



Μικροβιολογία Τροφίμων I

Εργαστήριο

Ενότητα 3:

Η Απαρίθμηση του
Μικροβιακού Πληθυσμού στα
Τρόφιμα, 1.5ΔΩ

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 απόκτηση βασικών εργαστηριακών δεξιοτήτων για την μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων.
- Η εξοικείωση των φοιτητών με την απαρίθμηση του μικροβιολογικού φορτίου στα τρόφιμα.



Λέξεις Κλειδιά

- Απαρίθμηση μικροβιακού φορτίου
- Μέθοδος επίστρωσης
- Μέθοδος ενσωμάτωσης



Τρόποι Έκφρασης του Μικροβιακού Φορτίου 1/2

- 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).



Τρόποι Έκφρασης του Μικροβιακού Φορτίου 2/2

- 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 *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 1/2

- Η απαρίθμηση 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



Δειγματοληψία 2/2

- 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 1/2

- 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.
- 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.



Μέσα Εναιώρησης ή Διασποράς 2/2

- Διάλυμα Ringer: Είναι μέσο διασποράς γενικής χρήσης που αποτελείται από

NaCl 9 g L⁻¹

KCl 0,042 g L⁻¹

CaCl₂ 0,48 g L⁻¹

NaHCO₃ 0,20 g L⁻¹

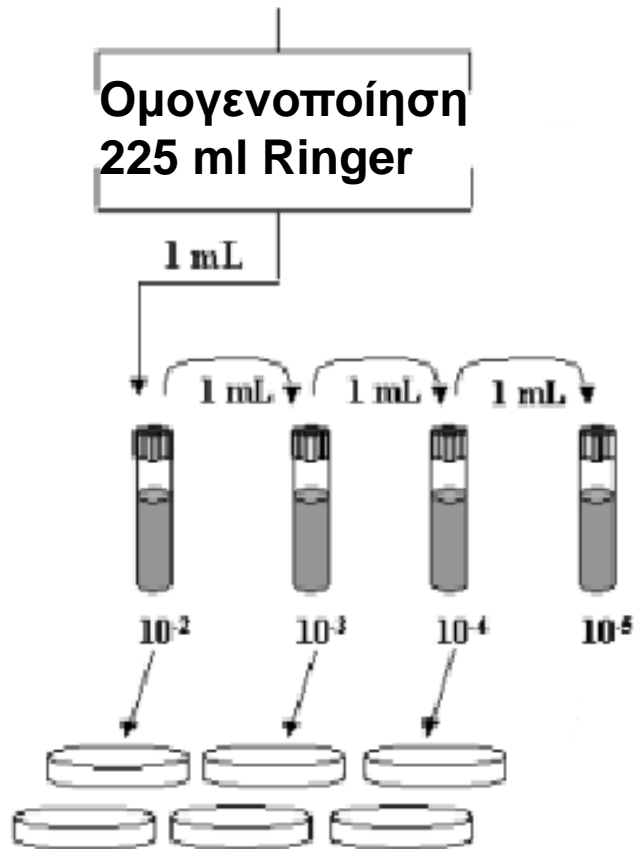
- Πεπτονούχο ύδωρ (peptone water): Περιέχει 0,1% πεπτόνη σε νερό. Το μέσο αυτό μειονεκτεί έναντι των άλλων διότι εάν η δειγματοληψία δεν γίνει αμέσως τότε παρατηρείται πολλαπλασιασμός μικροοργανισμών στο μέσο.



Τεχνικές Μέτρησης του Μικροβιακού Πληθυσμού στα Τρόφιμα

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΚΑΔΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ

Τρόφιμο (25g)



- 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.



