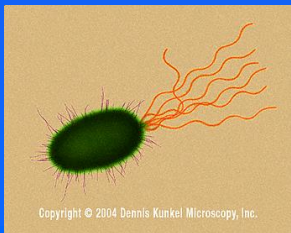


# Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

### Μέθοδος προσδιορισμού μικροβιακού φορτίου

Όλγα Παπαδοπούλου - Πασχαλίτσα Τρυφίνοπούλου - Αναστάσιος Σταματίου



# Τρόποι έκφρασης του μικροβιακού φορτίου

Συνολικά υπάρχουν τρεις τρόποι έκφρασης του μικροβιακού φορτίου

1. Ο **συνολικός αριθμός (total counts)** που περιλαμβάνει την απαρίθμηση όλων των μικροβιακών κυττάρων είτε είναι ζωντανά είτε νεκρά
2. Ο **συνολικός αριθμός ζώντων μικροοργανισμών (total viable counts)**
3. Ο **συνολικός αριθμός μικροοργανισμών ικανών να σχηματίσουν αποικίες (colony forming units)**

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι περιπτώσεις 2 και 3 δεν είναι ίδιες για τους παρακάτω λόγους:

1. Όλοι οι ζωντανοί μικροοργανισμοί δεν σχηματίζουν αποικίες στις συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιούμε, π.χ. θρεπτικό υπόστρωμα, συνθήκες επώασης, συνθήκες αερισμού, κλπ. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται ως ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα (viable but non culturable).
2. Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να έχουν υποστεί καταπόνηση (sub-lethal stress) με αποτέλεσμα να διατηρούν τη ζωτικότητά τους χωρίς όμως να μπορούν να σχηματίσουν αποικίες.

# Δειγματοληψία

Η απαρτίθμηση του ακριβούς αριθμού των μικροοργανισμών στα τρόφιμα καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος του τροφίμου

Το δείγμα που θα αναλυθεί θα πρέπει:

1. Να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο αντιπροσωπευτικό του τροφίμου
2. Να μην επιμολύνεται κατά τη διαδικασία της παραλαβής του (ασηπτικές συνθήκες)
3. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ δειγματοληψίας και αναλύσεως να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος για να μην μεταβληθεί ο μικροβιακός πληθυσμός

Πριν γίνει δειγματοληψία θα πρέπει να προηγηθεί πλήρης ανάμειξη του τροφίμου στην περίπτωση όπου αυτό είναι ρευστό.

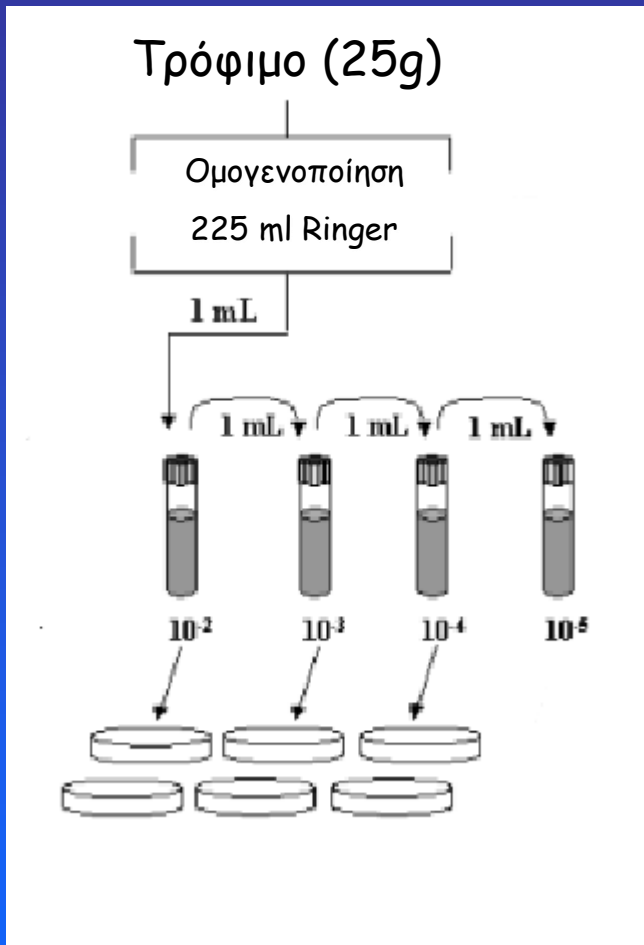
Στην περίπτωση όπου το δείγμα είναι στερεό, θα πρέπει αυτό να ομογενοποιηθεί με τη βοήθεια ενός υγρού μέσου, ώστε να σχηματιστεί εναιώρημα, στον όγκο του οποίου θα είναι πρακτικά ομοιόμορφη η κατανομή των μικροοργανισμών.

