



# Μικροβιολογία Τροφίμων I

## Εργαστήριο

### Ενότητα 2:

### Μικροβιολογικά Θρεπτικά Υποστρώματα, 2ΔΩ

Τμήμα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Του Ανθρώπου

Διδάσκοντες: Ευστάθιος Ζ. Πανάγου

Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου

Αναστάσιος Σταματίου



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ





# Μαθησιακοί Στόχοι

- Η εξοικείωση των φοιτητών με την προετοιμασία και χρήση συνθετικών εργαστηριακών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στη μικροβιολογία τροφίμων για την απαρίθμηση μικροοργανισμών.



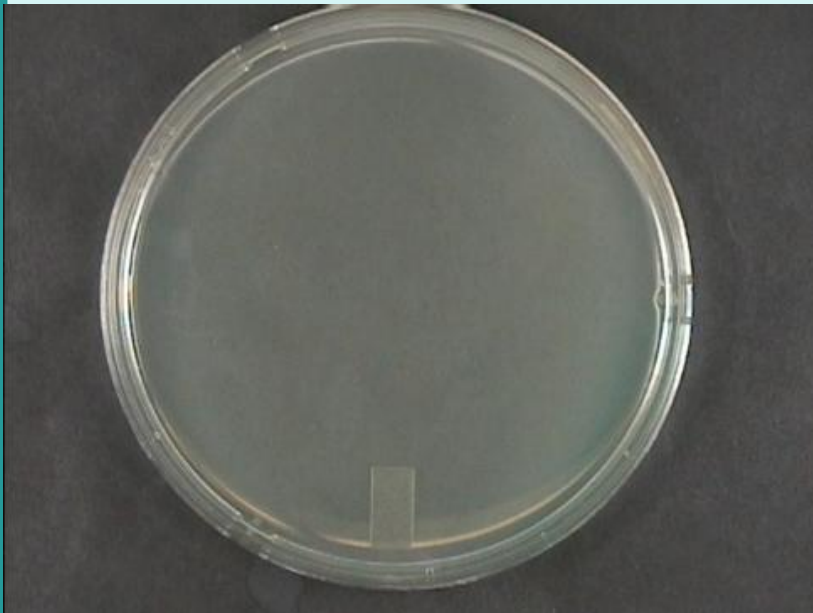
# Λέξεις Κλειδιά

- Μικροβιολογικά υποστρώματα
- Μέθοδοι αποστείρωσης



# Μικροβιολογικά Θρεπτικά Υποστρώματα – Ορισμός 1/2

- Κάθε υγρό ή στερεό μέσο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καλείται θρεπτικό υπόστρωμα.



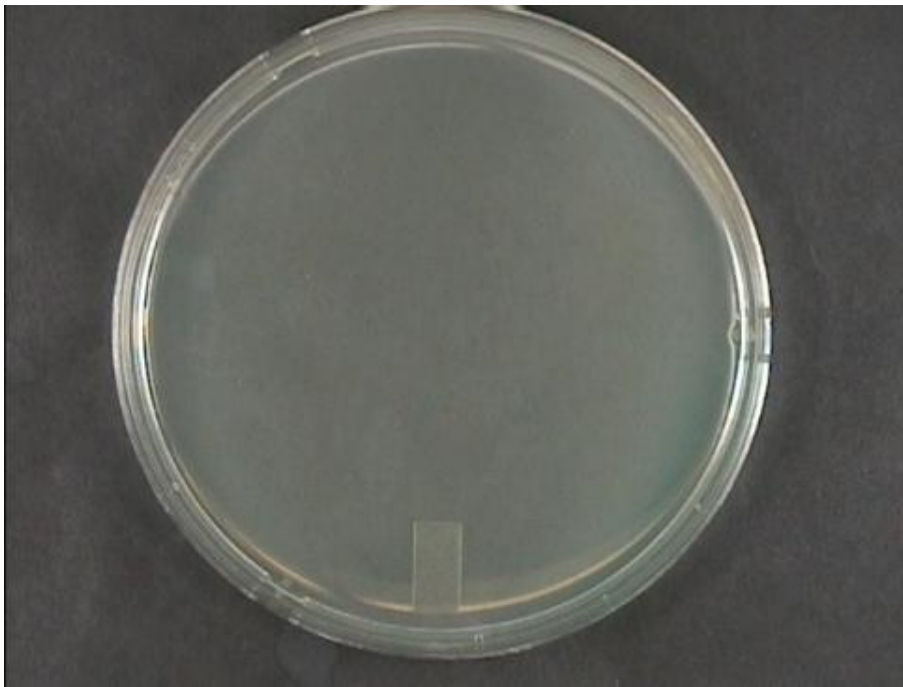
**Πηγή άνθρακα:** Κυρίως μονο- και δι-σακχαρίτες και σπανιότερα ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

