



Μικροβιολογία Τροφίμων I

Εργαστήριο

Ενότητα 7:

Κλασσικές & Σύγχρονες (Ταχείες)
Μέθοδοι Μέτρησης Μικροβιακού
Φορτίου (2/3), 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 εξοικείωση των φοιτητών με τις ταχείες μεθόδους απαρίθμησης του μικροβιακού φορτίου στα τρόφιμα.



Λέξεις Κλειδιά

- Ταχείες μέθοδοι απαρίθμησης μικροβιακού φορτίου
- Μέθοδος δεκαδικών αραιώσεων
- Μέθοδος οπτικής πυκνότητας
- Μέθοδος ηλεκτρικής αγωγιμότητας
- Αιματοκυτόμετρο
- Μέθοδος περισσότερο πιθανού αριθμού
- Σπειροειδής μέθοδος απαρίθμησης



B. Σύγχρονες (Ταχείες) μέθοδοι 1/3

Ανάγκη για:

- Ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων
- Ανάλυση μεγάλης ποσότητας δειγμάτων ταυτόχρονα
- Απλότητα
- Αυτοματισμός
- Χαμηλό κόστος
- Αξιοποίηση μη εξειδικευμένου ανθρώπινου δυναμικού



B. Σύγχρονες (Ταχείες) μέθοδοι 2/3

Αποτέλεσμα:

- Γρήγορος έλεγχος πρώτων υλών, μικρότερη ανάγκη για αποθήκευση-δέσμευση χώρων κεφαλαίων και προσωπικού
- Γρήγορη διάθεση προϊόντων στην αγορά
- Δυνατότητα παρακολούθησης ποιότητας, ανίχνευση σφαλμάτων κατά την παραγωγή, διευκόλυνση στον έλεγχο τήρησης κανόνων υγιεινής-συστημάτων διασφάλισης ποιότητας (HACCP)-μικροβιολογικών κριτηρίων-εφαρμογής νομοθεσίας, έγκαιρη απόσυρση προϊόντων.



Σύγχρονες Μέθοδοι Μέτρησης Μικροβιακού Φορτίου

Διακρίνονται σε:

- Βιοχημικές μεθόδους
- Βιοφυσικές μεθόδους



B. Σύγχρονες (Ταχείες) μέθοδοι 3/3

(α) Βιοχημικές μέθοδοι

- **Βιοφθορισμός**

ATP + Λουσιφερίνη ---Λουσιφεράση→ Φως

Απαιτεί υψηλή βιομάζα (>10⁴ κύτταρα)

Διαχωρισμός μικροβιακού – μη μικροβιακού ATP

Αερόβιοι-αναερόβιοι--- διαφορετική αντίδραση

- **Μέτρηση καταλάσης (Catalase meter)**

H₂O₂ –καταλάση O₂ + H₂O (Δίσκοι-αέριο)

- **Δοκιμή Limulus (LAL test)**

Limulus polyphemus (αρθρόποδο) – ενδοτοξίνες-λιποπολυσακχαρίτες - πήγμα



LAL test 1/4





LAL test 2/4

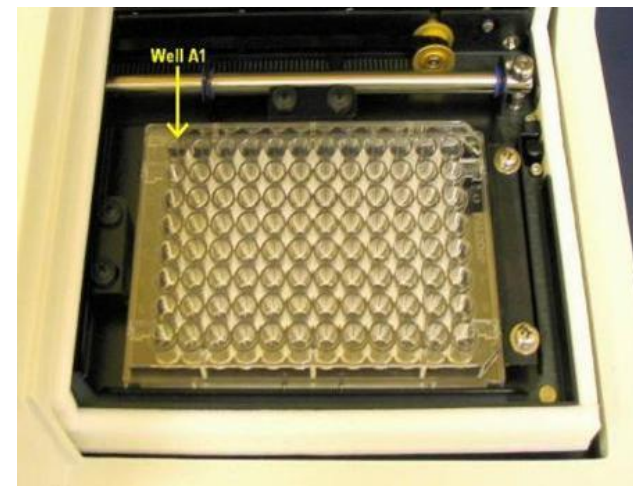
- Το Limulus amebocyte lysate (LAL) είναι υδατικό διάλυμα από αμοιβαδοειδή κύτταρα (amoebocytes) που βρίσκονται στην λέμφο του οστρακόδερμου *Limulus polyphemus*.
- Η λειτουργία τους είναι αντίστοιχη με αυτή των λευκών αιμοσφαιρίων στα θηλαστικά. Κινούνται με ψευδοπόδια και έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από παθογόνους μικροοργανισμούς.





