδομούν τη λακτόζη και τη σακχαρόζη. Παράγουν καταλάση και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 6° C έως 45° C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Αναπτύσσονται σε pH από 4,1 έως 9,0, ενώ η ελάχιστη τιμή ενεργότητας ύδατος (aw) για την ανάπτυξη των σαλμονελλών κυμαίνεται μεταξύ 0,94 και 0,95.

Τα πλέον διαδεδομένα είδη στα τρόφιμα είναι η *S. typhirinum* και *S. enteritidis*, ωστόσο όλα τα είδη του γένους *Salmonella* είναι τροφοπαθόγona, και συνολικά προκαλούν τα περισσότερα κρούσματα τροφικών ασθενειών σε σχέση με άλλα τροφοπαθόγona βακτήρια. Ο λόγος για αυτό είναι κυρίως η πολύ χαμηλή μολυσματική δόση που απαιτείται (1-100cfu/g αρκούν για να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση), και η ευρεία εξάπλωσή τους στο περιβάλλον. Επιπλέον, το γεγονός ότι πολλά τρόφιμα είναι δυνατόν να περιέχουν μεγάλο αριθμό σαλμονελλών χωρίς να παρουσιάζουν εμφανείς αλλοιώσεις. Παρά το χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας (αριθμός θανάτων/αριθμό κρουσμάτων) οι σαλμονέλλες είναι σε πολλές χώρες μια από τις πρώτες αιτίες θανάτων από τροφική δηλητηρίαση (κυρίως ανάμεσα σε ηλικιωμένους και παιδιά), καθώς προσβάλλουν πολλούς καταναλωτές. Λόγω όλων των παραπάνω, στην Ευρώπη και Αμερική έχουν θεσπιστεί πολύ αυστηρά όρια για τον έλεγχο των σαλμονελλών στα τρόφιμα, σύμφωνα με τα οποία η *Salmonella* πρέπει να απουσιάζει ανά 100g τροφίμου (πολιτική «μηδενικής ανοχής»). Αυτό σημαίνει ότι δεν μας ενδιαφέρει πόσα κύτταρα υπάρχουν σε ένα τρόφιμα, αλλά αν υπάρχει έστω και ένα κύτταρο ανά 25g τροφίμου. Συνεπώς ο προσδιορισμός σαλμονελλών δεν αφορά καταμέτρηση του πληθυσμού των κυττάρων αλλά ανίχνευση (παρουσία/απουσία) έστω και ενός κυττάρου.

Η διαδικασία ανίχνευσης περιλαμβάνει τα στάδια του (α) προεμπλουτισμού, όπου σε ένα μη εκλεκτικό υγρό θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται η αναζωογόνηση τυχόν τραυματισμένων-στρεσαρισμένων κυττάρων, (β) του εμπλουτισμού, όπου γίνεται ανακαλλιέργεια σε ένα εκλεκτικό υγρό υπόστρωμα ώστε να αποκλειστεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, και (γ) της επίστρωσης με τη μέθοδο streak των πιθανών αποικιών σε δύο διαφορετικά εκλεκτικά υποστρώματα, και εφόσον υπάρχουν ύποπτες αποικίες, στο τελικό στάδιο (δ) γίνονται οι απαραίτητες επιβεβαιωτικών αναλύσεις με βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές.

