



Μικροβιολογία Τροφίμων

Μάθημα 1^ο

Αντιγόνη Κουσκούτη

Μοριακός Βιολόγος, Ph.D.

Περιεχόμενα μαθήματος

- Σημασία της μικροβιολογίας τροφίμων. Ιστορική αναδρομή
- Ο ρόλος των μικροοργανισμών στα τρόφιμα
- Κύριες κατηγορίες μικροοργανισμών που απαντώνται στα τρόφιμα
- Πηγές και τρόποι επιμόλυνσης μόλυνσης των τροφίμων με μικροοργανισμούς.
- Μέθοδοι εντοπισμού και απαρίθμησης διαφόρων μικροβιακών ομάδων στα τρόφιμα (κλασσικές και ταχείες μέθοδοι)
- Χαρακτηριστικά της μικροβιακής ανάπτυξης στα τρόφιμα
- Ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης την μικροβιακή ανάπτυξη στα τρόφιμα
- Μεταβολισμός των μικροοργανισμών και επίδραση στα συστατικά των τροφίμων

Περιεχόμενα μαθήματος

- Κυριότερα βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα
- Σποριογόνα βακτήρια και η σημασία τους στη βιομηχανία τροφίμων
- Κυριότερες ζύμες που σχετίζονται με τα τρόφιμα
- Κυριότεροι μυκηλιακοί μύκητες που σχετίζονται με τα τρόφιμα
- Μικροβιολογικοί δείκτες και μικροβιολογικά κριτήρια στην ποιότητα των τροφίμων
- Μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων – Ρόλος των μικροβιακών ενζύμων
- Είδη αλλοίωσης σε βασικές κατηγορίες τροφίμων και υπεύθυνοι μικροοργανισμοί
- Επίδραση των μεθόδων συντήρησης στη μικροχλωρίδα και τη μικροβιακή ποιότητα των τροφίμων

Περιεχόμενα μαθήματος

- Φυσικά αντιμικροβιακά συστήματα
- Θεωρία των πολλαπλών εμποδίων- Παραδείγματα εφαρμογής
- Τροφιμογενείς λοιμώξεις: υπεύθυνοι μικροοργανισμοί και τα χαρακτηριστικά τους, αίτια που τις προκαλούν, κλινικά συμπτώματα, αντιμετώπιση
- Ωφέλιμα βακτήρια που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις των τροφίμων – Μικροβιολογία τροφίμων ζύμωσης – Καλλιέργειες εκκινητές
- Προβιοτικοί μικροοργανισμοί και επίδραση στην υγεία του ανθρώπου
- Παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων (ένζυμα, αλκοόλες, οξέα κ.ά)

Κύριοι Οργανισμοί Τροφίμων

- ▶ **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations):** Εξειδικευμένη υπηρεσία του ΟΗΕ που στοχεύει στη διασφάλιση της επισιτιστικής ασφάλειας για όλους.
- ▶ **EFSA (European Food Safety Authority):** Η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων που καλύπτει τους κινδύνους από το αγρόκτημα στο πιάτο.
- ▶ **ΕΦΕΤ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων):** Ο αρμόδιος φορέας στην Ελλάδα για τον έλεγχο και την ασφάλεια των τροφίμων.
- ▶ **ΣΕΒΤ (Σύνδεσμος Ελληνικών Βιομηχανιών Τροφίμων):** Εκπροσωπεί την ελληνική βιομηχανία τροφίμων και ποτών.

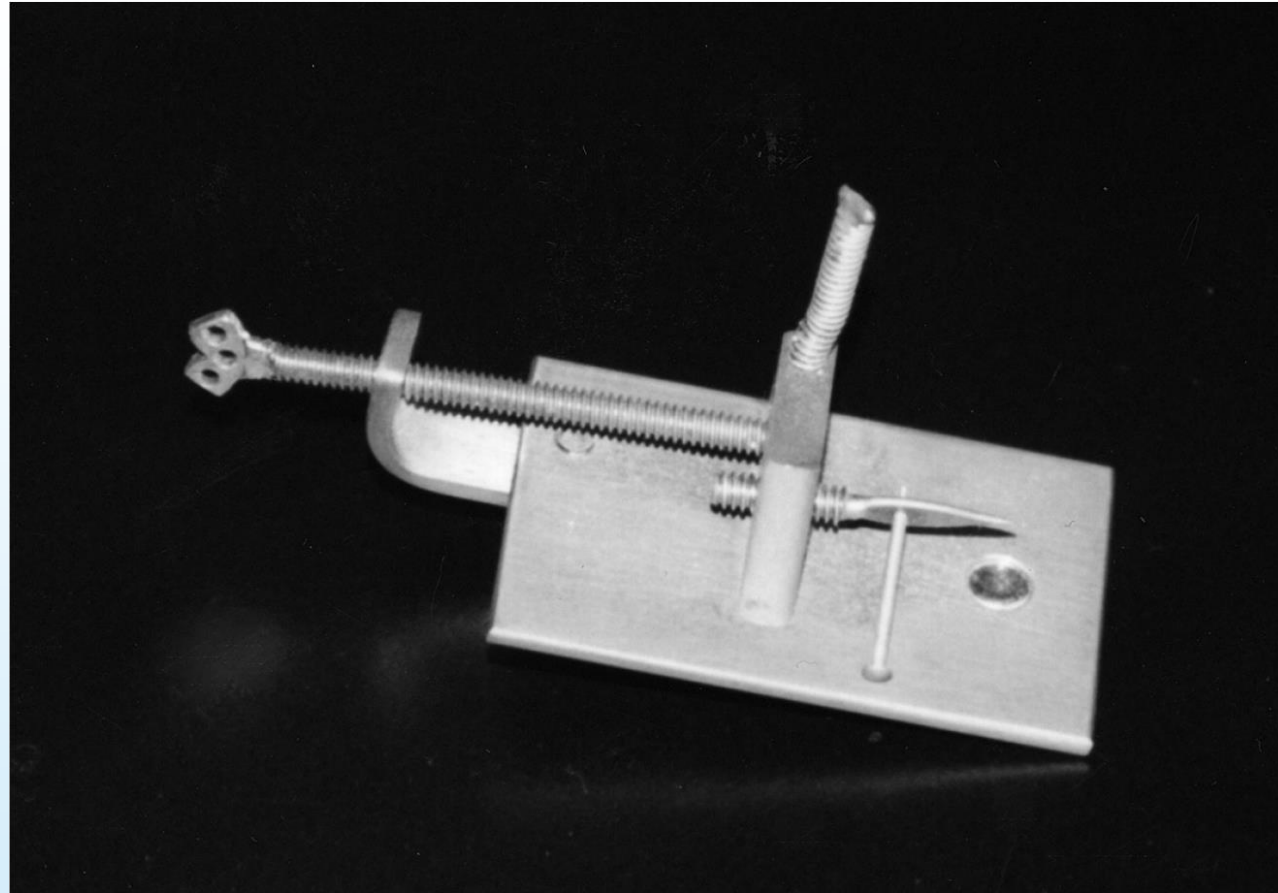
Κεφάλαιο 1: Η Πορεία της Μικροβιολογίας Τροφίμων

Περίληψη

- Τα μικρόβια ήταν τα πρώτα ζωντανά όντα στη γη και παραμένουν η βάση της βιόσφαιρας.
- Οι θεμελιώδεις βιολογικές ανακαλύψεις του 18ου αιώνα, όπως η απόδειξη ότι η αυθόρμητη γένεση δεν ισχύει, τα αξιώματα του Koch και η καθαρή καλλιέργεια μικροβίων, συνεχίζουν να επηρεάζουν την επιστήμη αυτή.
- Η μοριακή βιολογία και η γενετική άρχισαν ήδη να επιδρούν στη μικροβιολογία τροφίμων και να διαμορφώνουν το μέλλον της.
- Η μικροβιολογία τροφίμων είναι ένα σχετικά νέο πεδίο μελέτη.



Antoine van Leeuwenhoek



Αντίγραφο του μικροσκοπίου του Leeuwenhoek

Πίνακας 1.1 Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της μικροβιολογίας τροφίμων *

Δεκαετία	Γεγονός
~4000 π.Χ.	Η ζύμωση των τροφίμων αρχίζει να γίνεται μια οργανωμένη δραστηριότητα.
1670	Ο van Leeuwenhoek παρατηρεί «μικρά ζώφια» στο νερό της βροχής. Έτσι γεννιέται η μικροβιολογία.
1760	Τα πειράματα του Spallanzani με βραστό βοδινό κρέας δίνουν ένα χτύπημα κατά της θεωρίας της αυθόρμητης γένεσης.
1800	Ο Nicolas Appert εφεύρει της διαδικασία κονσερβοποίησης. Είναι εντυπωσιακό το ότι συνεχίζει να είναι μια βασική μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων ακόμα και 200 χρόνια μετά.
1810	Ο Peter Durand πατεντάρει το μεταλλικό κουτί κονσέρβας, διευκολύνοντας τη ζωή του Appert.
1850	Στους Appert και Raymond Chevallier-Appert κατοχυρώνεται μια πατέντα για την αποστείρωση με ατμό (υπό πίεση). Η χρήση του ατμού υπό πίεση αυξάνει τις θερμοκρασίες επεξεργασίας, μειώνει το χρόνο επεξεργασίας και βελτιώνει ριζικά την ποιότητα του κονσερβοποιημένου τροφίμου. Ο Louis Pasteur αποδεικνύει ότι ζωντανοί οργανισμοί προκαλούν τη γαλακτική και την αλκοολική ζύμωση.
1860	Ο Pasteur αντικρούει τη θεωρία της αυθόρμητης γένεσης. Η ζωή μπορεί να προκύψει μόνο μέσω μιας άλλης ζωής. Ο Joseph Lister αναπτύσσει την ιδέα της αντισηπτικής πρακτικής. Πείθοντας τους χειρουργούς να πλένουν τα χέρια τους, σώζει χιλιάδες ζωές.