LAL test 3/4

- Η ουσία LAL αντιδρά με βακτηριακές ενδοτοξίνες καθώς και με λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που βρίσκονται στη μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και σχηματίζουν πήγμα. Η αντίδραση αυτή είναι η βάση της δοκιμής LAL που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως από τη φαρμακευτική βιομηχανία για την ανίχνευση τοξινών σε φάρμακα.





LAL test 4/4

- Για την παρασκευή του LAL, αφαιρείται η λέμφος από την περιοχή του περικαρδίου του καβουριού και ακολούθως τα αμοιβαδοειδή κύτταρα απομακρύνονται από τη λέμφο με φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια τοποθετούνται μέσα σε απεσταγμένο νερό όπου διογκώνονται και διαρρηγνύονται (λύση του κυττάρου). Τα συστατικά του κυττάρου στη συνέχεια υποβάλλονται σε λυοφυλίωση και αποτελούν την ουσία LAL.
- Για την ανίχνευση τοξίνης, το υπό εξέταση δείγμα αναμιγνύεται με το LAL και νερό. Η δημιουργία πήγματος σημαίνει την παρουσία βακτηριακών τοξινών.



Χρωστικές (Dye Reduction) 1/3

- Οι χρωστικές προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια (οξειδώνονται) από ένα ενεργό βιολογικό σύστημα και αλλάζει το χρώμα τους.
- Η οξειδωμένη μορφή των χρωστικών είναι έγχρωμη, ενώ η ανηγμένη μορφή άχρωμη, με εξαίρεση τα άλατα του tetrazolium.
- Απαρίθμηση των ζώντων κυττάρων
Methylene blue, resazurine και tetrazolium salts
Methylene blue : μπλέ → άσπρο
Resazurin : μπλέ → ρόζ ή άσπρο
Tetrazolium salts: άχρωμο → κόκκινο



Χρωστικές (Dye Reduction) 2/3

- Ο χρόνος που απαιτείται για την αλλαγή του χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογος με τον πληθυσμό του μικροοργανισμού.
- Ιστορικά η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της μικροβιολογικής κατάστασης του νωπού γάλακτος.



Χρωστικές (Dye Reduction) 3/3

Πλεονεκτήματα

1. Εύκολη, γρήγορη, χαμηλού κόστους
2. Μόνο τα ζωντανά κύτταρα αντιδρούν στη μέθοδο