**Πηγή αζώτου:** Μπορεί να είναι ανόργανη (αμμωνιακά άλατα), ή οργανική (πεπτόνη, τρυπτόνη)



# Μικροβιολογικά Θρεπτικά Υποστρώματα – Ορισμός 2/2

**Βιταμίνες:** Ως δομικά συστατικά διαφόρων ενζύμων, π.χ. Βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη.



**Ιχνοστοιχεία:** Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Co, κλπ

**Ανόργανα άλατα:** π.χ. άλατα νατρίου, καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου. Επίσης φωσφορικά άλατα.



# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρωμάτων – I 1/3

**Υγρά  
υποστρώματα**

**Στερεά  
υποστρώματα**

- Για την παρασκευή των στερεών υποστρωμάτων θα πρέπει να προστεθεί ένας πηκτικός παράγοντας που ονομάζεται άγαρ.



# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρωμάτων – I 2/3

- Το άγαρ παρουσιάζει τις παρακάτω ιδιότητες:
  1. Είναι ουδέτερο συστατικό και δεν επιδρά στη φυσιολογία του μικροοργανισμού.
  2. Δεν υδρολύεται από τους μικροοργανισμούς.
  3. Χρησιμοποιείται σε περιεκτικότητα 1,2-1,5%. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα παρεμποδίζει την ανάπτυξη λόγω μείωσης της τιμής της ενεργότητας ύδατος.



# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρωμάτων – I 3/3

- Το άγαρ παρουσιάζει τις παρακάτω ιδιότητες:
  4. Ρευστοποιείται σε βραστό νερό, ενώ σε θερμοκρασία 40°C ή χαμηλότερα στερεοποιείται.
  5. Παραμένει ρευστό σε θερμοκρασία >40-45°C.
  6. Όταν χρησιμοποιείται για εμβολιασμό θα πρέπει να έχει θερμοκρασία 45-47°C για να μην θανατωθούν οι μικροοργανισμοί.





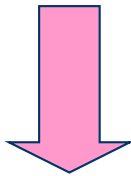
# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρωμάτων

- Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηκτικός παράγοντας η ζελατίνη, η οποία όμως παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα σε σχέση με το άγαρ:
  1. Προστίθεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα (12-15%).
  2. Επηρεάζεται από το χαμηλό pH και συχνά υδρολύεται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα των μικροοργανισμών.
  3. Ρευστοποιείται σε θερμοκρασία  $> 25^{\circ}\text{C}$ . Συνεπώς συνδυασμός χαμηλού pH και υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση.



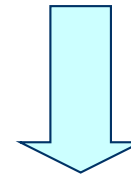
# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρώματων – II

## Φυσικά υποστρώματα



Δεν γνωρίζουμε ακριβώς τη σύνθεση, λαμβάνονται από τη φύση, χυμός τομάτας, εκχυλίσματα φρούτων, κλπ.

## Συνθετικά υποστρώματα



Παρασκευάζονται στο εργαστήριο ή στη βιομηχανία και γνωρίζουμε πλήρως τη σύνθεση, π.χ. MacConkey Agar.



# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρώματων – III 1/3

## Γενικά υποστρώματα

## Εξειδικευμένα υποστρώματα

- Τα γενικά ή μη επιλεκτικά υποστρώματα περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη όλων σχεδόν των μικροοργανισμών. Τυπικό παράδειγμα είναι το Nutrient agar ή broth που αποτελείται από εκχύλισμα κρέατος και πεπτόνη.



# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρωμάτων – III (2/3)

Τα εξειδικευμένα υποστρώματα χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και απαρίθμηση ορισμένων κατηγοριών μικροοργανισμών. ΔΗΛΑΔΗ η σύνθεσή τους δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των άλλων μικροοργανισμών. Αυτό επιτυγχάνεται με:

- τη διόρθωση του pH στο υπόστρωμα
- την προσθήκη αντιβιοτικών που αναστέλλουν τη δράση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών
- την προσθήκη ουσιών που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση διαφορετικών αποικιών μεταξύ τους



# Κατηγορίες Θρεπτικών Υποστρωμάτων – III 3/3

## Εξειδικευμένα υποστρώματα

Επιλεκτικά (elective): τα οποία ικανοποιούν τις απαιτήσεις μίας ή περισσότερων ομάδων βακτηρίων χωρίς να παρεμποδίζουν όμως τελείως άλλες ομάδες.