A. Μη εκλεκτικός εμπλουτισμός (Προεμπλουτισμός)

Ο **προεμπλουτισμός** αποβλέπει στην αναζωογόνηση και **επαναδραστηριοποίηση** των τραυματισμένων-στρεσαρισμένων κυττάρων σαλμονέλλων, που μπορεί να έχουν τραυματιστεί κατά τις διάφορες επεξεργασίες των τροφίμων (παστερίωση, συμπύκνωση, αφυδάτωση, κατάψυξη, ακτινοβολήση, χρήση προσθέτων, οξίνιση, υψηλή συγκέντρωση αλάτων-οσμωτική πίεση). Ο στόχος είναι να μπορέσουν στο επόμενο στάδιο να καταφέρουν να αναπυχθούν έστω και τραυματισμένα κύτταρα που ήταν ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα, έτσι ώστε τελικά να ανιχνευθούν, καθώς ακόμα και τραυματισμένα κύτταρα μπορεί στο ανθρώπινο έντερο να ανανήψουν και να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση. Κατά τη φάση προεμπλουτισμού τα κύτταρα αποκαθιστούν τυχόν κυτταρικές βλάβες, και αυτό δεν αφορά μόνο τις σαλμονέλες, αλλά και άλλη ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, καθώς το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται δεν είναι εκλεκτικό.

Το συνήθως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για τον προεμπλουτισμό είναι το Buffered Peptone water (BPW), ενώ εναλλακτικά χρησιμοποιείται το Lactose Broth

Σύνθεση BPW (g/l)

Peptone	10.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	3.5 g
Monopotassium Phosphate.....	1.5 g
pH 7.0	

Αποστείρωση στους 121° C για 15 min.

Η συνήθης αναλογία βάρους δείγματος εξεταζόμενου τροφίμου, προς τον όγκο του προεμπλουτιστικού υποστρώματος είναι : 25 g / 225 ml.

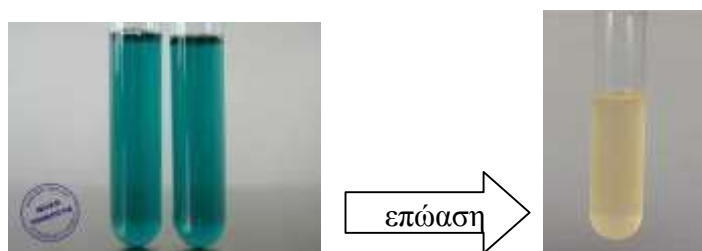
Συνθήκες επώασης: 35° C για 24 +/- 2h.

B. Εκλεκτικός εμπλουτισμός

Ο εμπλουτισμός αποβλέπει στην εκλεκτική αύξηση του αριθμού των σαλμονελλών, που υπάρχουν στο δείγμα του προϊόντος που εξετάζεται, εις βάρος της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας (π.χ. Coliforms, Proteus, Shigella, Pseudomonas) που περιορίζεται με τη χρήση ενός εκλεκτικού υποστρώματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ανασταλτικών ουσιών στο εμπλουτιστικό υγρό.

Για το στάδιο του εμπλουτισμού από το μπουκάλι με το υγρό προεμπλουτισμού μεταφέρεται 1ml σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9ml από το εμπλουτιστικό υπόστρωμα Rappaport-Vassiliadis Soya broth και αυτά ομογενοποιούνται σε αναδευτήρα vortex. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται καλός αερισμός της καλλιέργειας που βοηθάει την ανάπτυξη των σαλμονελλών. Εναλλακτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον εκλεκτικό εμπλουτισμό των σαλμονελλών είναι το Selenite Cystine (SC) Broth (όπου τα υπάρχοντα στο υπόστρωμα ιόντα Σεληνίου (Se) αναστέλλουν την ανάπτυξη των κολοβακτηριοειδών καθώς και των εντεροκοκκών) ή το Tetrathionate (TT) Broth-

(όπου οι σαλμονέλλες λόγω της ικανότητας τους να ανάγουν τα τετραθειονικά ιόντα αναπτύσσονται στο ανωτέρω υπόστρωμα σε αντίθεση με την ανταγωνιστική χλωρίδα, ενώ τα χολικά άλατα αναστέλλουν την ανάπτυξη μη εντερικών βακτηρίων)



Εικόνα 11. Rappaport Vassiliadis Soya Broth πριν και μετά από επώαση Salmonella

Γ. Προσδιορισμού με επίστρωση σε στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα

Στη φάση αυτή από τις καλλιέργειες εμπλουτισμού λαμβάνεται μικρή ποσότητα κυττάρων με αποστειρωμένο κρίκο επίστρωση και επιστρώνεται με τη μέθοδο streak σε δύο διαφορετικά εκλεκτικά στερεά υπόστρωματα σε τρυβλία. Αυτά είναι συνήθως το XLD agar και το Brilliant Green agar (εναλλακτικά αυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί το Salmonella-Shigella (SS) Agar ή το Bismouth Sulfite Agar. Ακολουθεί επώαση στους 35° C, για 24 +/- 2h και έλεγχος για παρουσία ύποπτων αποικιών.