Μειονεκτήματα

1. Δεν αντιδρούν όλοι οι μικροοργανισμοί το ίδιο καλά στην χρώση



Ανίχνευση Βακτηρίων Μέσω Χημειοφωταύγειας

EnSURE™



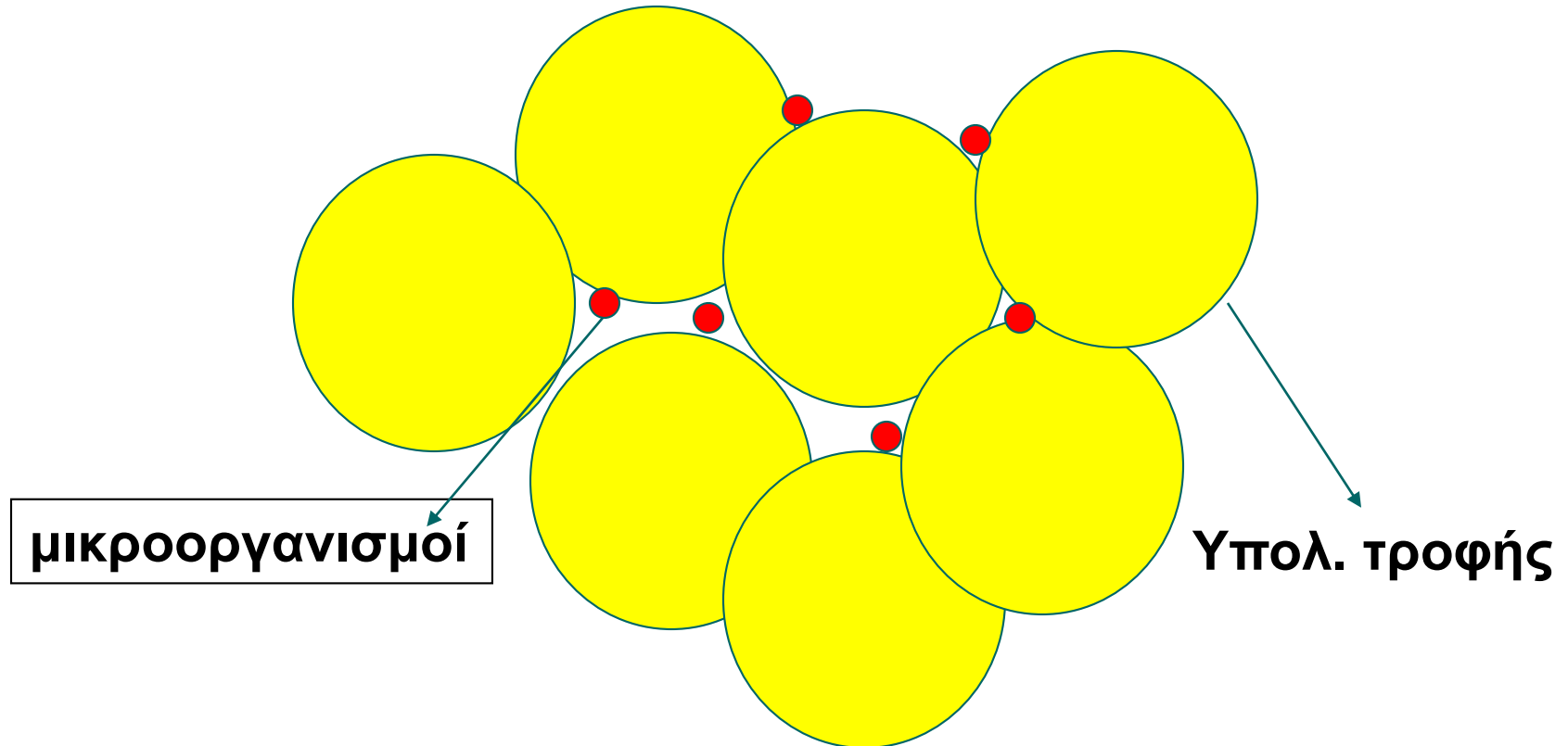
Πλατφόρμα Πολλαπλών Δεικτών Ποιοτικού Ελέγχου

- Άμεσος έλεγχος υγιεινής μέσω ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (HACCP)
- Έλεγχος καθαρισμού επιφανειών
- Έλεγχος νερού
- TV
- Ανίχνευση εντεροβακτηρίων
- Ανίχνευση E.coli
- Έλεγχος παστερίωσης