Εκλεκτικά (selective): τα οποία περιέχουν έναν ή περισσότερους παρεμποδιστικούς παράγοντες, οι οποίοι επιτρέπουν την ανάπτυξη της ομάδας που θέλουμε να απομονώσουμε.



# Παράδειγμα Επιλεκτικού Υποστρώματος

MRS agar26

ρΗ Διορθωμένο	Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται
8	<i>Carnobacterium</i> spp.
7	Στρεπτόκοκκοι
<5.7	Οξυάντοχα γαλακτικά βακτήρια
<5.7	Ζύμες



# Παράδειγμα Εξειδικευμένων Υποστρωμάτων –Εκλεκτικά 1/2

Υλικό	Ουσία	Μικρ/σμοί που αναπτύσσονται	Μορφολογία αποικιών
Baird-Parker Agar Base	Egg-yolk emulsion	<i>S. Aureus</i> Micrococci	Μαύρες αποικίες με δακτύλιο Μαύρες αποικίες χωρίς δακτύλιο
Violet Bile Salt Dextrose Agar Base	Crystal violet Bile salts	Enterobacteriaceae	Μώβ αποικίες με δακτύλιο
Tributyryn Agar Base	Glycerol tributyrate	Λιπολυτικοί	Αποικίες με δακτύλιο



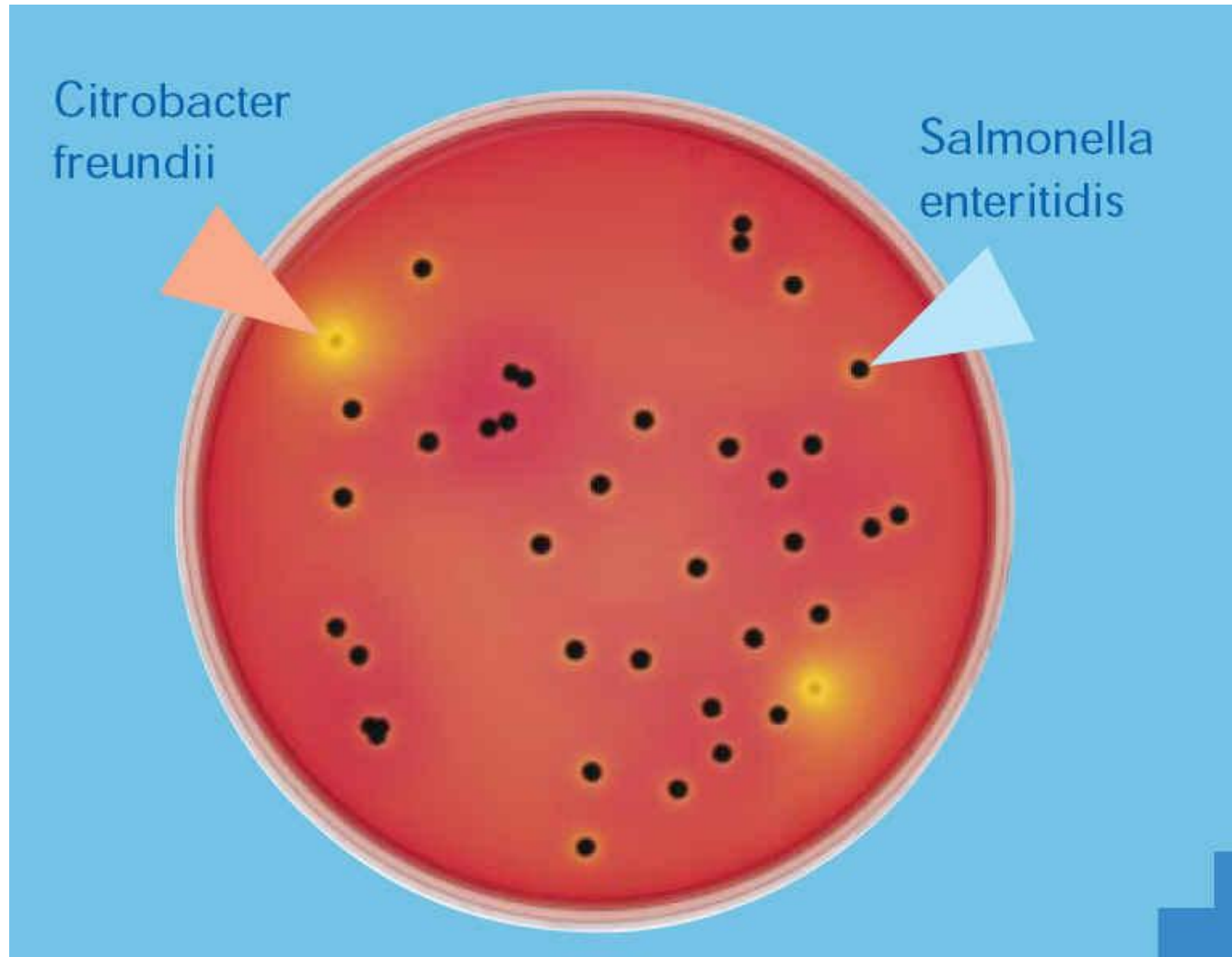
# Παράδειγμα Εξειδικευμένων Υποστρωμάτων –Εκλεκτικά 2/2