Ο Robert Koch διατυπώνει ως αξίωμα ότι τα βακτήρια είναι παράγοντες πρόκλησης ασθενειών. Μέχρι και σήμερα, τα αξιώματα του Koch παραμένουν τα «χρυσά πρότυπα» που αποδεικνύουν ότι ένα βακτήριο προκαλεί μια ασθένεια.

Ο Christian Gram εφεύρει τη χρώση Gram.

1880

Ο Julius Richard Petri εφεύρει το τρυβλίο Petri. Ο Petri δούλεψε στο εργαστήριο του Koch, όπου ανακαλύφθηκε επίσης η χρησιμότητα του άγαρ.

Ο A. A. Gartner απομονώνει τη *Salmonella enterica* ορότυπος Enteritidis από ένα κρούσμα τροφικής δηλητηρίασης. Έναν αιώνα αργότερα, η σαλμονέλλα παραμένει η βασική αιτία θανάτου μεταξύ των τροφογενών μικροβίων.

1890

Στις ΗΠΑ ξεκινά η παστερίωση του γάλακτος.

1900

Ο Νόμος για τα Τρόφιμα και τα Φάρμακα (Food and Drug Act) νομοθετείται ως απάντηση στην αποκάλυψη του Upton Sinclair για τη βιομηχανία κρέατος στο έντυπο *The Jungle*.

1920

Η Επιτροπή Δημόσιας Υγείας των ΗΠΑ δημοσιεύει μεθόδους αποφυγής του βουτυλισμού (αλλαντίασης).

Ο Alexander Fleming ανακαλύπτει τα αντιβιοτικά. Λιγότερο από 100 χρόνια μετά, παθογόνα μικρόβια πολυανθεκτικά σε αντιβιοτικά εγκυμονούν τον κίνδυνο επιδημιών.

Ο Clarence Birdseye εισάγει τα κατεψυγμένα τρόφιμα στη λιανική πώληση.

- 1930 Ο G. M. Dack επιβεβαιώνει ότι το *S. aureus* παράγει μία τοξίνη.
Η διάδοση των οικιακών ψυγείων γίνεται ευρεία.
Ο Νόμος για τα Τρόφιμα, τα Φάρμακα και τα Καλλυντικά των Η.Π.Α. (Food, Drug, and Cosmetic Act) καθιστά πιο αυστηρούς τους κανονισμούς σε σχέση με τα τρόφιμα.
Ανακαλύπτονται οι ιοί.
- 1940 Το πρώτο λυοφυλιωμένο τρόφιμο.
Το σουπερμάρκετ αντικαθιστά τα διάφορα καταστήματα τροφίμων ως ο κύριος χώρος αγοράς τροφίμων.
- 1950 Οι Watson και Crick ανακαλύπτουν τη δομή του DNA. Η Rosalind Franklin παίζει έναν μεγάλο, αλλά μη αναγνωρισμένο ρόλο.
Αρχίζει η έρευνα για την ακτινοβόληση τροφίμων.
- 1960 Οι C. Duncan και D. Strong αποδεικνύουν ότι η τροφική δηλητηρίαση από τον *Cl. perfringens* προκαλείται από μία τοξίνη.
Ανακαλύπτεται ο ρόλος των μυκοτοξινών όταν ξεσπά η «νόσος X των γαλοπούλων (turkey X disease)» στα πουλερικά.



Η ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA αποτέλεσε ένα τεράστιο άλμα στην ιστορία της μικροβιολογίας.

- 1970
- Ο S. Cohen ανακαλύπτει το γενετικό ανασυνδυασμό βακτηρίων.
 - Ο Larry McKay αναφέρει την ύπαρξη πλασμιδίων σε gram-θετικά βακτήρια.
 - Εισαγωγή της «καλής βιομηχανικής πρακτικής» σε τρόφιμα χαμηλής οξύτητας.
 - Η εφεύρεση των μονοκλωνικών αντισωμάτων θέτει τις βάσεις για τη μαζική παραγωγή ανοσολογικών τεστ με βάση τα αντισώματα.
- 1980
- Το πρώτο επίσημα αναγνωρισμένο κρούσμα λιστερίωσης.
 - Η *Escherichia coli* O157:H7 αναγνωρίζεται για πρώτη φορά ως παθογόνο.
 - Πρώτη γενετική ανίχνευση της σαλμονέλλας.
 - Ανακαλύπτεται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).
 - Ανακαλύπτονται τα prions.
- 1990
- Η ακτινοβόληση γίνεται αποδεκτή για τον έλεγχο των παθογόνων στο κρέας και τα πουλερικά.
 - Η κρίση των «τρελών αγελάδων» χτυπά το Ηνωμένο Βασίλειο.
 - Η Διεύθυνση Γεωργίας των ΗΠΑ απαιτεί την εφαρμογή του HACCP.

Η ακτινοβόληση γίνεται αποδεκτή για τα αυγά με κέλυφος.

Οι ανησυχίες για τη βιοτρομοκρατία και την πιθανή σκόπιμη μόλυνση των τροφίμων οδηγούν στη θέσπιση νέων νόμων για την καταγραφή των εγκαταστάσεων παραγωγής, την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων και την δήλωση και προέγκριση των εισαγωγών τροφίμων.

Το πρώτο κρούσμα τρελής αγελάδας στις Ηνωμένες Πολιτείες.

2000

Η ακτινοβόληση γίνεται αποδεκτή για το φρέσκο μαρούλι και σπανάκι

Το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA) υποδεικνύει ότι η διαδικασία της υψηλής πίεσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία του κρέατος, των πουλερικών και των επεξεργασμένων προϊόντων αυγών χωρίς έγκριση

Η πράξη εκσυγχρονισμού της ασφάλειας των τροφίμων παρέχει προληπτικούς ελέγχους για την ανθρώπινη τροφή και για την τροφή για τα ζώα

2016

Η παρούσα κατάσταση

* Ο πίνακας ολοκληρώθηκε από διάφορες πηγές.



Κεφάλαιο 2

Μικροβιακή ανάπτυξη, Επιβίωση & Θανάτωση στα Τρόφιμα



Το τρέφιμο ως οικοσύστημα

Ταξινόμηση των οργανισμών ανάλογα με τις απαιτήσεις σε O₂

- **Υποχρεωτικά Αερόβιοι:** αποκτούν ενέργεια από οργανικές χημικές ενώσεις μόνο παρουσία οξυγόνου (ο₂ ατμόσφαιρας 21%)
- **Προαιρετικά Α(να)ερόβιοι:** αποκτούν ενέργεια από οργανικές χημικές ενώσεις είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου
- **Μικροαερόφιλοι:** παρουσία οξυγόνου χαμηλότερης συγκέντρωσης από της ατμόσφαιρας (2-10%)

Αναερόβιοι:

- **Υποχρεωτικά Αναερόβιοι:** αποκτούν ενέργεια από οργανικές χημικές ενώσεις μόνο απουσία οξυγόνου (π.χ. *Clostridium*)
- **Αερανεκτικοί Αναερόβιοι:** ανέχονται – δεν επηρεάζονται από την παρουσία O₂