Λουμινομετρία – Atp Testing 1/2

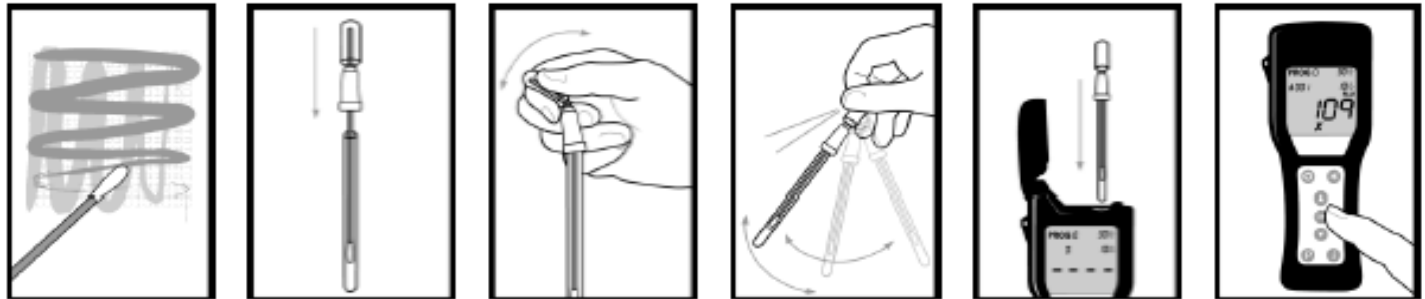
Επιφάνεια τροφίμου πριν τον καθαρισμό





Λουμινομετρία – Atp Testing 2/2

UltraSnap Procedure:





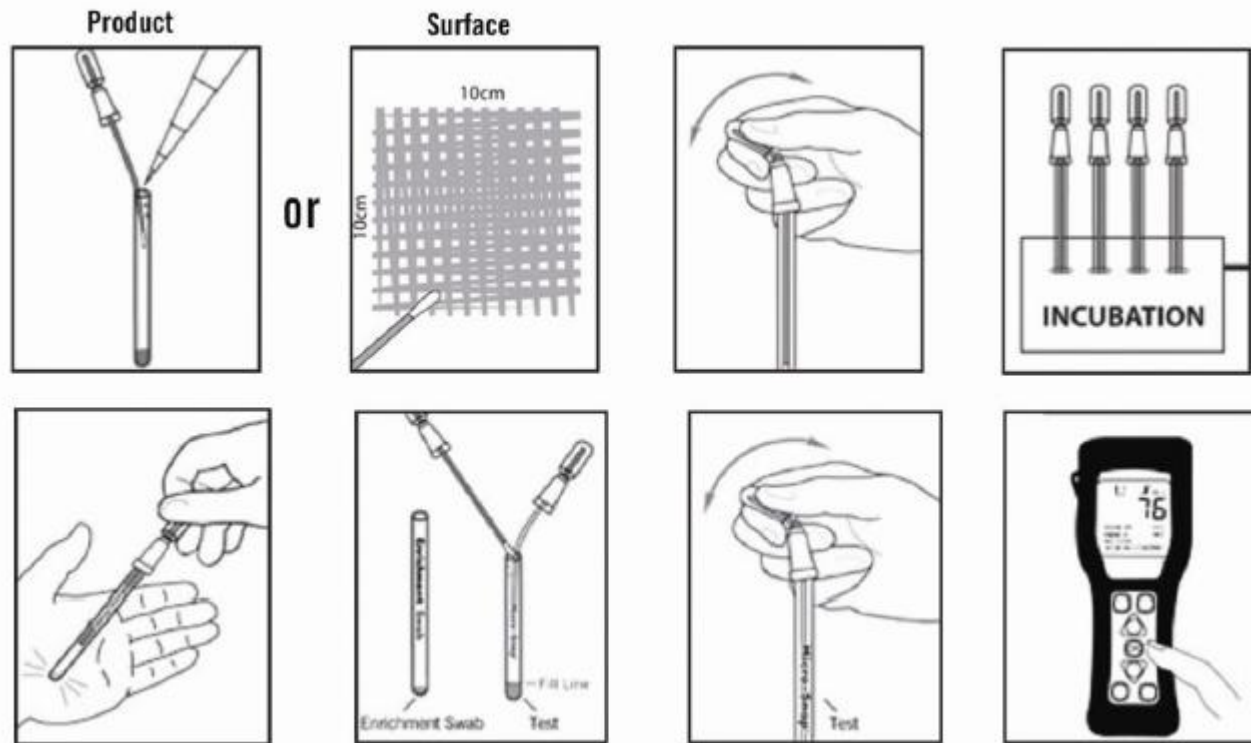
ΛΟΥΜΙΝΟΜΕΤΡΙΑ – Ταχεία Ανίχνευση Μικροοργανισμών 1/2