Υλικό	Αντιβιοτικό	Μικρ/σμοί που αναπτύσσονται
Pseudomonas agar base	Cetrimide Fusidin Cephaloridine	Ψευδομονάδες
STAA agar base	Streptomycin sulphate Thallos acetate Cycloheximide	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
Rose Bengal agar base	Chloramphenicol	Ζύμες/Μύκητες





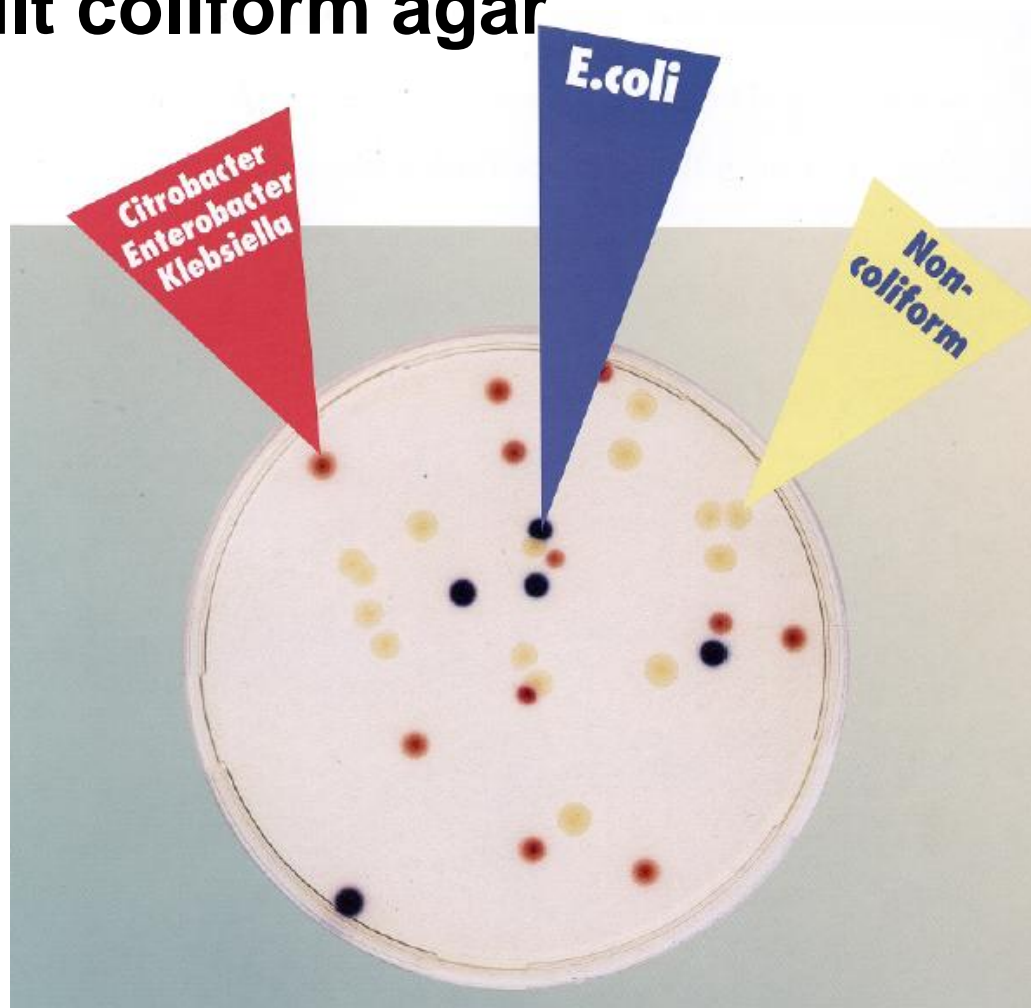
# Παράδειγμα Εξειδικευμένων Υποστρωμάτων - ΧLT4