# Μέσα εναιώρησης ή διασποράς

1. **Φυσιολογικό αλατούχο διάλυμα (saline):** Είναι διάλυμα 0,85% NaCl σε νερό και έχει οσμωτική πίεση ίδια με αυτή του αίματος των θηλαστικών. Χρησιμοποιείται για εναιώρηση κυττάρων αίματος αλλά και μικροοργανισμών
2. **Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered saline, PBS):** Έχει pH 7,3, είναι γενικής χρήσης και περιέχει σημαντικά για τη φυσιολογία του κυττάρου ιόντα καλίου και φωσφορικά ιόντα
3. **Διάλυμα Ringer:** Είναι μέσο διασποράς γενικής χρήσης που αποτελείται από
  - NaCl  $9 \text{ g L}^{-1}$
  - KCl  $0,042 \text{ g L}^{-1}$
  - CaCl<sub>2</sub>  $0,48 \text{ g L}^{-1}$
  - NaHCO<sub>3</sub>  $0,20 \text{ g L}^{-1}$
4. **Πεπτονούχο ύδωρ (peptone water):** Περιέχει 0,1% πεπτόνη σε νερό. Το μέσο αυτό μειονεκτεί έναντι των άλλων διότι εάν η δειγματοληψία δεν γίνει αμέσως τότε παρατηρείται πολλαπλασιασμός μικροοργανισμών στο μέσο.

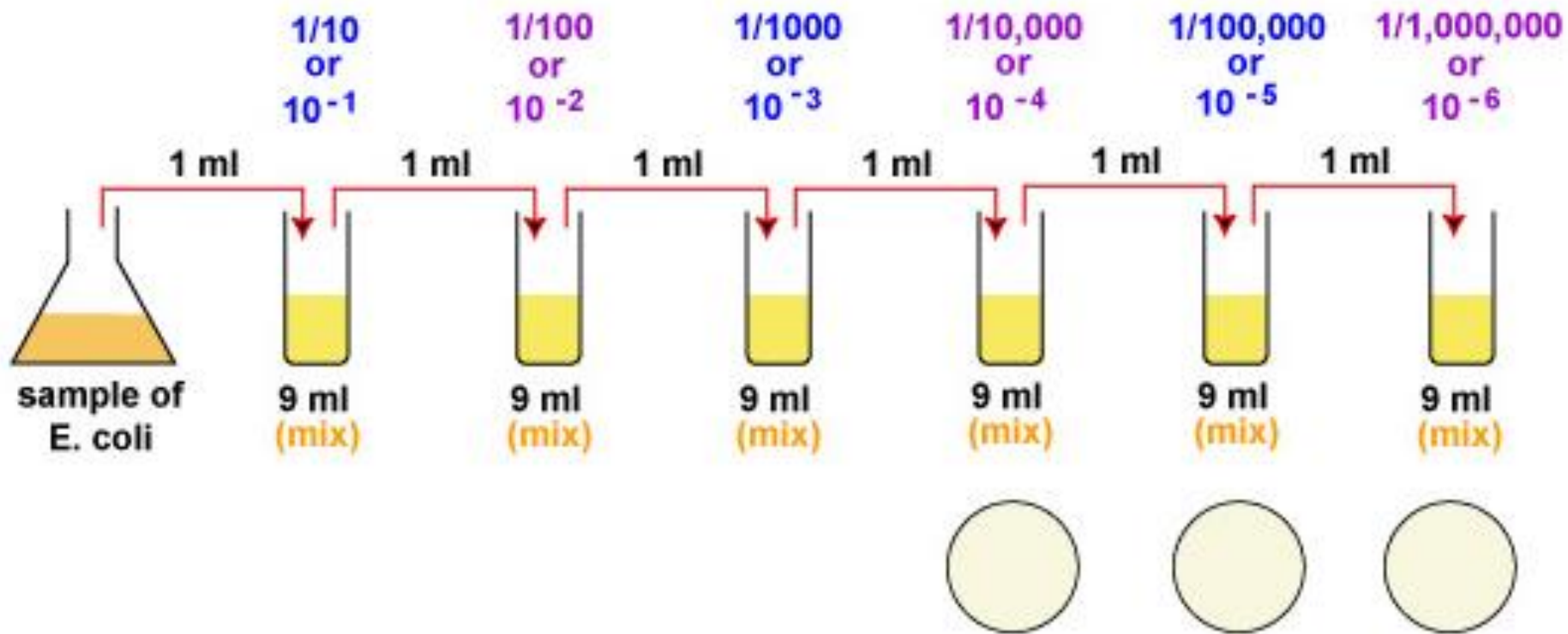
# Τεχνικές μέτρησης του μικροβιακού πληθυσμού στα τρόφιμα