οι απαιτήσεις σε οξυγόνο λαμβάνονται υπόψη στην καλλιέργεια μικροοργανισμών

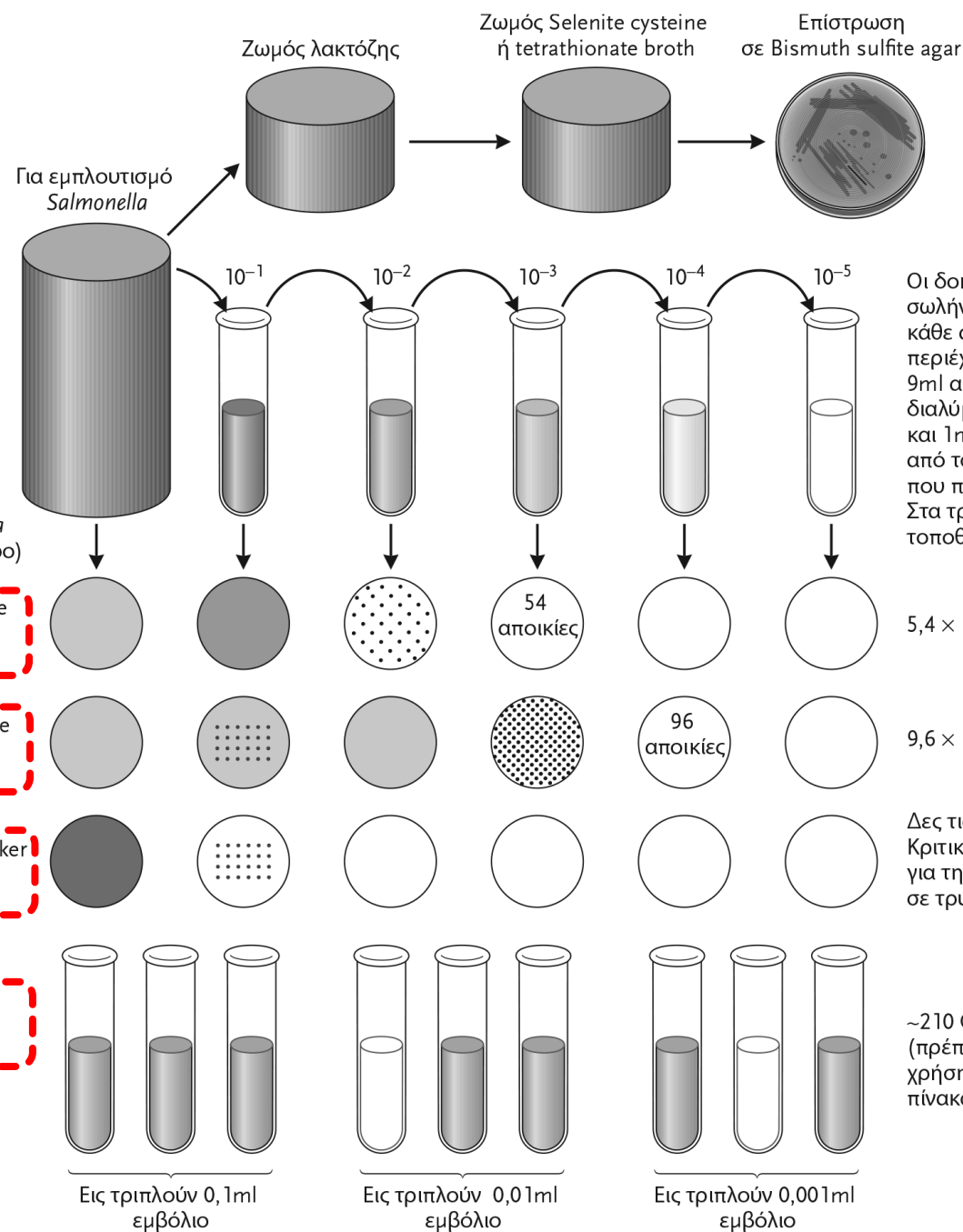
Αυτό το δείγμα περιέχει ~ 10 εκατομμύρια αναερόβιους μικροοργανισμούς, 100.000 αερόβιους, άγνωστο αριθμό του *Staphylococcus aureus*, ~ 200 κύτταρα *E. coli*, και ~ 10 κύτταρα *Salmonella* (όλα ανά χιλιοστόλιτρο)

Υπόστρωμα Total Plate count agar (αερόβια επώαση)

Υπόστρωμα Total Plate count agar (αναερόβια επώαση)

Υπόστρωμα Baird-Parker agar (για *Staphylococcus aureus*)

Θρεπτικό υγρό EC broth για τη μέθοδο NPN.



Οι δοκιμαστικοί σωλήνες κάθε αραιώσης περιέχουν 9ml αραιωτικού διαλύματος και 1ml δείγματος από τον σωλήνα που προηγείται. Στα τρυβλία τοποθετείται 0,1ml

$5,4 \times 10^5$ CFU/ml

$9,6 \times 10^6$ CFU/ml

Δες τις Ερωτήσεις Κριτικής Σκέψης για την καταμέτρηση σε τρυβλία

Μέθοδοι απαρίθμησης βακτηρίων. Το δείγμα (το οποίο αντιπροσωπεύει μια αραιώση 100) αραιώνεται μέσω μιας σειράς δεκαδικών αραιώσεων πριν από την απαρίθμηση. Για να απαριθμηθούν τα βακτήρια, τοποθετείται 0,1 ml από κάθε σωλήνα αραιώσης σε ένα τρυβλίο άγαρ με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Μετά από επώαση 24 έως 48 ωρών, μετρούνται οι αποικίες και πολλαπλασιάζονται επί τον παράγοντα αραιώσης ώστε να δώσουν το μικροβιακό φορτίο του αρχικού δείγματος ανά χιλιοστόλιτρο (ml). Η ένταση του χρώματος δείχνει την πυκνότητα της καλλιέργειας. Εάν ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν αναμένεται να είναι χαμηλός, χρησιμοποιείται η τεχνική του πλέον πιθανού αριθμού (MPN). Σε αυτή την περίπτωση, το δείγμα αραιώνεται σε τριπλές σειρές δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν το θρεπτικό μέσο, και το ποσοστό των θετικών σωλήνων χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του MPN από έναν πίνακα (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.1 Ορισμένα εκλεκτικά μέσα που χρησιμοποιούνται στη μικροβιολογία τροφίμων

Βακτήριο	Θρεπτικό μέσο	Εκλεκτικοί παράγοντες
<i>S. aureus</i>	Baird-Parker agar ^a	Χλωριούχο λίθιο, γλυκίνη, τελλουρίτης
Είδη του γένους <i>Listeria</i>	Fraser broth	Αμμωνιούχος κιτρικός σίδηρος
Οξυγαλακτικά βακτήρια	deMann-Rogosa-Sharp (MRS)	Χαμηλό pH, τασιενεργές ενώσεις (απορρυπαντικά)
Είδη του γένους <i>Campylobacter</i>	Άγαρ Abeyta-Hunt-Bark	Μικροαερόβιες συνθήκες επώασης, αντιβιοτικά

Η μεγαλύτερη τιμή για έναν μικροβιολόγο είναι να έχει έναν οργανισμό που να φέρει το όνομά του. Αμέσως μετά, και πιο εύκολο να το καταφέρει, είναι να φέρει ένα θρεπτικό μέσο το όνομά του.

Είδη θρεπτικών υλικών

- **Καθορισμένα:** ακριβή χημική σύσταση ανόργανων ή οργανικών χημικών ουσιών υψηλής καθαρότητας
- **Σύνθετα:** δεν είναι απαραίτητη η ακριβής χημική σύσταση-για την καλλιέργεια πολλών μικροοργανισμών.

Παρασκευάζονται από προϊόντα ζύμωσης υλικών μικροβιακής, ζωικής ή φυτικής προέλευσης όπως καζεΐνες (πρωτεΐνες γάλακτος), βοδινό (ζωμός κρέατος), σόγια (ζωμός σόγιας) ή άλλες ουσίες υψηλής θρεπτικής αξίας.

Εμπλουτισμένα: Σύνθετα που συμπληρώνονται με ουσίες υψηλής θρεπτικής αξίας όπως ορό, αίμα, αμινοξέα, σάκχαρα.

- **Επιλεκτικά:** αναστέλλουν αύξηση ορισμένων μικροοργανισμών, αλλά όχι άλλων.
Χρήση στη διαγνωστική μικροβιολογία, π.χ. στελέχη *Salmonella*, *Escherichia coli*.
- **Διαφορικά ή διαχωριστικά:** προστίθεται δείκτης (συνήθως χρωστική) που αποκαλύπτει αν γίνεται μία συγκεκριμένη μεταβολική αντίδραση
Χρήση στην διαγνωστική και συστηματική μικροβιολογία

Πίνακας 2.3 Πίνακας MPN*

Αριθμός θετικών σωλήνων			MPN/g	Όρια τιμών διαστήματος 95% εμπιστοσύνης		Αριθμός θετικών σωλήνων			MPN/g	Όρια τιμών διαστήματος 95% εμπιστοσύνης	
0,10	0,01	0,001		Χαμηλό	Υψηλό	0,10	0,01	0,001		Χαμηλό	Υψηλό
0	0	0	<3,0		9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,1	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	18	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1.000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1.000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2.000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1.100	180	4.100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1.000	420	

* Για τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες με 0.1-, 0.01-, και 0.001-g εμβολίου

Πηγή: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm1096546.htm>.