Ο Εμβολιασμός του Βακτηριακού Εναιωρήματος

ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΔΥΟ ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plating)



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

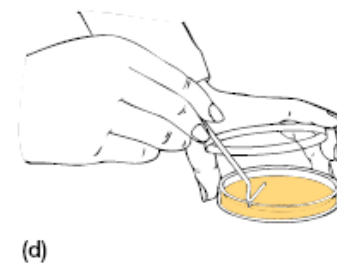
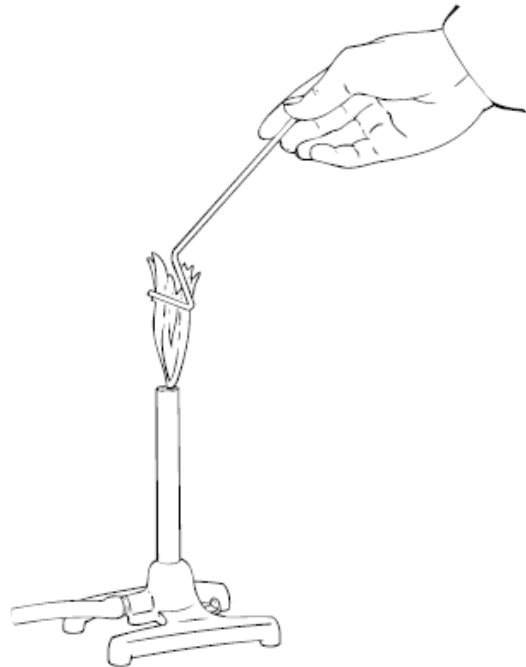
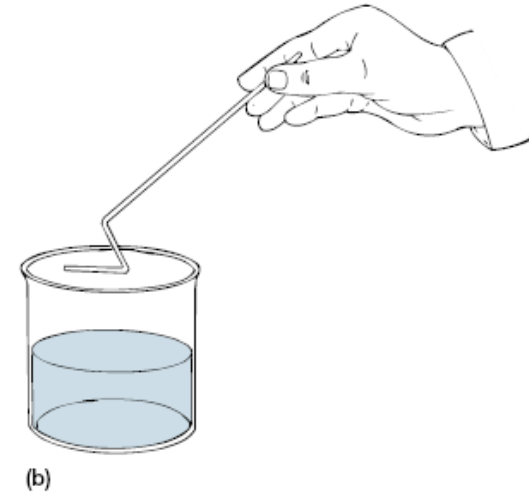
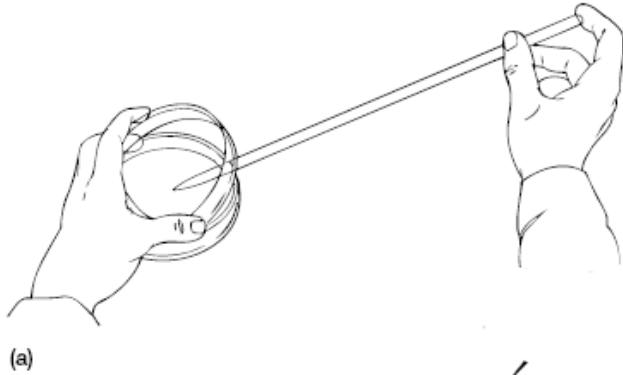
Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plating)



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**.