# Παράδειγμα Εξειδικευμένων Υποστρωμάτων 1/2

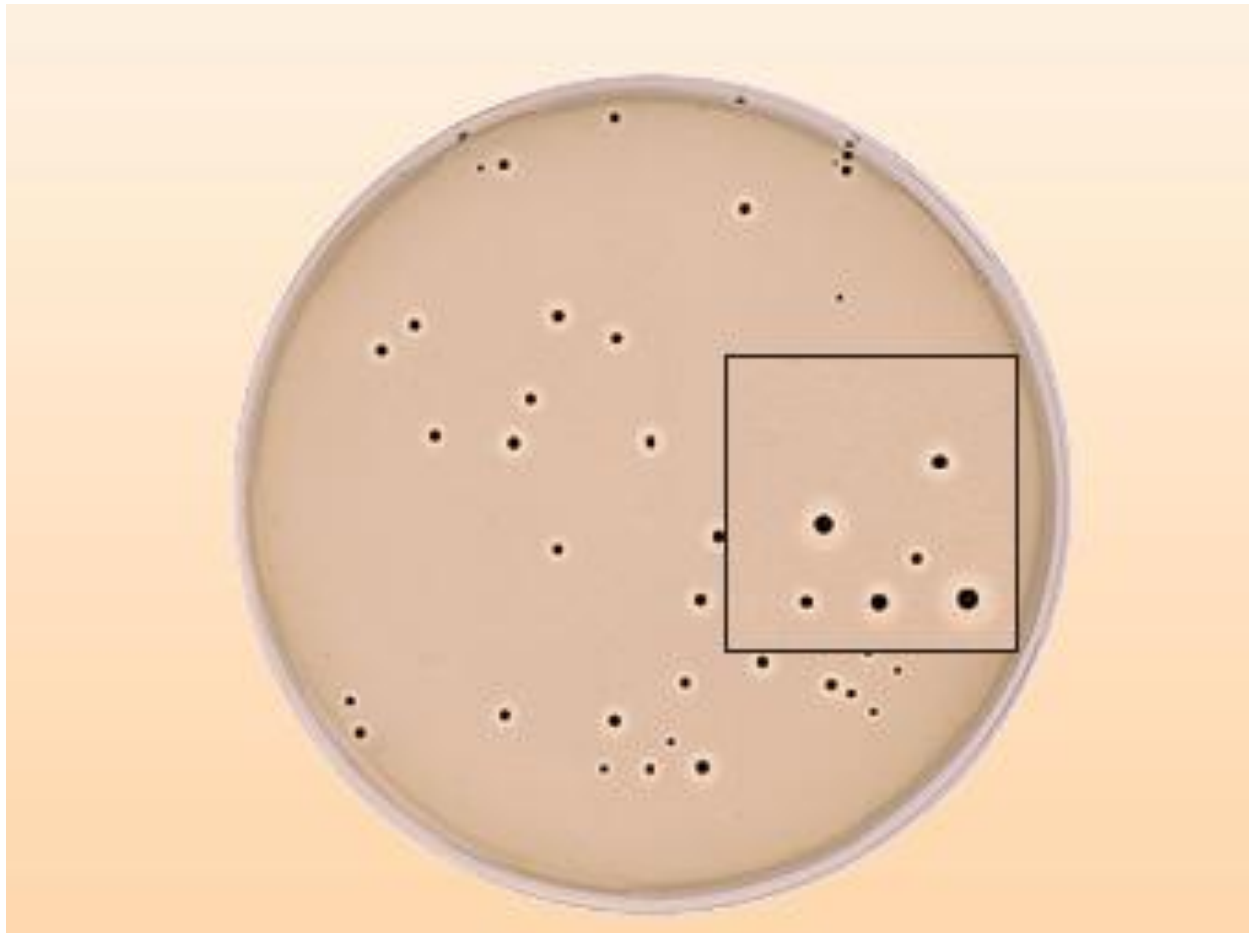
## Chromocult coliform agar





# Παράδειγμα Εξειδικευμένων Υποστρωμάτων 2/2

## Baird Parker





# Παράδειγμα Εξειδικευμένου Θρεπτικού Υλικού 1/2

## BAIRD PARKER ΓΙΑ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Υλικό	Δράση
Sodium tellurite Lithium chloride	Εκλεκτικά (selective) υλικά. Εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικρ/σμών
Sodium puvurate Glycine	Επιλεκτικά (elective) υλικά. Ευνοούν την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων

NB 1. Η αναγωγή του tellurite δίνει αποικίες μαύρου χρώματος, οι οποίες δεν είναι χαρακτηριστικές του *S. aureus* γιατί ίδιες αποικίες δίνουν και άλλα είδη του *Staphylococcus*, *Micrococcus* και ορισμένα είδη *Bacillus*.