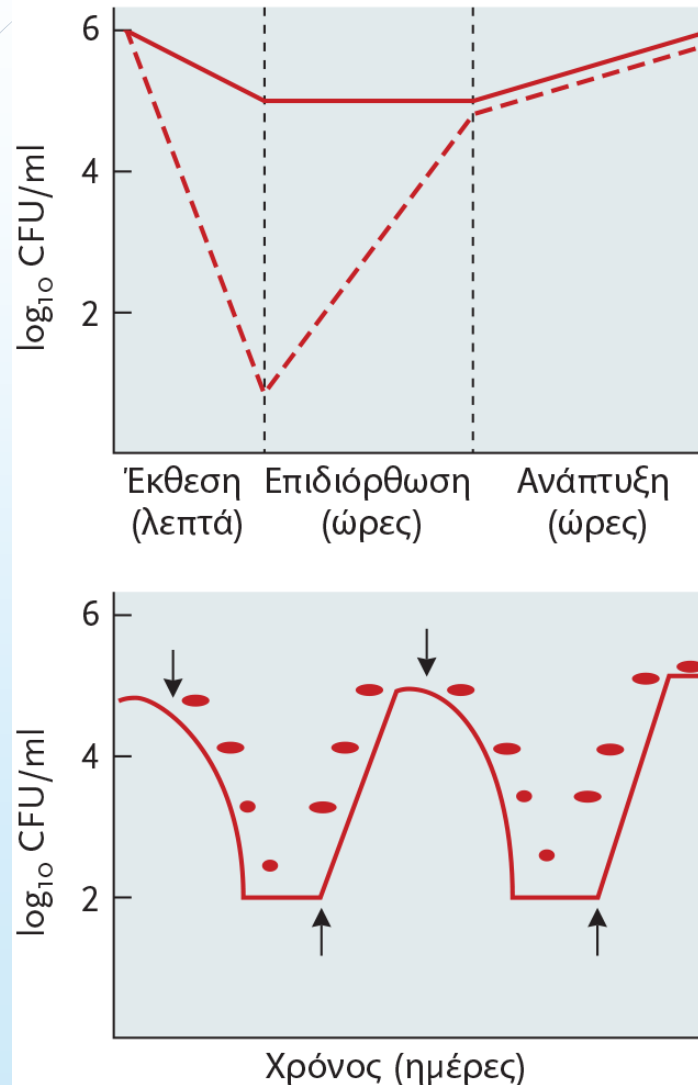
Μέθοδοι Εκτίμησης του Πλέον Πιθανού Αριθμού (MPN)

Πίνακας 2.2 Η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας και της μεθόδου απαρίθμησης στις τιμές $D_{55}^{\circ\text{C}}$ που προσδιορίστηκαν πειραματικά για τη *L. monocytogenes*.

Τιμή $D_{55}^{\circ\text{C}}$ (min)				
	Μέσο TSAY		Μέσο McBride	
Ατμόσφαιρα	+ Θερμικό σοκ	- Θερμικό σοκ	+ Θερμικό σοκ	- Θερμικό σοκ
Αερόβια	18.7	8.8	9.5	6.6
Αναερόβια	26.4	12.0	Όχι ανάπτυξη	Όχι ανάπτυξη

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τραυματισμός κυττάρων & Βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα



Ενδεικτικά στοιχεία τραυματισμού και επιδιόρθωσης βλαβών ή ζωντανών αλλά μη καλλιεργήσιμων κυττάρων. Στο επάνω μέρος έχουμε τα αποτελέσματα της έκθεσης των κυττάρων σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα και την επιστροφή τους σε εκλεκτικό υπόστρωμα (π.χ deoxycholate citrate lactose sucrose agar, διακεκομμένη γραμμή) και σε μη εκλεκτικό μέσο (π.χ tryptic soy agar, συμπαγή γραμμή). Η μείωση των CFU στο μη εκλεκτικό μέσο αντιπροσωπεύει την πραγματική θνησιμότητα, ενώ η διαφορά μεταξύ των τιμών που επιτεύχθηκαν και στα δύο μέσα ορίζεται ως τραυματισμός. Κατά την επιδιόρθωση (ανάρρωση), η ανθεκτικότητα στα εκλεκτικά αντιδραστήρια ανακτάται και η τιμή που επιτυγχάνεται στο εκλεκτικό μέσο προσεγγίζει αυτή του μη εκλεκτικού μέσου. Στο κάτω μέρος έχουμε την μείωση της βιωσιμότητας κατά την διάρκεια μιας καταπόνησης (↓) όταν τα βακτήρια καλλιεργούνται σε μη εκλεκτικό μέσο. Τα έντονα σχήματα αντιπροσωπεύουν την κυτταρική μορφολογία καθώς τα κύτταρα εισέρχονται στην κατάσταση της βιωσιμότητας αλλά μη καλλιεργησιμότητας. Σημειώστε ότι όταν ο στρεσογόνος παράγοντας απομακρυνθεί (↑), τα κύτταρα γίνονται καλλιεργήσιμα και αποκτούν πάλι την κανονική τους μορφολογία.

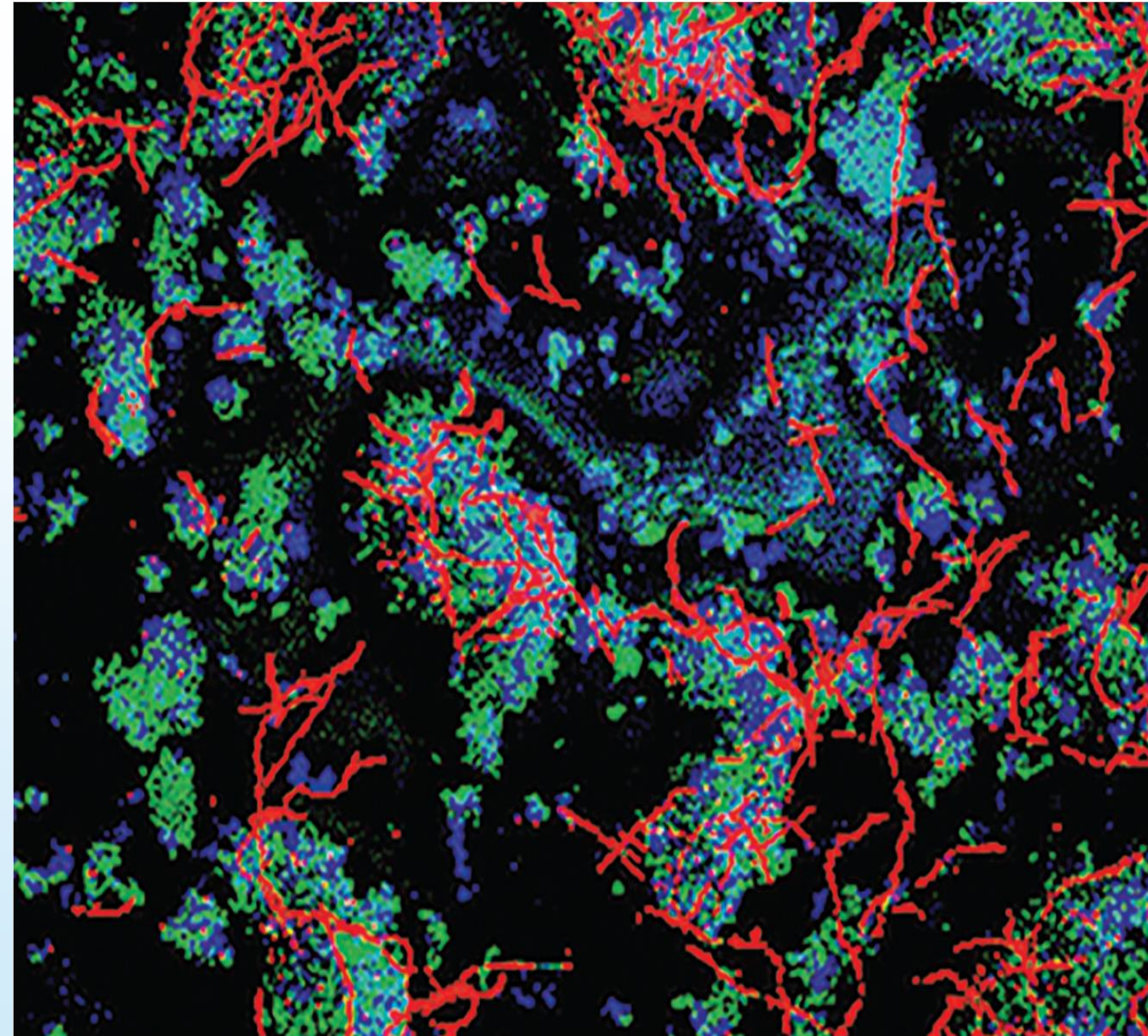
Παράδειγμα Κυτταρικής Σηματοδότησης

σε Τροφογενή Μικρόβια:

- *Quorum sensing*
- Μεταγωγή σήματος

Βιοφίλμ

Συγκεντρωτικό μικρογράφημα κοινοτήτων βιοφίλμ τριών ειδών που λήφθηκαν στις 18 ώρες ανάπτυξης του βιοφίλμ με μοναδική θρεπτική πηγή το σάλιο. Τα ανθρώπινα στοματικά βακτήρια *Streptococcus oralis* (πράσινο), *Veillonella sp.* (μπλε) και το *Fusobacterium nucleatum* (κόκκινο) αναπτύσσονται σε μια κυψελίδα ροής και δείχνουν οικείες αλληλεπιδράσεις σε κάθε κοινότητα και ενσωματωμένες ενδοκοινοτικές συνδέσεις. (Από Periasamy S, Kolenbrander P, *J Bacteriol* **192**:2965–3972, 2010).