## Μέθοδος δεκαδικών αραιώσεων



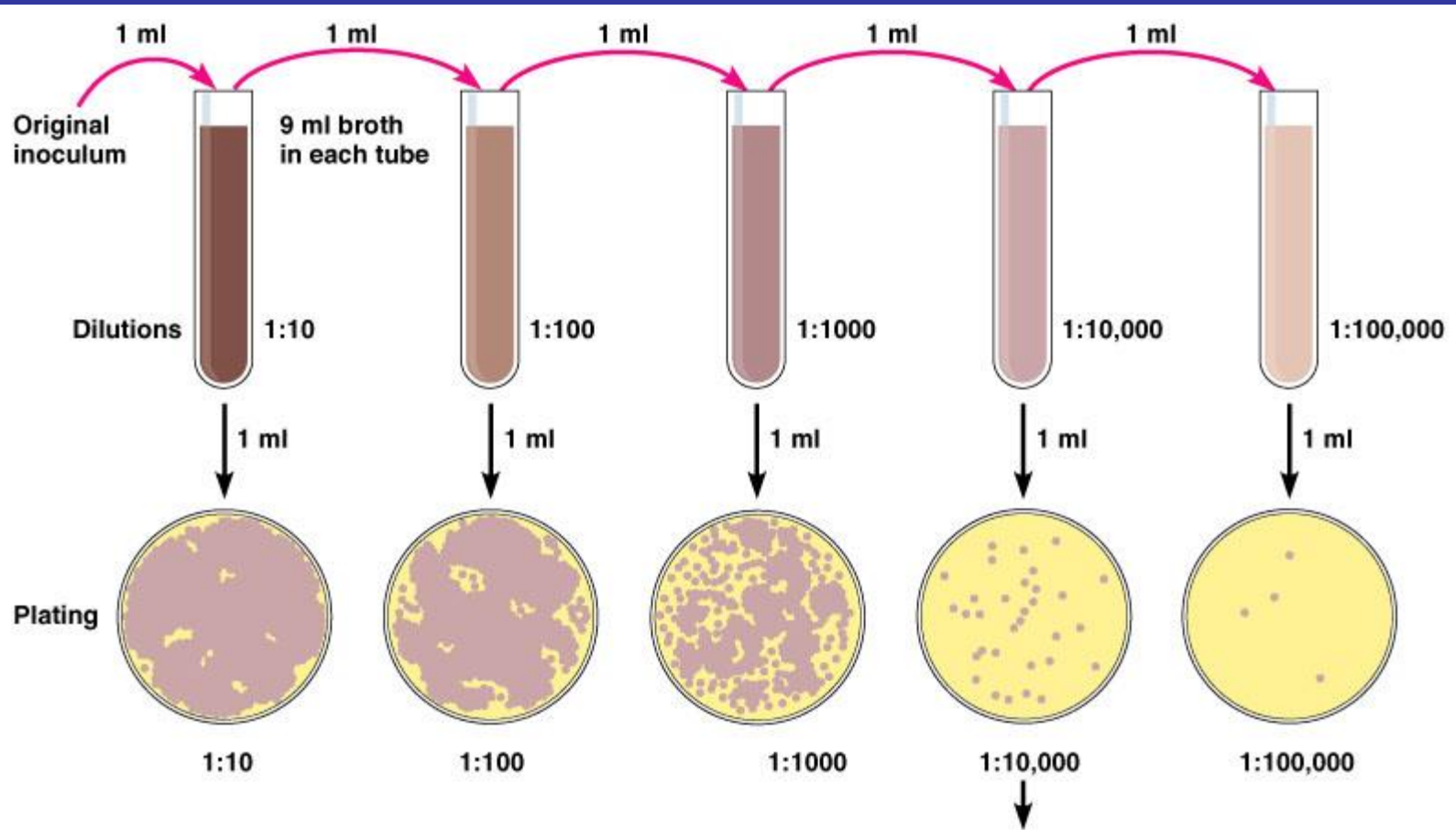
Είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως παρά τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει όπως:

- Έχει μεγάλες απαιτήσεις σε υλικά και ανθρώπινο δυναμικό (*labour intensive method*)
- Οι πολλές αραιώσεις αυξάνουν τον κίνδυνο επιμόλυνσης από μικροοργανισμούς του αέρα (*airborne microorganisms*) παρά τις ασηπτικές συνθήκες που εφαρμόζονται
- Τα στατιστικά σφάλματα μπορεί να είναι μεγάλα, για το λόγο αυτό απαιτούνται 3-5 επαναλήψεις της πειραματικής διαδικασίας



Επειδή, κάθε καλλιέργεια μικροοργανισμών ή τρόφιμο μπορεί να περιέχει από χίλια έως εκατοντάδες εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα ανά όγκο, ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται μία διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, να σχηματίζουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων.

# Τεχνική της επίστρωσης - spread plating



**Calculation: Number of colonies on plate  $\times$  reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml**  
(For example, if 32 colonies are on a plate of  $1/10,000$  dilution, then the count is  $32 \times 10,000 = 320,000/\text{ml}$  in sample.)

# Ο εμβολιασμός του βακτηριακού εναιωρήματος στο θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται με δύο ποσοτικές τεχνικές

## Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plating)



Αφορά στην εξάπλωση γνωστού όγκου (0,1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό. Εφαρμόζεται στους **αερόβιους μικροοργανισμούς**.



## Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plating)

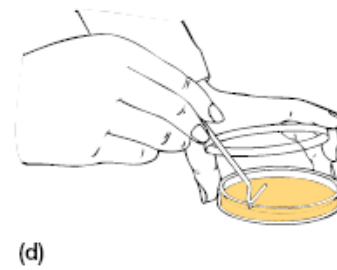
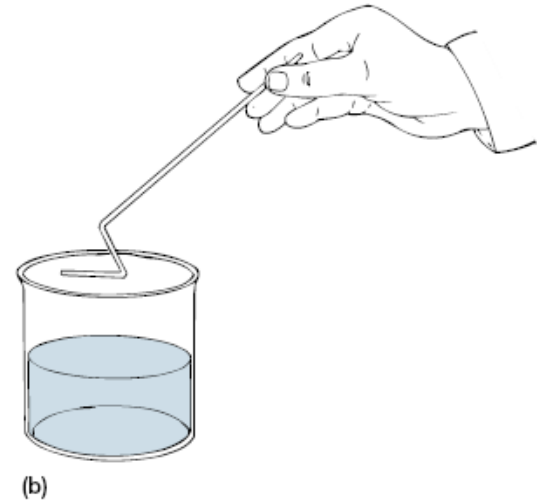
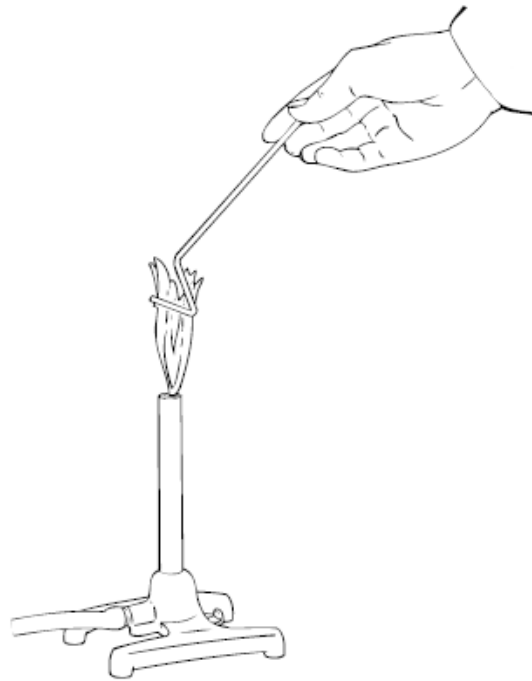
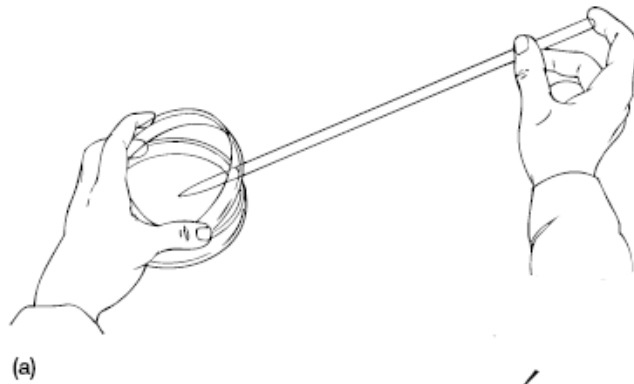