Σύσταση XLD agar

Xylose.....	3.5 g
Phenol Red.....	0.08 g
L-Lysine.....	5.0 g
Sodium Desoxycholate.....	2.5 g
Lactose.....	7.5 g
Sodium Thiosulfate.....	6.8 g
Saccharose.....	7.5 g
Ferric Ammonium Citrate.....	0.8 g
Sodium Chloride.....	5.0 g
Agar.....	13.5 g
Yeast Extract.....	3.0 g

(Δεν αποστειρώνεται, γίνεται μόνο βρασμός πριν τη χρήση)



Εικόνα 12. Εμφάνιση αποικιών Salmonella σε XLD agar

Τα κύτταρα Salmonella σχηματίζουν στο XLD agar μαύρες (λόγω παραγωγής υδρόθειου) ή ρόζ ημιδιαφανείς ή αδιαφανείς αποικίες ενώ το υπόστρωμα που τις περιβάλλει έχει χρώμα σκούρο ροζ (φούξια). Το υπόστρωμα περιέχει χολικά άλατα και θειθειικό νάτριο για την αναστολή της ανταγωνιστικής χλωρίδας. Τα βακτήρια που αποικοδομούν τη λακτόζη ή τη σακχαρόζη σχηματίζουν κιτρινοπράσινες αποικίες. Σε περίπτωση που το υπόστρωμα κιτρινίσει το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ως προς την παρουσία Salmonella.

Σύσταση Brilliant Green Agar

Yeast Extract	3,0 g
Beef Extract	5,0 g
Peptone	10,0 g
Di-sodium Hydrogen Phosphate	1,0 g
Sodium Hydrogen Phosphate	0,5 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Phenol Red	0,09 g
Brilliant Green	0,047 g
Agar	12,0 g
D.W. q.s.p	1000,0 ml

(Δεν αποστειρώνεται)



Εικόνα 13. Εμφάνιση αποικιών Salmonella σε Brilliant Green agar

Τα βακτήρια του γένους Salmonella σχηματίζουν άχρωμες ή ροζ, ημιδιαφανείς ή αδιαφανείς αποικίες στο Brilliant Green agar ενώ το υπόστρωμα που τις περιβάλλει έχει χρώμα ροζ προς το κόκκινο. Επειδή το υπόστρωμα περιέχει Brilliant Green, αναστέλλεται η ανάπτυξη των Gram + βακτηρίων, των κολοβακτηριοειδών και στελεχών του γένους Proteus. Και σε αυτή την περίπτωση, αν το υπόστρωμα κιτρινίσει το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ως προς την παρουσία Salmonella.

Στο SS agar οι αποικίες των σαλμονελλών στο ανώτερο υπόστρωμα εμφανίζονται άχρωμες ή με ανοιχτό ροζ χρώμα, αδιάφανες, ημιδιάφανες ή διαφανείς. Πολλά στελέχη σχηματίζουν αποικίες με μαύρο κέντρο (παραγωγή H₂S). Η Ανάπτυξη των gram+ βακτηρίων αναστέλλεται, λόγω της περιεκτικότητας στο υπόστρωμα Brilliant Green Agar αλάτων θειοθειικών και κιτρικών ιόντων.