Ενδογενείς παράγοντες

pH, ενεργότητα νερού & θερμοκρασία

Πίνακας 2.4 Τυπικές τιμές pH διαφόρων τροφίμων

pH	Τρόφιμο (α)
>7,0	Ασπράδι αυγού, καβούρι, γλυκό καλαμπόκι
7,0-6,5	Γάλα, ζαμπόν, μπέικον, πουλερικά, ψάρια, γαρίδες
6,5-5,3	Ωμό βόειο κρέας, λαχανικά, κρέας συσκευασμένο σε κενό, πεπόνια
5,3-4,5	Τυρί cottage, λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση, αλλαντικά (π.χ. χωριάτικο λουκάνικο), πολλές σάλτσες και σούπες
<4,5	Ντομάτες, φρούτα και χυμοί φρούτων, γιαούρτι, τουρσιά, ξινολάχανο

Είδη θρεπτικών υλικών

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

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

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

Η παρεμποδιστική δράση των υποστρωμάτων μπορεί να επιτευχθεί με διόρθωση του pH στο θρεπτικό υπόστρωμα ή προσθήκη αντιβιοτικού ή προσθήκη ουσιών που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση διαφορετικών γενών μεταξύ τους.



Salmonella enterica Typhimurium

Διαθέτει τρεις μηχανισμούς ρύθμισης pH

1. Ομοιόστασης $\text{pH} > 6.0$
2. Αντίδραση οξυαντοχής $6.0 < \text{pH} > 5.5$
3. Σύνθεση πρωτεϊνών όξινου σοκ $5.0 < \text{pH} > 3.0$

Ενεργότητα νερού

Η ενεργότητα νερού (a_w) είναι το μέτρο του διαθέσιμου νερού ή, μιλώντας αυστηρά, της ενέργειας του νερού στα τρόφιμα. Η a_w ορίζεται ως ο λόγος της τάσης ατμών του νερού σε ένα τρόφιμο, P , προς την τάση ατμών καθαρού νερού, P_0 , στην ίδια θερμοκρασία:

$$a_w = P/P_0$$

Ο AquaLab Series 3 είναι ένας μετρητής ο οποίος χρησιμοποιεί το σημείου δρόσου για την μέτρηση της a_w (Παραχώρηση του Decagon Devices).



Πίνακας 2.5 Θεωρητικές ποσότητες χλωριούχου νατρίου και σακχαρόζης που απαιτούνται για να επιτευχθούν διάφορες a_w .

a_w	Αλάτι		Ζάχαρη	
	Molality*	%	Molality	%
0,99	0,3	1,7	0,6	17,0
0,98	0,5	2,8	1,1	27,3
0,96	1,1	6,0	2,3	44,0
0,94	1,0	9,5	3,6	55,3
0,92	2,4	12,3	4,9	62,6
0,90	3,1	15,		
0,88	3,7	17,8		
0,86	4,5	20,8		
0,84	5,3	23,7		
0,80	6,9	28,8		
0,75	9,2	34,9		
0,70	11,9	41,0		
0,65	15,0	46,7		
0,60	18,5	52,0		

* Θυμάστε τη διαφορά ανάμεσα στη molality και molarity;

Πίνακας 2.6 Τυπικές a_w σε διάφορα τρόφιμα*

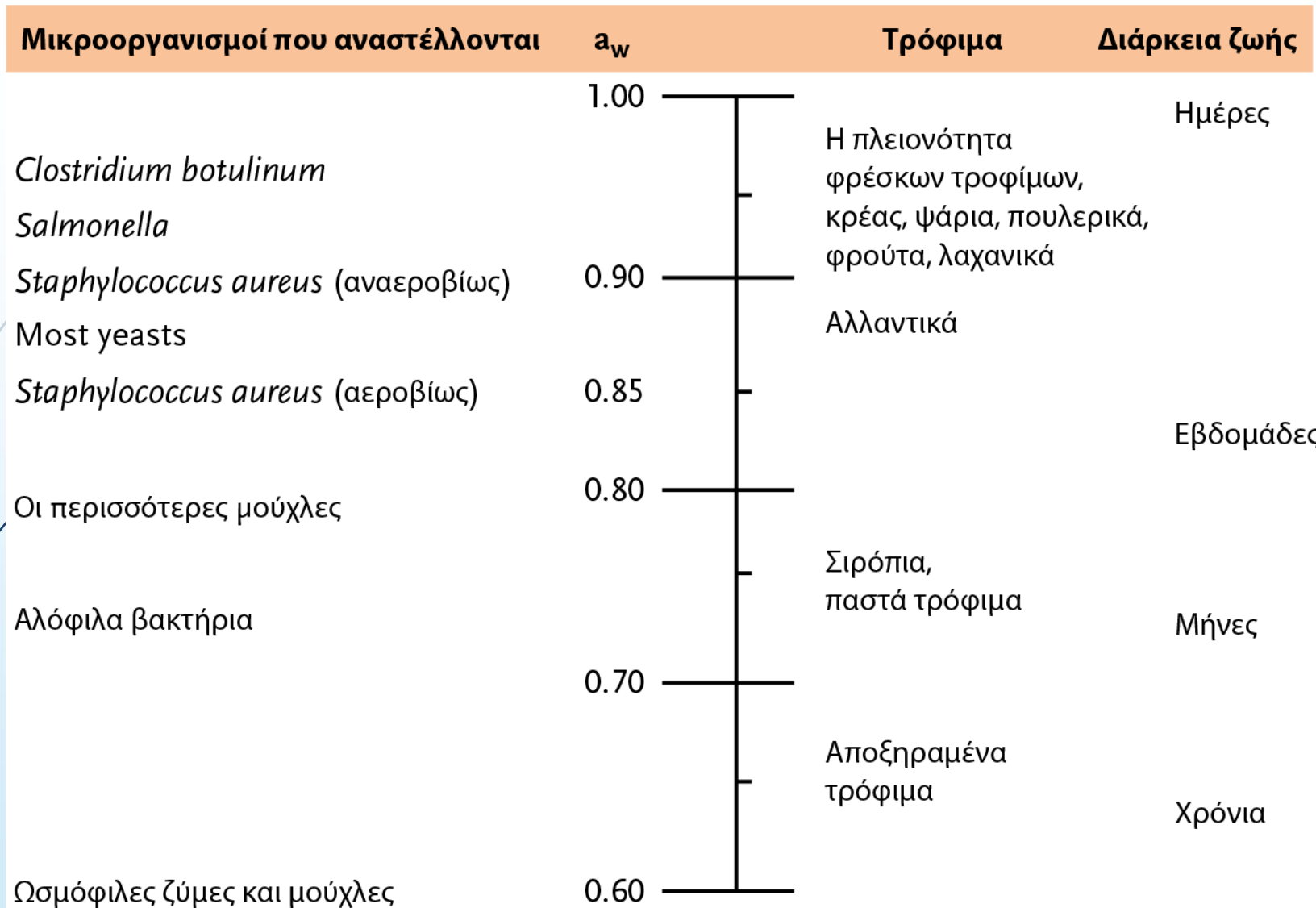
Τρόφιμα	a_w
Φρέσκα, νωπά φρούτα, λαχανικά,	
Κρέας και ψάρια	>0,98
Μαγειρεμένο κρέας, ψωμί	0,95-0,98
Παστά προϊόντα κρέατος, τυριά	0,87-0,91
Μαρμελάδες	0,75-0,80
Γλυκά	0,65-0,75
Ξηραμένα φρούτα	0,60-0,65
Αποξηραμένες φιδές, μπαχαρικά,	
Σκόνη γάλακτος	0,20-0,60

* Ανατύπωση από Farkas J, p. 567–591, in Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, ed, *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed, ASM Press, Washington, DC, 2001.