- Βασίζεται στην αντίδραση ενζύμων που είναι χαρακτηριστικά για κάθε κατηγορία μικροοργανισμών με εξειδικευμένα υποστρώματα, με συνέπεια την παραγωγή βιοφωταύγειας, η ένταση της οποίας μπορεί να συσχετιστεί με τον πληθυσμό του μικροοργανισμού.
- Χρησιμοποιείται για ΟΜΧ καθώς και για ορισμένους παθογόνους μικροοργανισμούς (E. coli, Listeria) και δείκτες υγιεινής (coliforms, enterobacteriaceae).



Ταχεία Ανίχνευση E. coli





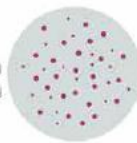
ΛΟΥΜΙΝΟΜΕΤΡΙΑ – Ταχεία Ανίχνευση Μικροοργανισμών 2/2

No more counting colonies.

CFU

Colony Forming Units

Traditional plating methods utilize colony counting techniques to determine CFU levels. MicroSnap technology derives equivalent CFU values using light detection.



RLU

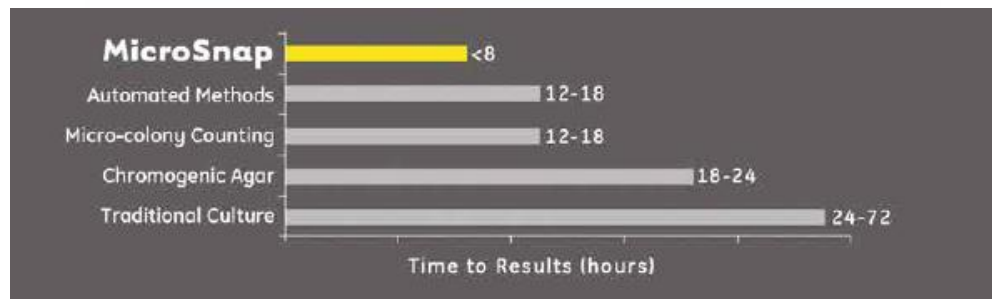
Relative Light Units

EnSURE displays measurements in relative light units (RLU's). The RLU number is correlated to colony forming units (CFU's). Coliform and E. coli are AOAC-RI Performance TestedTM Methods.



CFU : RLU - Conversion

CFU/ml or g	E. coli	Coliform	Enterobacteriaceae	TVC
<10	<2	<2	N/A	N/A
<20	<4	<4	N/A	N/A
<50	<7	<7	<10	N/A
<100	<12	<12	<20	<10
<200	<20	<20	<40	<20
<500	<35	<35	<100	<50
<1,000	<60	<60	<200	<100
<5,000	<180	<180	<1,000	<500
<10,000	<300	<300	<5,000	<1,000





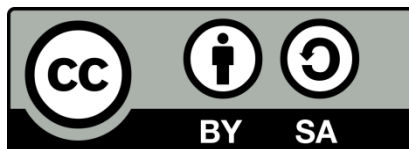
Βιβλιογραφία

- 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.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



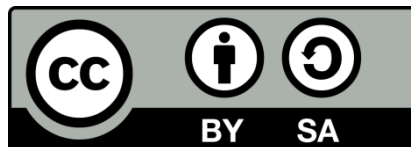
Σημείωμα Αναφοράς

- 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.