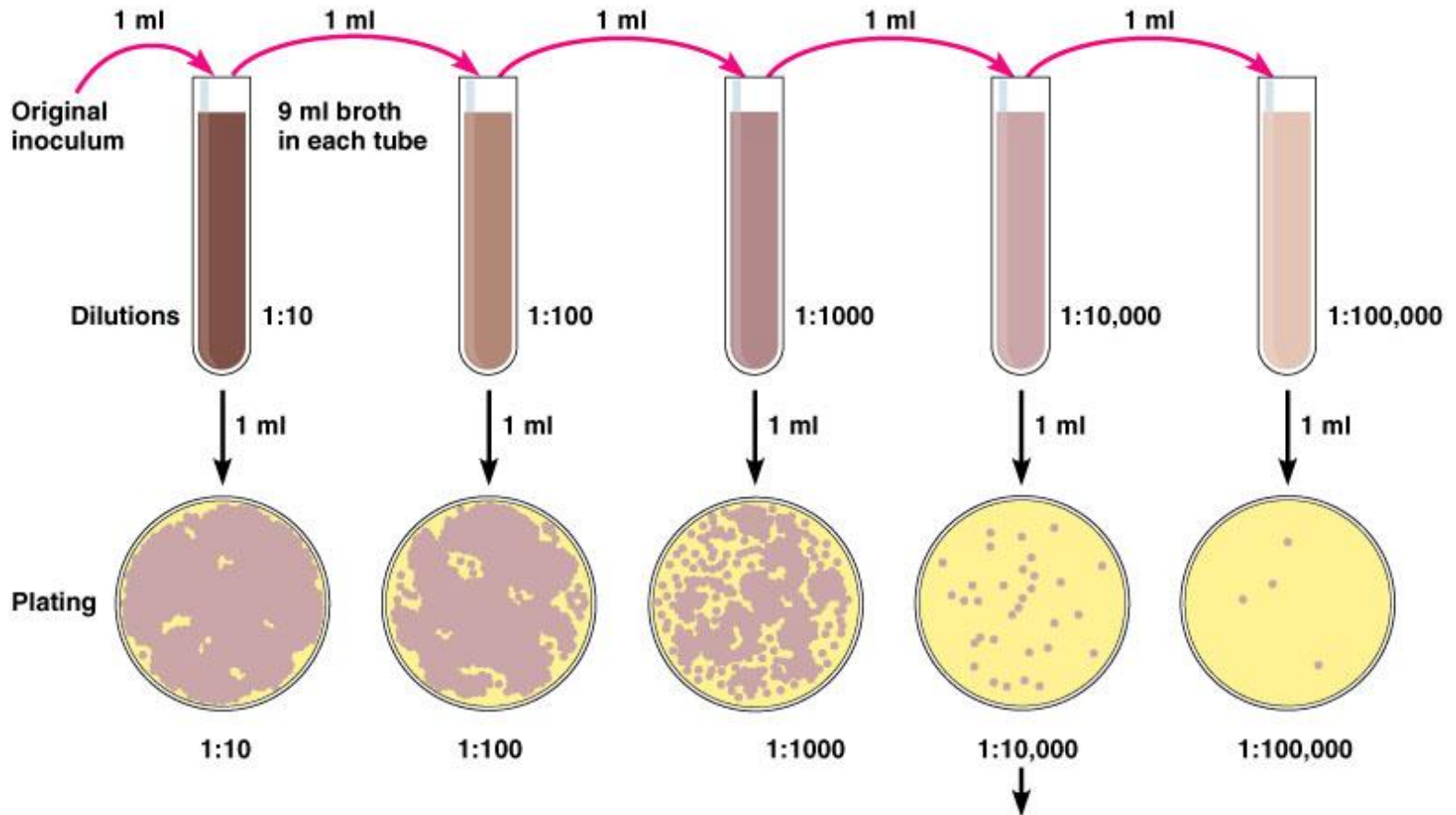


Τεχνική της Επίστρωσης – Spread Plating 1/3





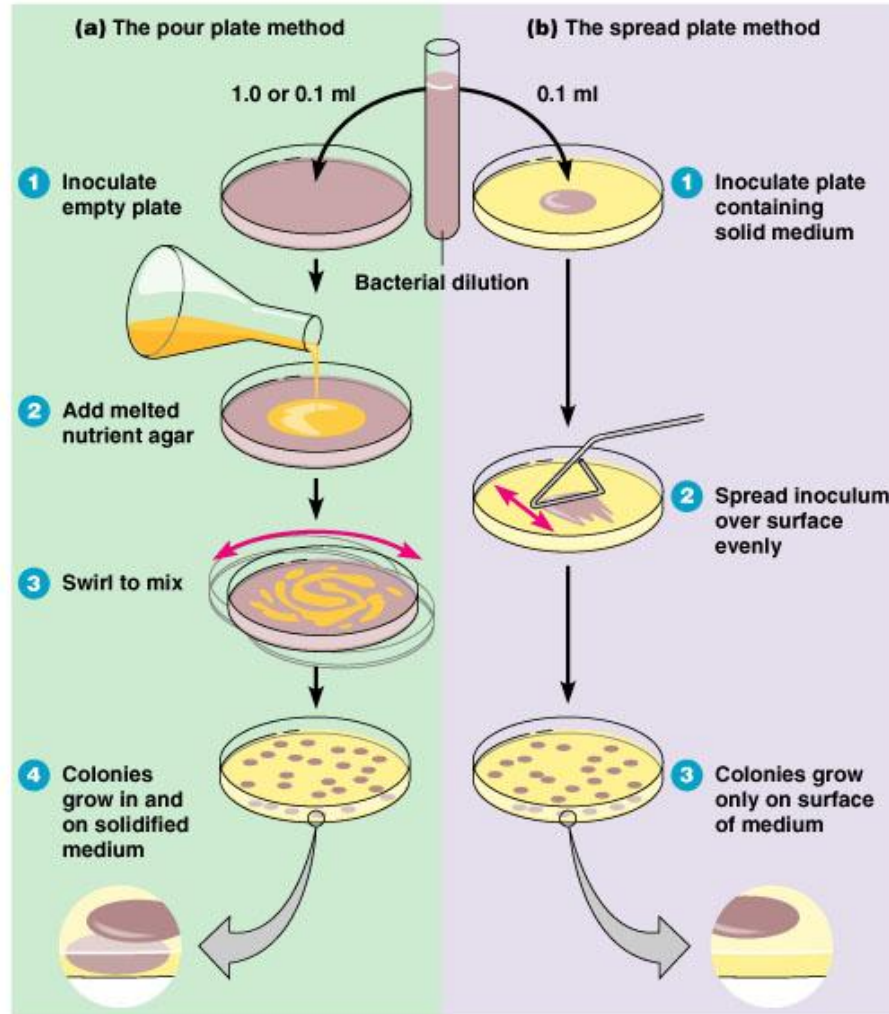
Τεχνική της Επίστρωσης – Spread Plating 2/3



Calculation: Number of colonies on plate × 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.)



Τεχνική της Ενσωμάτωσης – Pour Plating 3/3





Μέθοδοι Ανάλυσης

Τεχνική επιφανειακής
επίστρωσης (spread
plating)



PCA: Ολική Μεσόφιλη
Χλωρίδα

CFC: Ψευδομονάδες

STAA: *Brochothrix
thermosphacta*

RBC: Ζύμες/Μύκητες

Επώαση: 25°C για 48-72 ώρες

Τεχνική ενσωμάτωσης (pour
plating)