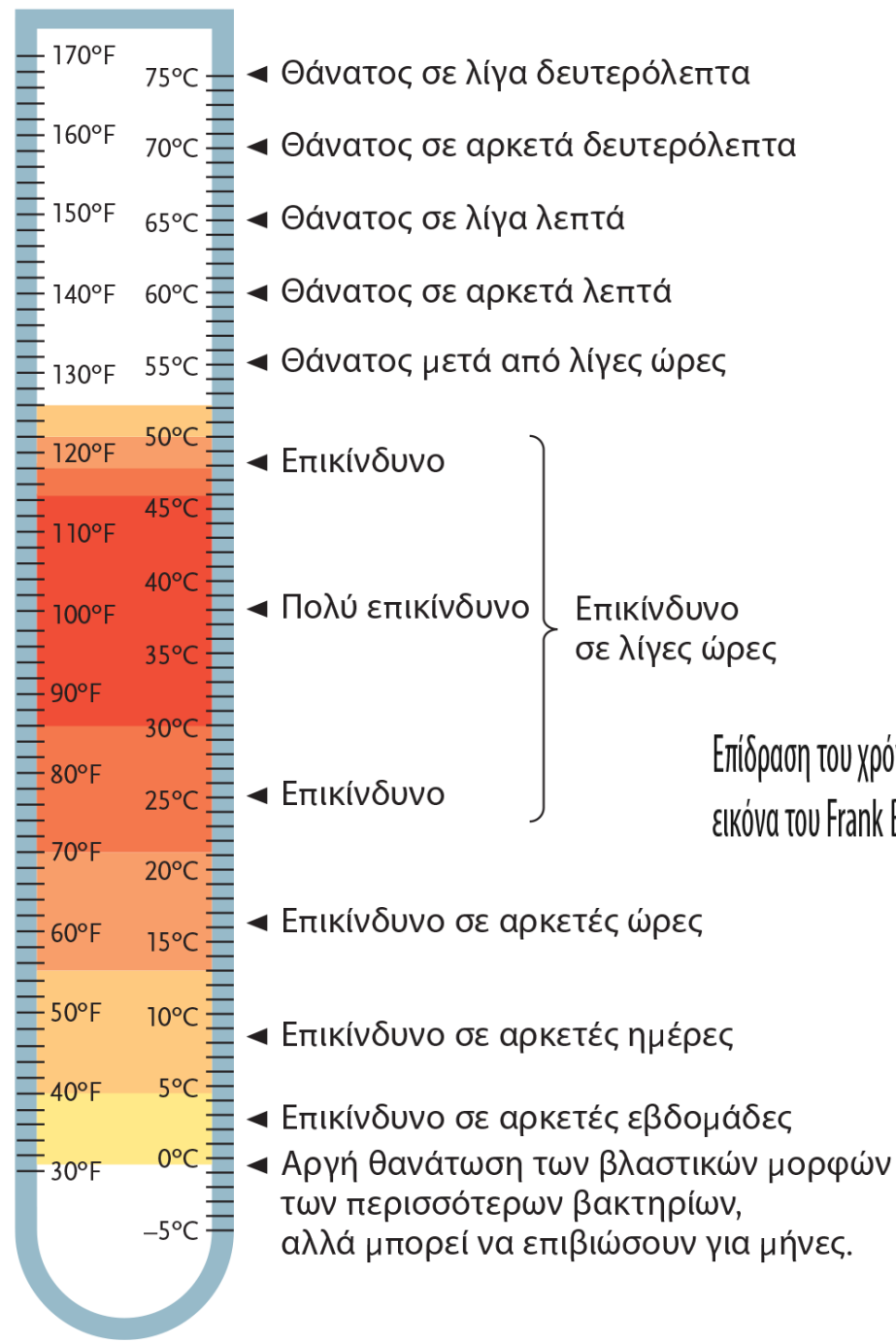
Πίνακας 2.7 Ελάχιστη απαίτηση σε a_w για την ανάπτυξη τροφογενών μικροβίων στους 25°C*

Ομάδες μικροοργανισμών	Ελάχιστη απαίτηση σε a_w
Τα περισσότερα βακτήρια	0,91-0,88
Οι περισσότερες ζύμες	0,88
Συνηθισμένοι μύκητες	0,80
Αλόφιλα βακτήρια	0,75
Ξηροάντοχοι μύκητες	0,71
Ξηρόφιλοι μύκητες και οσμώφιλες ζύμες	0,62-0,60

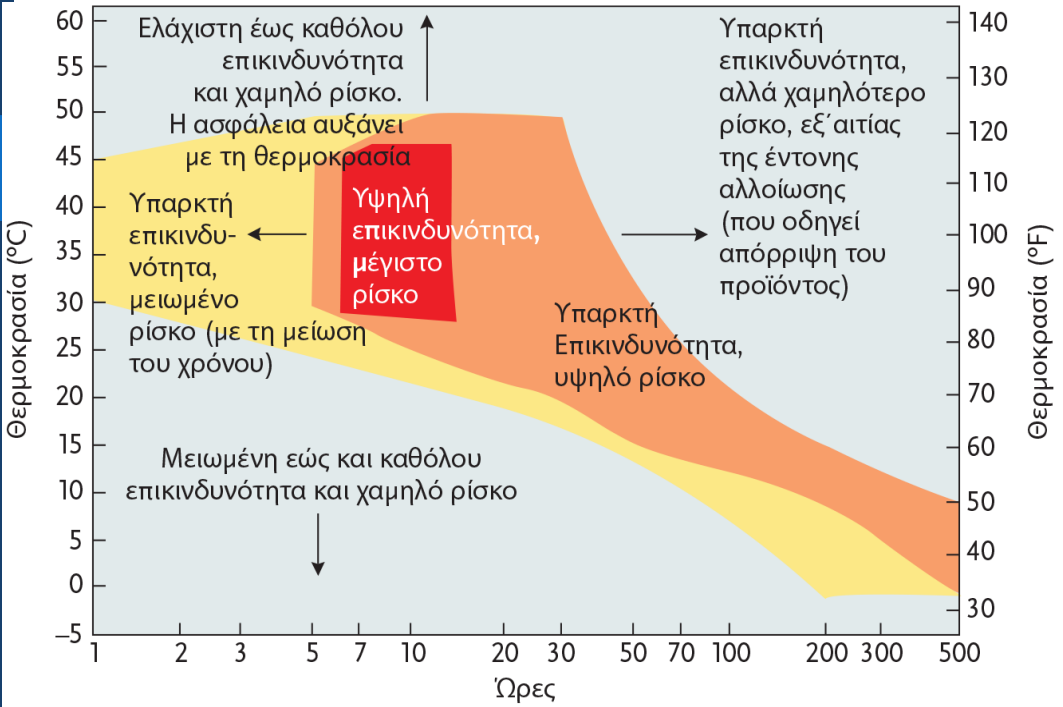
* Ανατύπωση από Farkas J, p. 567–591, in Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, ed, *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed, ASM Press, Washington, DC, 2001.



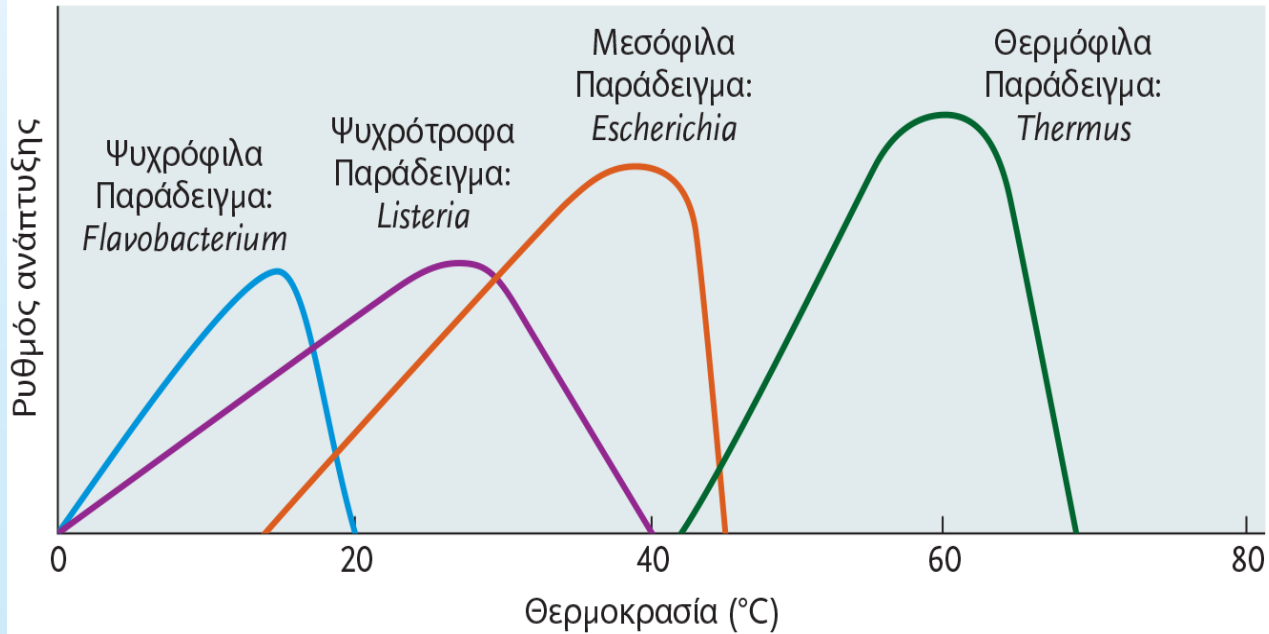
Απεικόνιση της επίδρασης της a_w στην διάρκεια ζωής και στην μικροβιακή ανάπτυξη



Επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας στα βακτήρια. (Ανατύπωση από μια εικόνα του Frank Bryan, με άδεια του περιοδικού Food Safety.)