NB 2. Για τον λόγο αυτό προστίθεται στο υπόστρωμα λεκιθίνη (egg yolk) με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια διαυγής ζώνη γύρω από την αποικία που οφείλεται στην πρωτεολυτική δράση του ενζύμου λεκιθινάση του *S. aureus*



# Παράδειγμα Εξειδικευμένου Θρεπτικού Υλικού 2/2

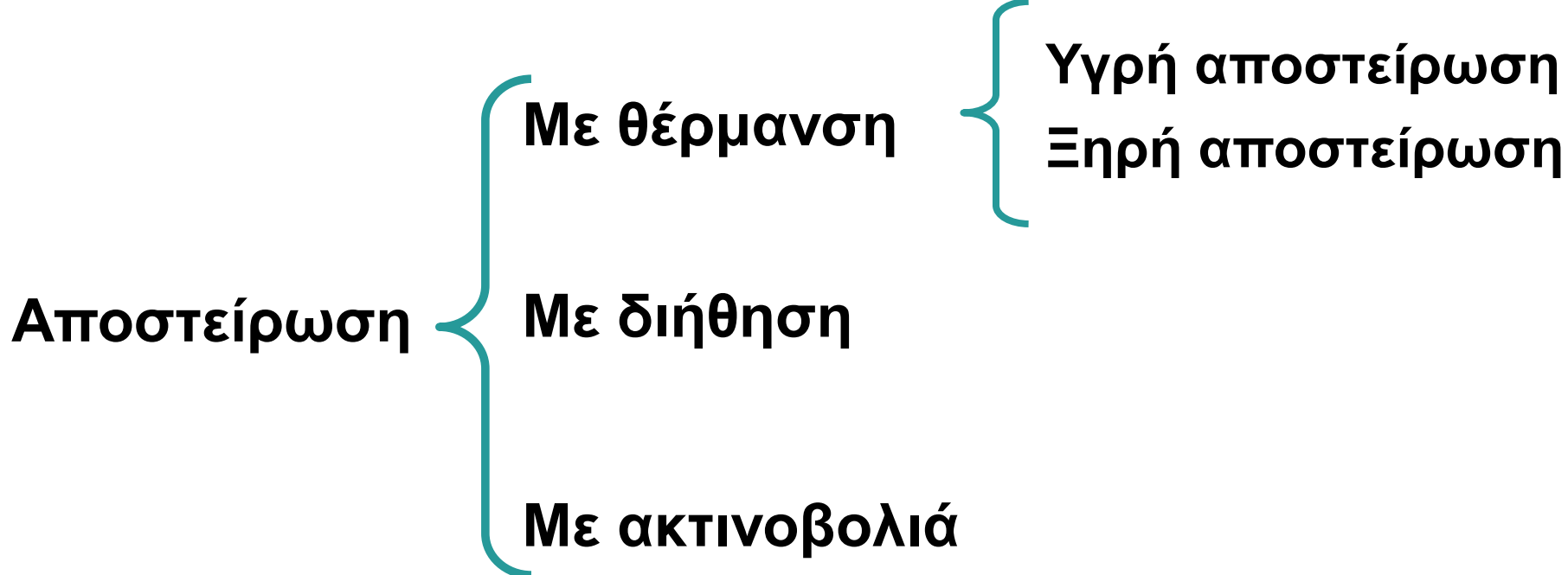
**BAIRD PARKER ΓΙΑ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***