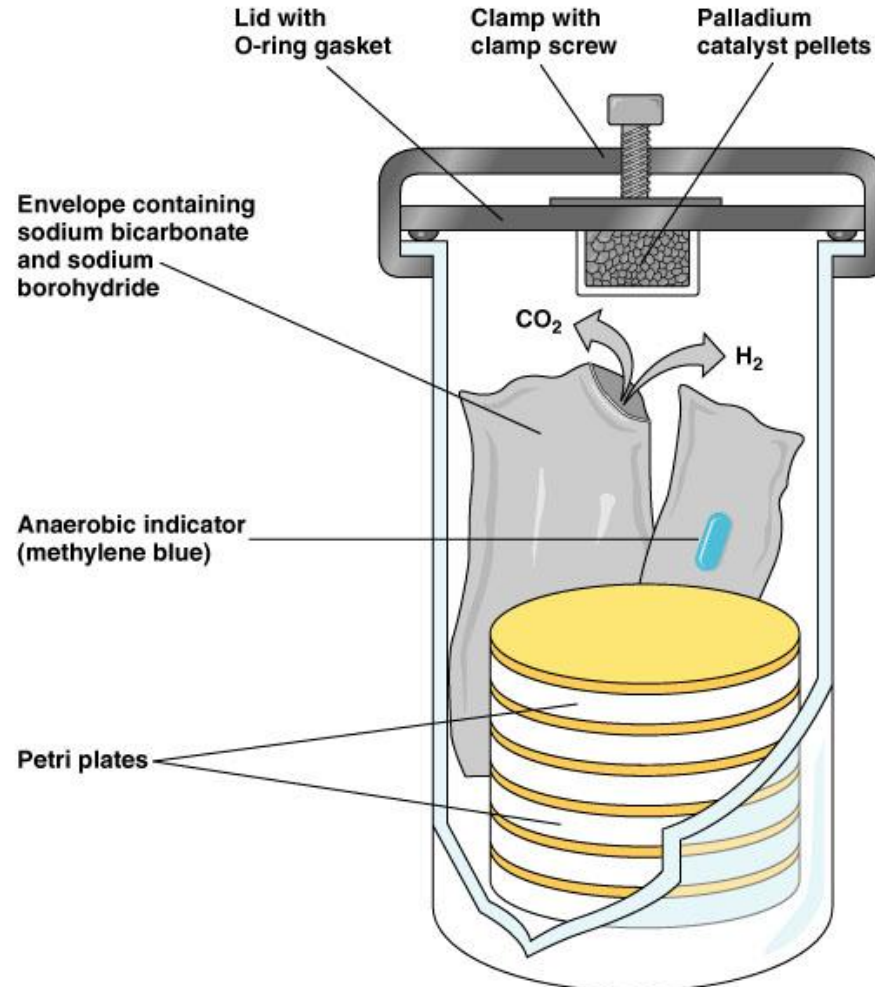


MRS: Γαλακτικά βακτήρια (25°C
για 48-72 ώρες)

VRBGA: Εντεροβακτήρια (37°C
για 24 ώρες)



Επώαση των Τρυβλίων σε Αναερόβιες Συνθήκες





Απαρίθμηση Μικροβιακού Φορτίου

$$N = \frac{C_1 + C_2}{n_1 + (n_2 / 10)} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{1}{d_1}$$

Όπου:

C_1 είναι το συνολικό άθροισμα των αποικιών στα n_1 τρυβλία της αραιώσης d_1 .

C_2 είναι το συνολικό άθροισμα των αποικιών στα n_2 τρυβλία της επόμενης αραιώσης.



Απαρίθμηση Μικροβιακού Φορτίου - Παράδειγμα

Αραίωση	# τρυβλίων	# αποικιών	Σύνολο	Μέσος όρος	cfu ml ⁻¹
10 ⁻⁴	n=3	63, 74, 61	198	66	6,6 x 10 ⁵
10 ⁻⁵	n=3	5, 11, 9	25	8,3	8,3 x 10 ⁶

$$N = \frac{(198 + 25)}{(3 + 0,3)} \cdot \frac{1}{0,1} \cdot \frac{1}{10^{-4}} = 6,8 \cdot 10^5$$



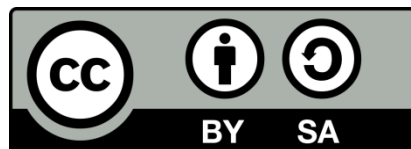
Βιβλιογραφία

- 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.





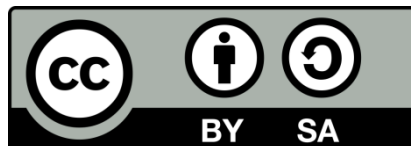
Σημείωμα Αναφοράς

- 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.