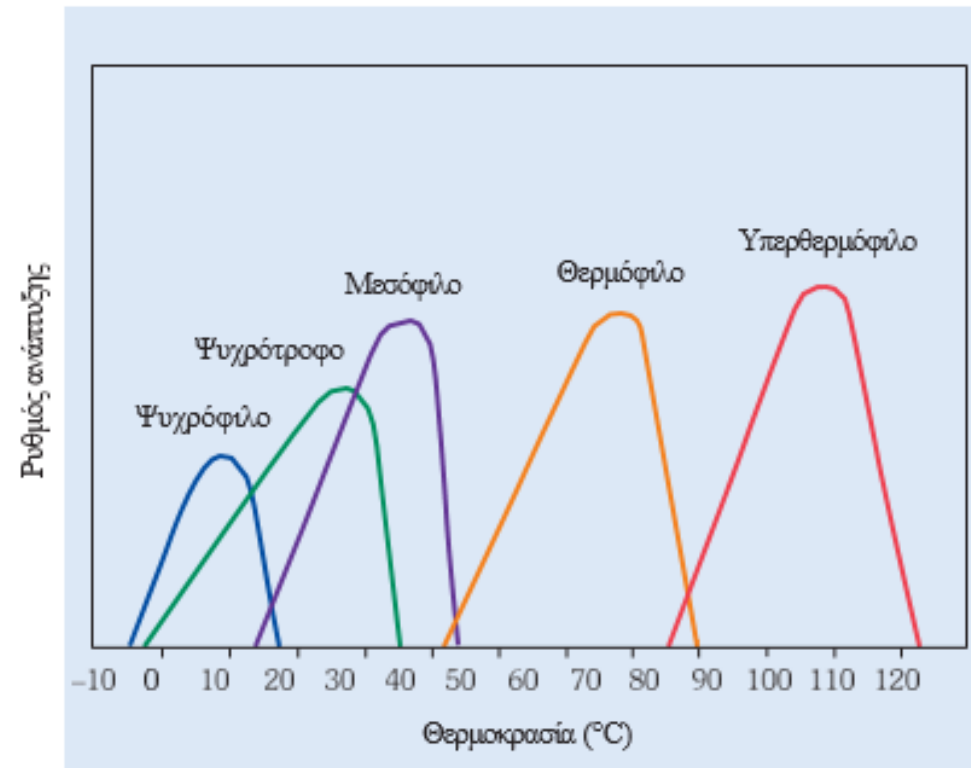
Μια πιο προχωρημένη ανάλυση του χρόνου και της θερμοκρασίας επιτρέπει σε κάποιον να αξιολογήσει την επικινδυνότητα και το ρίσκο ασφάλειας. (Ανατύπωση από μια εικόνα του Frank Bryan, με άδεια του περιοδικού Food Safety. Σημείωση ο x άξονας είναι σε λογαριθμική κλίμακα.)



Σχετικοί ρυθμοί ανάπτυξης βακτηρίων σε διαφορετικές θερμοκρασίες. (Redrawn from Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, ed, Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed, ASM Press, Washington, DC, 2001.)

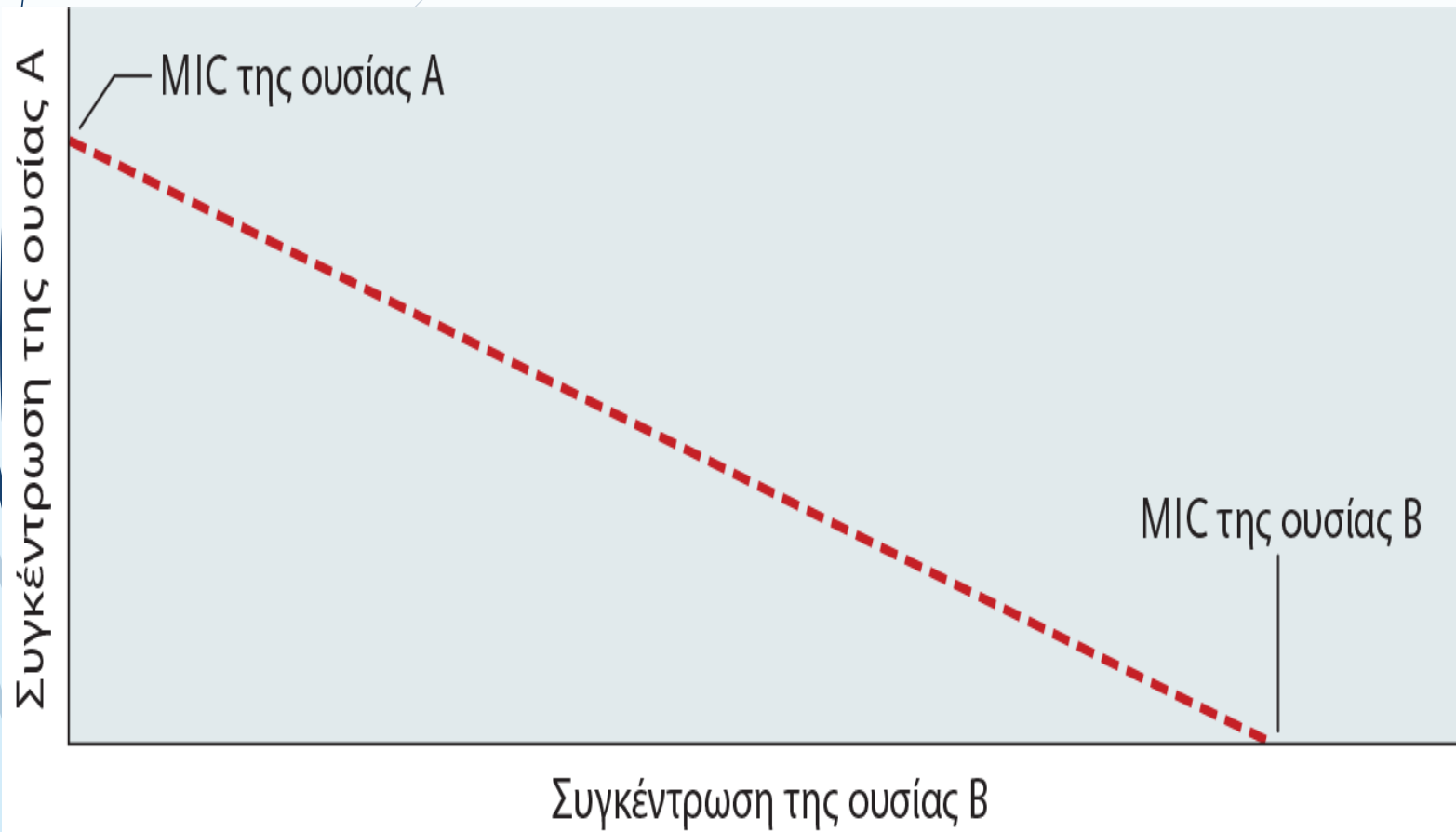
Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη

- ✓ Θρεπτικά συστατικά, O^2
- ✓ Συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου – pH: ουδετερόφιλοι/ οξεόφιλοι/ αλκαλιόφιλοι.
- ✓ Θερμοκρασία & hsp proteins:
 - Ψυχρόφιλοι: $-5 - 15^{\circ}C$
 - Ψυχρότροφοι: $20 - 30^{\circ}C$
 - Μεσόφιλοι: $30 - 37^{\circ}C$
 - Θερμόφιλοι: $50 - 60^{\circ}C$
 - υπερθερμόφιλοι: $\geq 100^{\circ}C$
- ✓ Αερισμός (προσθήκη Αερίου σε υγρό)
- ✓ Ιοντική Ισχύς και Ωσμωτική πίεση (αλόφιλα & Ωσμόφιλα)

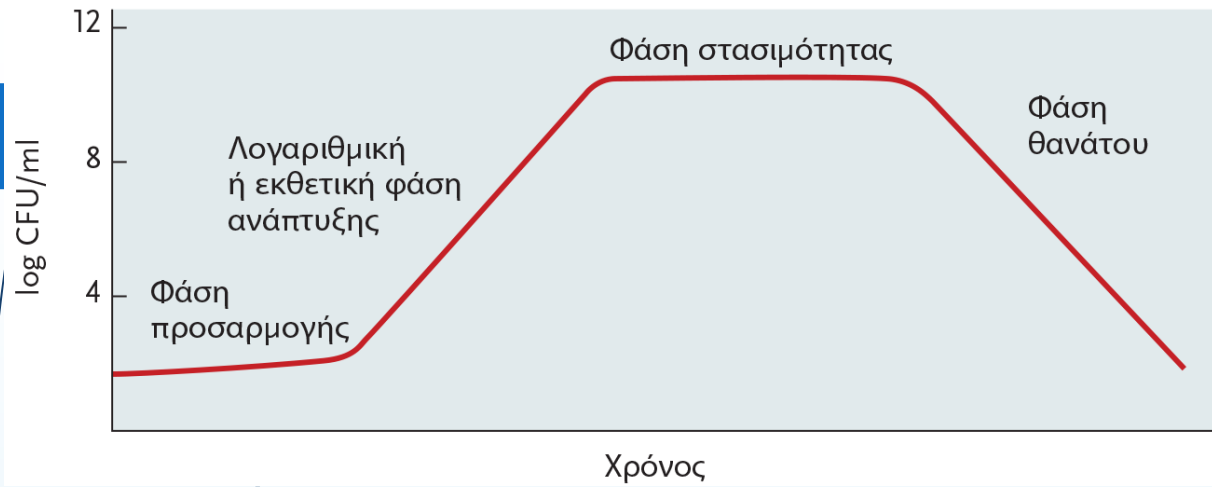


Πίνακας 2.8 Αλληλεπιδράσεις του pH και της a_w στη σταθερότητα των τροφίμων

Συνδυασμός pH και a_w	Προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης(°C)	Κατηγοριοποίηση τροφίμων
pH >5,0 και a_w >0,95	<4	Αλλοιώνονται εύκολα
pH 5,0–5,2 και a_w 0,90–0,95	<10	Αλλοιώσιμα
pH <5,2 και a_w <0,95 ή pH <5,0 ή a_w <0,90	Μπορεί να μην απαιτείται ψύξη	Σταθερά στο ράφι



Ένα διάγραμμα που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δυο αντιμικροβιακών αναστολέων (δες στο κείμενο).