# Αποστείρωση

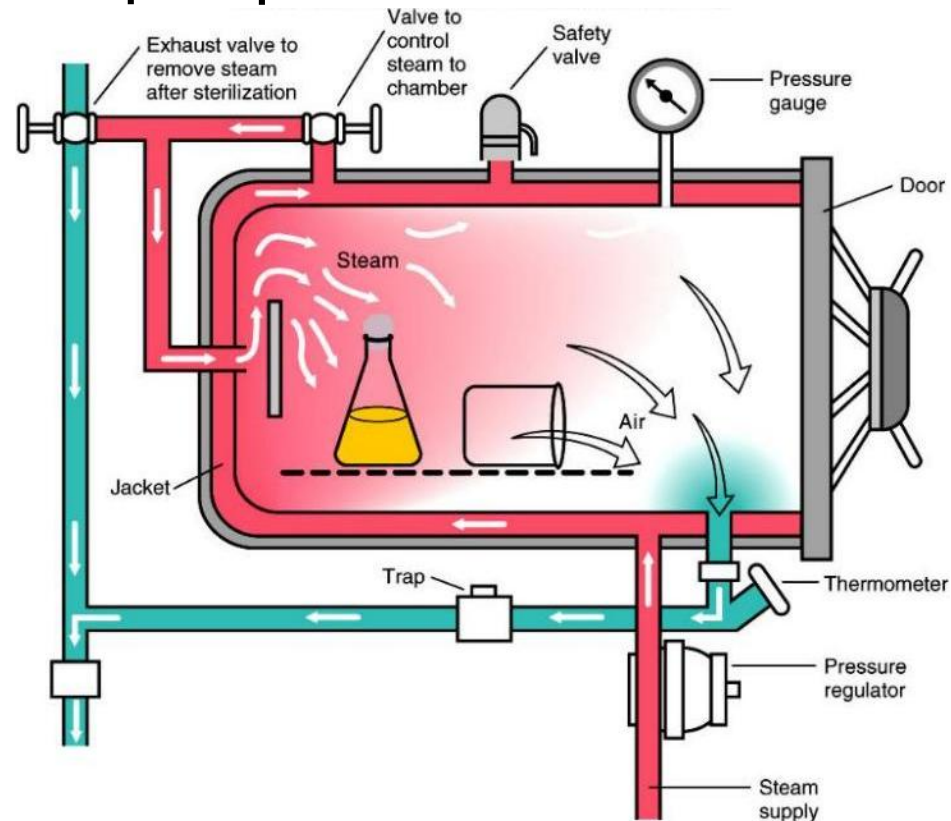
- Αποστείρωση είναι η διαδικασία καταστροφής όλων των μορφών μικροβιακής ζωής σε ένα υλικό ή αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών μορφών (ενδοσπόρια).





# Μέθοδος Υγρής Αποστείρωσης – Αυτόκαυστο 1/2

- Το αυτόκαυστο χρησιμοποιεί ατμό υπό πίεση.
- Η αποστείρωση επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 15 psi σε 15 min.





# Μέθοδος Υγρής Αποστείρωσης – Αυτόκαυστο 2/2

Pressure (psi in excess of atmospheric pressure)	Temperature ( °C)
0 psi	100
5 psi	110
10 psi	116
15 psi	121
20 psi	126
30 psi	135





# Μέθοδος Ξηρής Αποστείρωσης

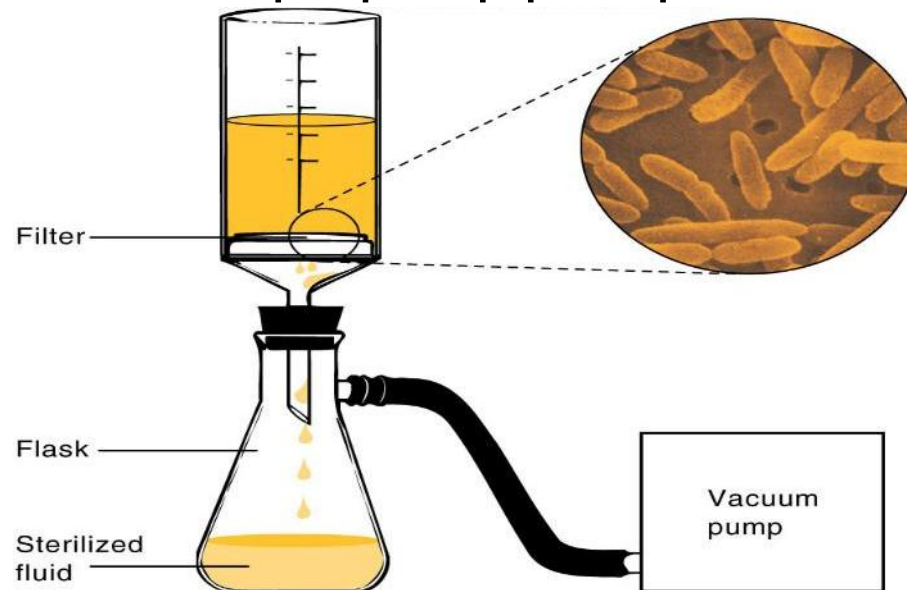
- Στη μέθοδο αυτή τα αντικείμενα τοποθετούνται σε φούρνο όπου διοχετεύεται θερμός και ξηρός αέρας.
- Η επεξεργασία γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία 160-170°C για 2-4 ώρες.