Στο Bismuth Surfite Agar οι αποικίες των σαλμονελλών έχουν χρώμα καφέ ή μαύρο και σε ορισμένες περιπτώσεις περιβάλλονται από μαύρο ίζημα με μεταλλική λάμψη. Το υπόστρωμα γύρω από την αποικία αρχικά έχει καφέ χρώμα, που μετατρέπεται σε μαύρο με την πρόοδο της επώασης. Το Brilliant Green Agar και τα ιόντα βισμούθιου (Bi), που περιέχονται στο υπόστρωμα, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των Gram+ βακτηρίων, των κολοβακτηριοειδών και στελεχών του γένους Proteus.

Δ. Φάση Επιβεβαίωσης και Ταυτοποίησης

Οι χαρακτηριστικές (ύποπτες) αποικίες Salmonella που απομονώνονται από τα παραπάνω στερεά υποστρώματα σε τρυβλία μελετώνται με βάση τις παρακάτω βιοχημικές ή ανοσολογικές δοκιμές, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για στελέχη του γένους Salmonella.

Οι δοκιμές αυτές είναι :

- 1) δοκιμή παραγωγής οξέος (από την αποικοδόμηση της γλυκόζης) αποτέλεσμα θετικό.
- 2) Δοκιμή παραγωγής αερίου (από την αποικοδόμηση της γλυκόζης) αποτέλεσμα θετικό
- 3) Δοκιμή αποικοδόμησης της υδροθείου / αποτέλεσμα θετικό
- 4) Δοκιμή αποικοδόμησης λακτόζης/ αποτέλεσμα αρνητικό
- 5) Δοκιμή αποικοδόμησης σακχαρόζης/ αποτέλεσμα αρνητικό
- 6) Δοκιμή διάσπασης της ουρίας/ αποτέλεσμα αρνητικό

- 7) Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης/ αποτέλεσμα θετικό
- 8) Αντίδραση β-γαλακτοξιδάσης: αποτέλεσμα αρνητικό
- 9) Δοκιμή Voges-Proskauer/ αποτέλεσμα αρνητικό
- 10) Δοκιμή παραγωγής ινδόλης/ αποτέλεσμα αρνητικό.

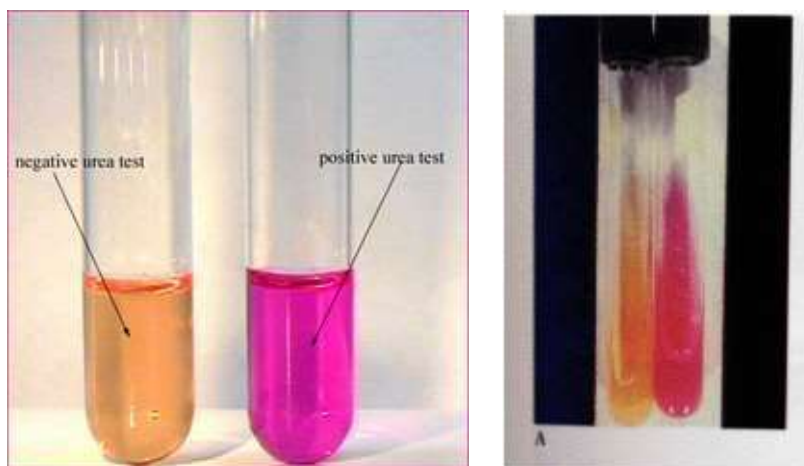
Αν οποιαδήποτε από τις παραπάνω δοκιμές δώσει αρνητικό αποτέλεσμα, τότε το δείγμα θεωρείται ότι δεν έχει *Salmonella*.

Οι πρώτες 5 δοκιμές γίνονται ταυτόχρονα με επίστρωση μιας ύποπτης αποικίας σε κεκλιμένο Triple Sugar Iron (TSI) agar το οποίο περιέχει τα τρία σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη, λακτόζη) από τα οποία η *Salmonella* αποικοδομεί μόνο τη γλυκόζη, με ή χωρίς παραγωγή αερίου, με ή χωρίς σχηματισμό μαύρου χρώματος (λόγω παραγωγής υδρόθειου).