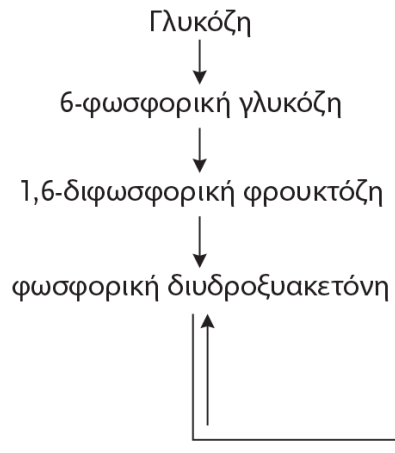


Όλα τα τμήματα της μικροβιακής καμπύλης ανάπτυξης επηρεάζονται από το χρόνο και τη θερμοκρασία

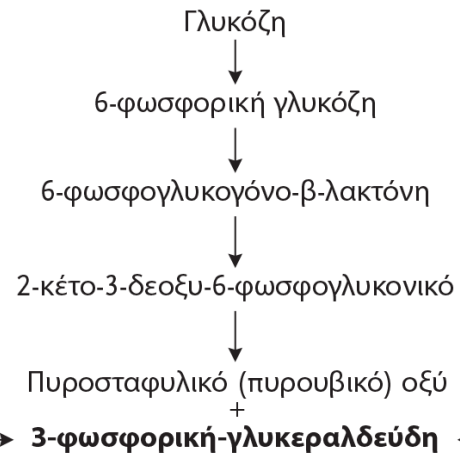
Πίνακας 2.9 Αντιπροσωπευτικοί ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης και χρόνοι διπλασιασμού των μικροοργανισμών

Οργανισμός και Συνθήκες	μ (h^{-1})	t_d (h)
Βακτήρια		
Βέλτιστες Συνθήκες	2,3	0,3
Περιορισμένα θρεπτικά συστατικά	0,20	3,46
Ψυχρότροφα, 5°C	0,023	30
Μούχλες		
Βέλτιστες Συνθήκες	0,1-0,3	6,9-20

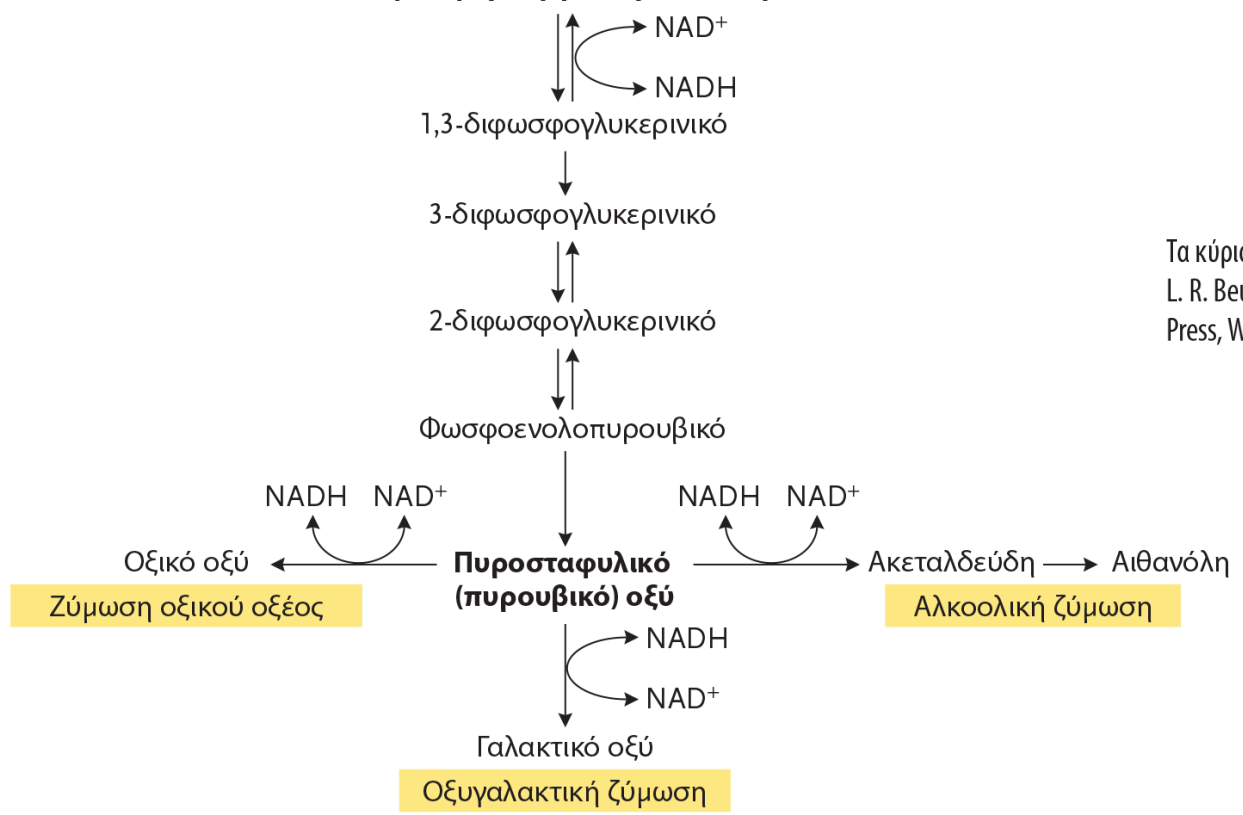
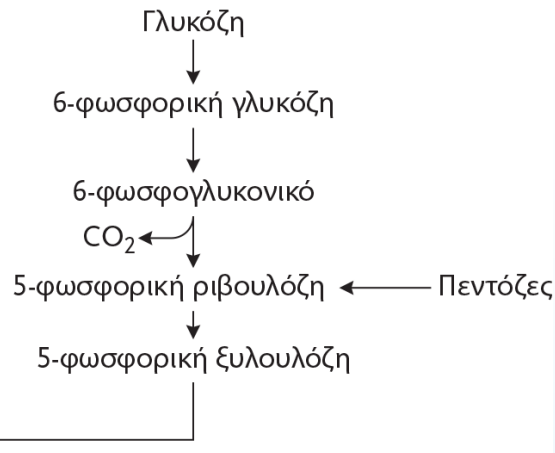
Μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas



Μονοπάτι Entner-Doudoroff



Ετεροζυμωτικό μονοπάτι



Τα κύρια καταβολικά μονοπάτια που χρησιμοποιούνται από τα τροφογενή βακτήρια. (Πηγή: M. P. Doyle, L. R. Beuchat, και T. J. Montville (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2η έκδ. ASM Press, Washington, DC, 2001.)

Περίληψη

- Η ποσότητα της **ενέργειας** που παράγει ένα μικρόβιο εξαρτάται από τα μεταβολικά μονοπάτια που χρησιμοποιεί.
- Η **απαρίθμηση** μικροοργανισμών σε τρυβλία καθορίζει πόσοι οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα συγκεκριμένο μέσο υπό τις συνθήκες επώασης που χρησιμοποιούνται.
- Τα **εκλεκτικά μέσα** επιτρέπουν την απαρίθμηση χαμηλών πληθυσμών συγκεκριμένων παθογόνων, όταν αυτά βρίσκονται σε ένα μεγαλύτερο πληθυσμό άλλων βακτηρίων.
- Ο **εμπλουτισμός** επιτρέπει την ανίχνευση πολύ χαμηλών πληθυσμών συγκεκριμένων παθογόνων, υπό την παρουσία μεγάλου πληθυσμού άλλων βακτηρίων.
- Η **μέθοδος MPN** επιτρέπει τον υπολογισμό πολύ χαμηλών πληθυσμών βακτηρίων μέσω στατιστικών πινάκων.
- **Τραυματισμένα κύτταρα** μπορεί να μην ανιχνεύονται μέσω των μεθόδων καλλιέργειας, αλλά ωστόσο να προκαλούν ασθένειες όταν καταναλωθούν.
- Τα **βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα** κύτταρα είναι ακριβώς αυτό που λέει το όνομά τους.

Περίληψη (2)

- Οι ενδογενείς παράγοντες, όπως το **pH** και η **ενεργότητα νερού**, και οι εξωγενείς παράγοντες, όπως ο **χρόνος** και η **θερμοκρασία**, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης.
- Η **ποσότητα του διαθέσιμου νερού** (a_w) καθορίζει ποιοι οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα τρόφιμο, επηρεάζει τη φάση προσαρμογής, τον ρυθμό ανάπτυξης και την τελική πυκνότητα των κυττάρων.
- Μια a_w **0,85** είναι η **χαμηλότερη a_w η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη των παθογόνων**. Αυτό τη καθιστά μια βασική αξία της μικροβιολογίας τροφίμων.
- Η τεχνολογία παρεμποδιστών καταπονεί τα βακτήρια με διάφορους μηχανισμούς ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξή τους.
- Η καμπύλη της μικροβιακής ανάπτυξης αποτελείται
- Η εξίσωση $N = N_0 e^{\mu t}$ περιγράφει την εκθετική φάση της μικροβιακής ανάπτυξης.
- Τα βακτήρια χρησιμοποιούν διαφορετικές μεταβολικές οδούς (μονοπάτια) για να παράγουν την ενέργεια που χρειάζονται για να διατηρηθούν σε κατάσταση οργάνωσης.