Αφορά στην εξάπλωση γνωστού όγκου (1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε τρυβλίο χωρίς θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολουθεί προσθήκη του υποστρώματος που περιέχει άγαρ σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία 42-45°C και στερεοποίηση του υποστρώματος. Εφαρμόζεται σε **μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς**.

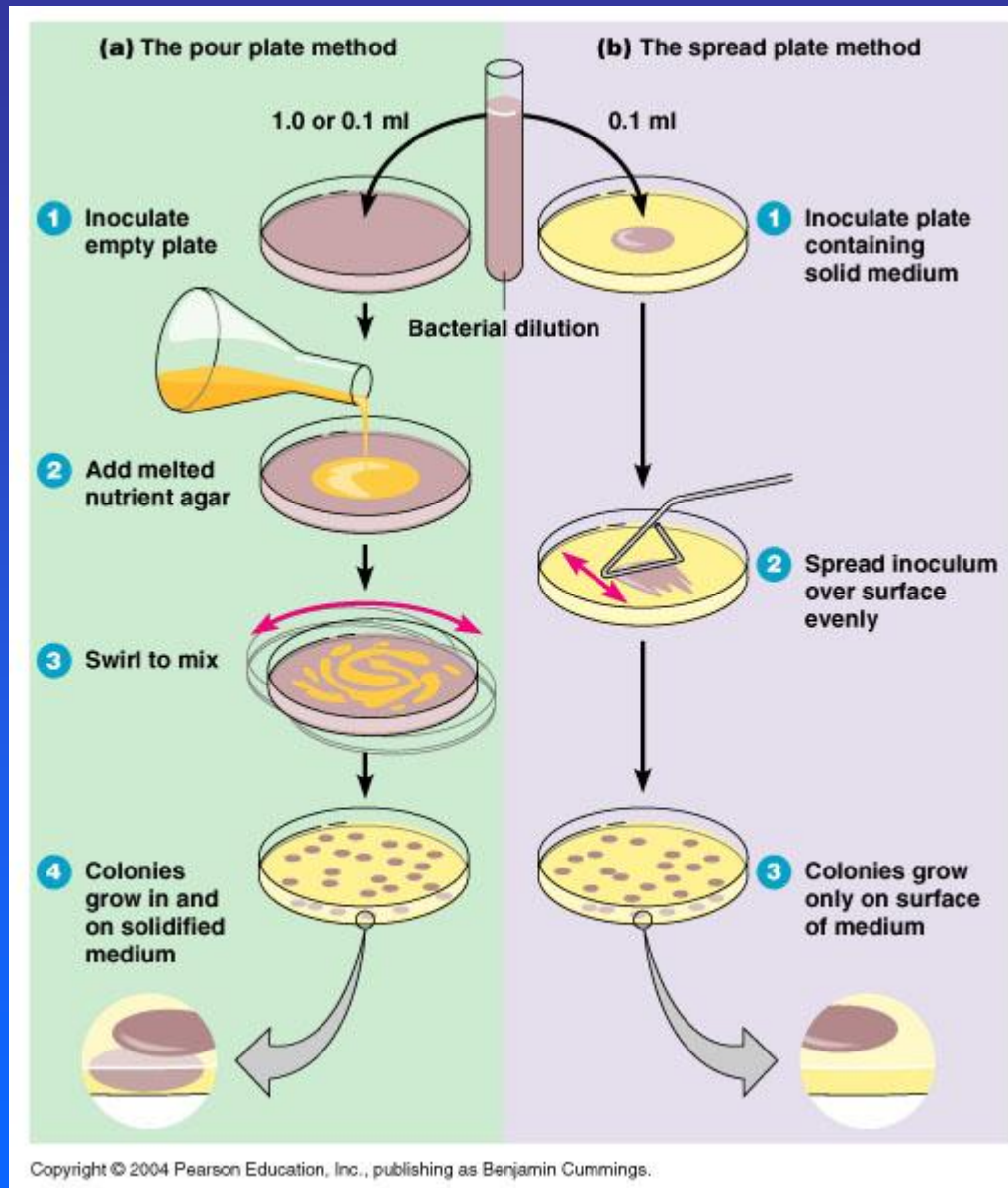




# Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης - spread plating



# Τεχνική της ενσωμάτωσης - pour plating



## Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plating)



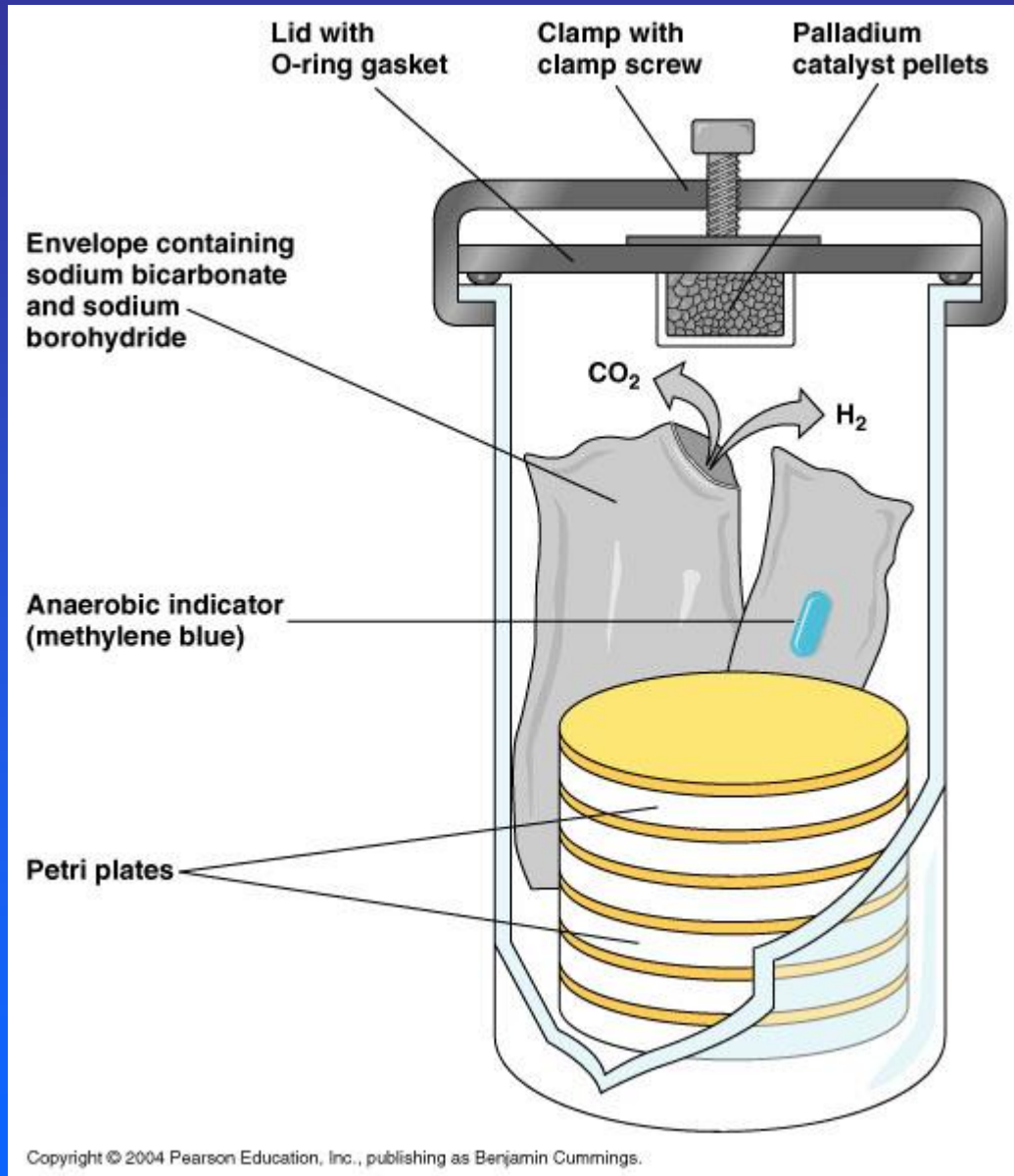
- PCA:** Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα
- CFC:** Ψευδομονάδες
- STAA:** *Brochothrix thermosphacta*
- RBC:** Ζύμες/Μύκητες
- Επίωση:** 25°C για 48-72 ώρες

## Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plating)



- MRS:** Γαλακτικά βακτήρια (25°C για 48-72 ώρες)
- VRBGA:** Εντεροβακτήρια (37°C για 24 ώρες)

# Επίωση των τρυβλίων σε αναερόβιες συνθήκες



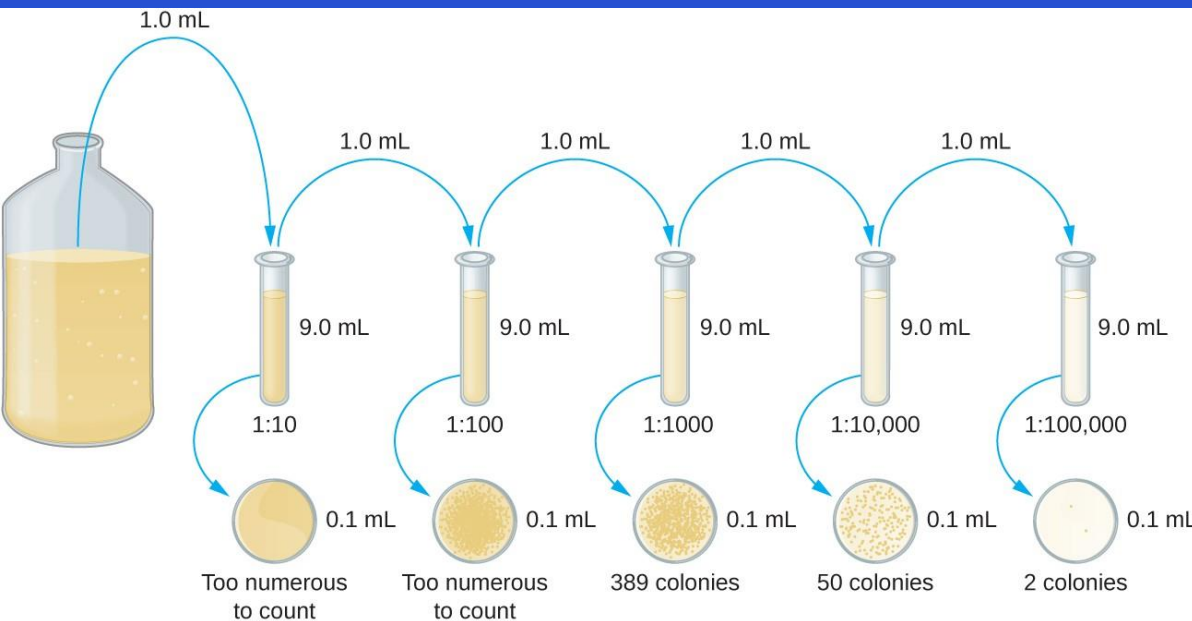
# Πειραματική διαδικασία



Προετοιμασία & κωδικοποίηση  
τρυβλίων



Stomacher, 1min



Διαδοχικές αραιώσεις & εμβολιασμός τρυβλίων



Επάση τρυβλίων