Εικόνα 14. Κεκλιμένο TSI agar, όπου η *Salmonella* (2^{ος} και 3^{ος} σωλήνας) εμφανίζει κόκκινη κεκλιμένη επιφάνεια (αδυναμία αποικοδόμησης λακτόζης-σακχαρόζης) και κίτρινο πυθμένα (αποικοδόμηση γλυκόζης) ή μαύρο πυθμένα (παραγωγή υδρόθειου). Οι υπόλοιποι σωλήνες δεν αντιστοιχούν σε κύτταρα *Salmonella*.

Η δοκιμή διάσπασης της ουρίας (παραγωγή ουρεάσης) γίνεται με επίστρωση ύποπτης αποικίας σε κεκλιμένο Urea agar. Η δημιουργία φουξ χρωματισμού είναι ενδεικτική της παραγωγής ουρεάσης (π.χ. από βακτήρια *Proteus*), ενώ η σαλμονέλλα δίνει αρνητική αντίδραση με πορτοκαλοκίτρινο χρωματισμό του υποστρώματος (ουσιαστικά χωρίς αλλαγή του αρχικού χρώματος)



Εικόνα 15. Αρνητικό και θετικό αποτέλεσμα καλλιέργειας σε Urea agar.

Σε γενικές γραμμές ο συνδυασμός των επιβεβαιωτικών δοκιμών σε TSI agar και Urea agar δίνει ένα ασφαλές αποτέλεσμα για την παρουσία ή απουσία *Salmonella* σε τρόφιμα.

B. ορολογικές- δοκιμές

Η παρουσία των **αντιγόνων O.Vi ή H** των σαλμονελλών εξετάζεται με **οροσυγκόλληση**, χρησιμοποιώντας τεστ οροσυγκόλλησης (latex test) όπου έτοιμα αντιδραστήρια με αντισώματα για Σαλμονελλα ενώνονται δημιουργώντας πήγμα με αντιγόνα από κύτταρα σαλμονελλών (εμφάνιση συσσωματωμάτων σύμφωνα με την παρακάτω εικόνα). Τα θετικά δείγματα είναι αυτά όπου εμφανίζεται οροσυγκόλληση.



Εικόνα 16: Αριστερά αρνητική οροσυγκόλληση και δεξιά θετική οροσυγκόλληση *Salmonella* σε latex test.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Χίνη, Θ., Τύμπης, Δ., και Πετράκης, Ε., (2006). “Εργαστηριακές Ασκήσεις Μικροβιολογίας Τροφίμων”. ΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα.
2. Καραγκούνη-Κύρτσου Αμαλία, (2012), Γενική Μικροβιολογία Εκδόσεις Σταμούλη.
3. Αγγελής Γεώργιος, (2007), Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία Εκδόσεις Σταμούλης.
4. George J. Jachson, BAM Coordinator, A.O.A.C. International USA (1998) Bacteriological Analytical Manual (BAM).
5. Carl Vanderzant and Don F. Splittstoesser, (1992) Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health, USA
6. Ted R. Johnson and Christine L. Case (1998), Laboratory Experiments in Microbiology, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, USA
7. Wilkie F. Harrigan, (1998), Laboratory Methods in Food Microbiology, Academic Press, USA
8. L. Jack Bradshaw, (1992), Laboratory Microbiology, Saunders College Publishing, USA
9. Merck, (2000), Microbiology Manual, Germany
10. C.H. Collins, Patricia M. Lyne and J.M Grange, (1995), Microbiological Methods, Butterworth- Heinemann Ltd, U.K.
11. James G. Cappuccino and Natalie Sherman, (1996), Microbiology A Laboratory Manual, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, USA.
12. S.J Forsythe, (2000), The Microbiology Of Safe Foods, Blackwell Science, U.K
13. Π. Κοτζεκίδου-Ρούκα, (1993), Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων, Εκδόσεις ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.
14. Σ. Κολαής, Α. Σιβροπούλου 2001. Ασκήσεις Μικροβιολογία. University Studio Press, Θεσ/νίκη