# Αποστείρωση με Διήθηση

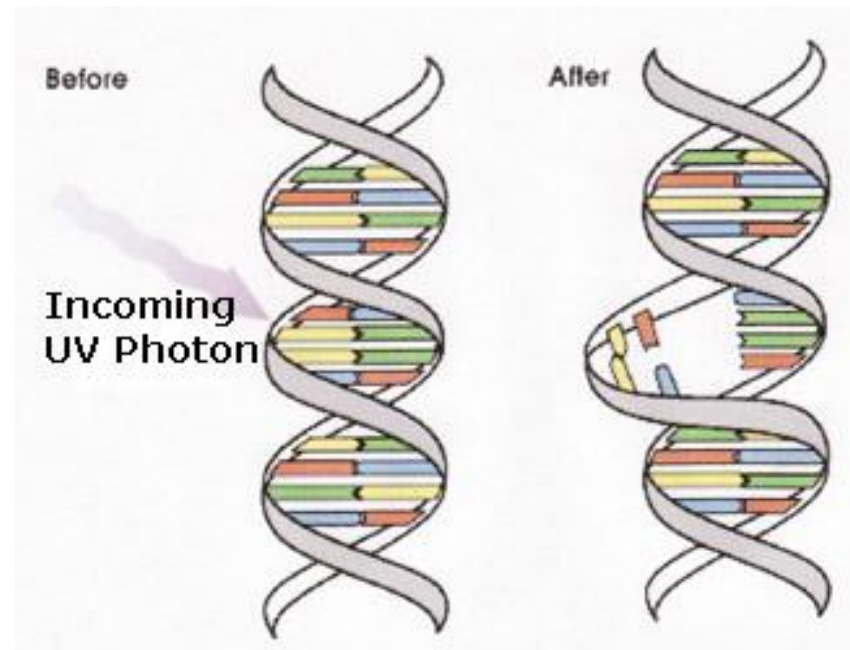
- Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση υγρών θρεπτικών υλικών που περιέχουν συστατικά ευαίσθητα στην θερμότητα (βιταμίνες, αντιβιοτικά, κλπ).
- Το υγρό θρεπτικό υλικό περνάει μέσα από ηθμό με μέγεθος πόρων  $0,45 \mu\text{m}$  με τη βοήθεια κενού και συλλέγεται σε αποστειρωμένη φιάλη.





# Αποστείρωση με Ακτινοβολία

- Χρησιμοποιείται υπεριώδης ακτινοβολία (μη ιονίζουσα ακτινοβολία) με μήκος κύματος 260 nm. Επιδρούν στο DNA των βακτηρίων.
- Χρησιμοποιείται επίσης και ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες Χ, ακτίνες γ και καθοδικές ακτίνες).
- Παρουσιάζουν μικρή διεισδυτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση εργαστηριακών υλικών όπως τρυβλία, σύριγγες, μικροβιολογικοί κρίκοι.





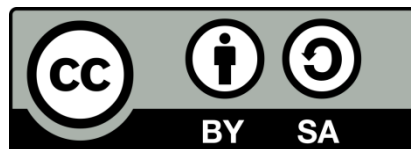
# Βιβλιογραφία

- Νυχάς, Γ.Ι. Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Martin R. Adams and Maurice O. Moss (2008) Food Microbiology, 3rd Edition, RSC Publishing, London, UK.
- Jay, J.M. (2000) Modern Food Microbiology, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, USA.



# Άδειες Χρήσης

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





# Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.





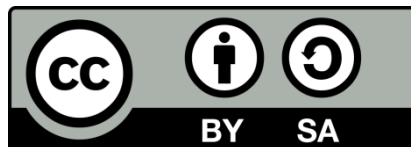
# Σημείωμα Αναφοράς

- Copyright Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2015. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Ευστάθιος Πανάγου/ Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου/ Αναστάσιος Σταματίου, «Μικροβιολογία Τροφίμων Ι Εργαστήριο». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://mediasrv.aua.gr/eclass/>



# Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων, π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Η άδεια αυτή ανήκει στις άδειες που ακολουθούν τις προδιαγραφές του Ορισμού Ανοικτής Γνώσης [2], είναι ανοικτό πολιτιστικό έργο [3] και για το λόγο αυτό αποτελεί ανοικτό περιεχόμενο [4].

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

[2] <http://opendefinition.org/okd/ellinika/>

[3] <http://freedomdefined.org/Definition/EI>

[4] <http://opendefinition.org/buttons/>





# Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει) μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.