



# Μικροβιολογία Τροφίμων

## Μάθημα 2<sup>ο</sup>



## Κεφάλαιο 2

Μικροβιακή ανάπτυξη, Επιβίωση & Θανάτωση στα Τρόφιμα



Το τρώσιμο ως οικοσύστημα

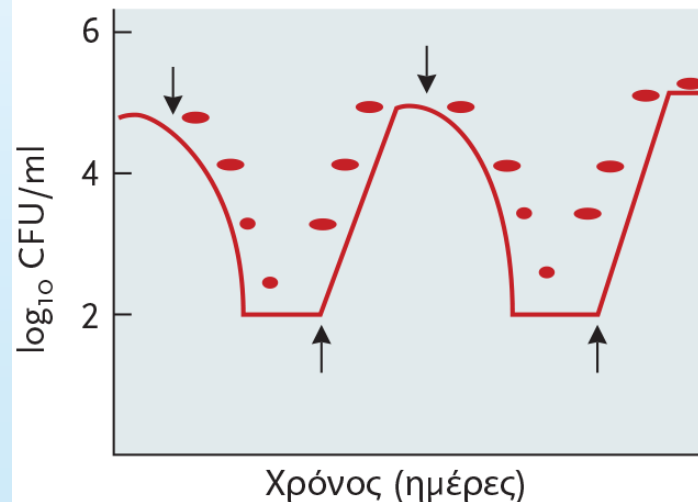
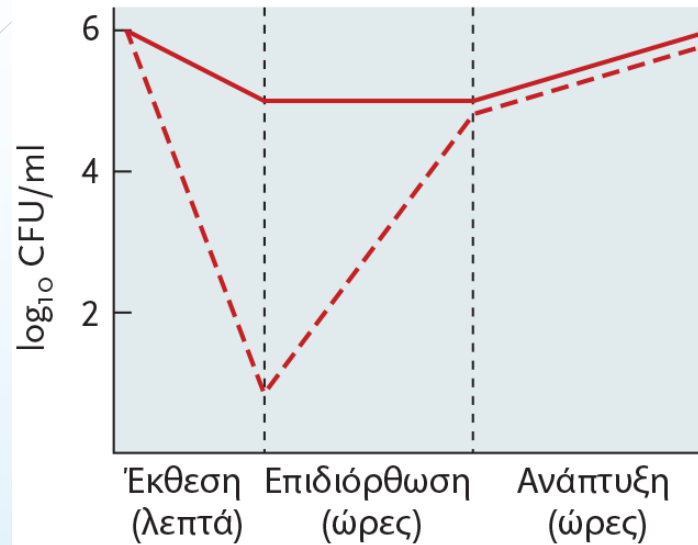
## Μέθοδοι Εκτίμησης του Πλέον Πιθανού Αριθμού (MPN)

**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.

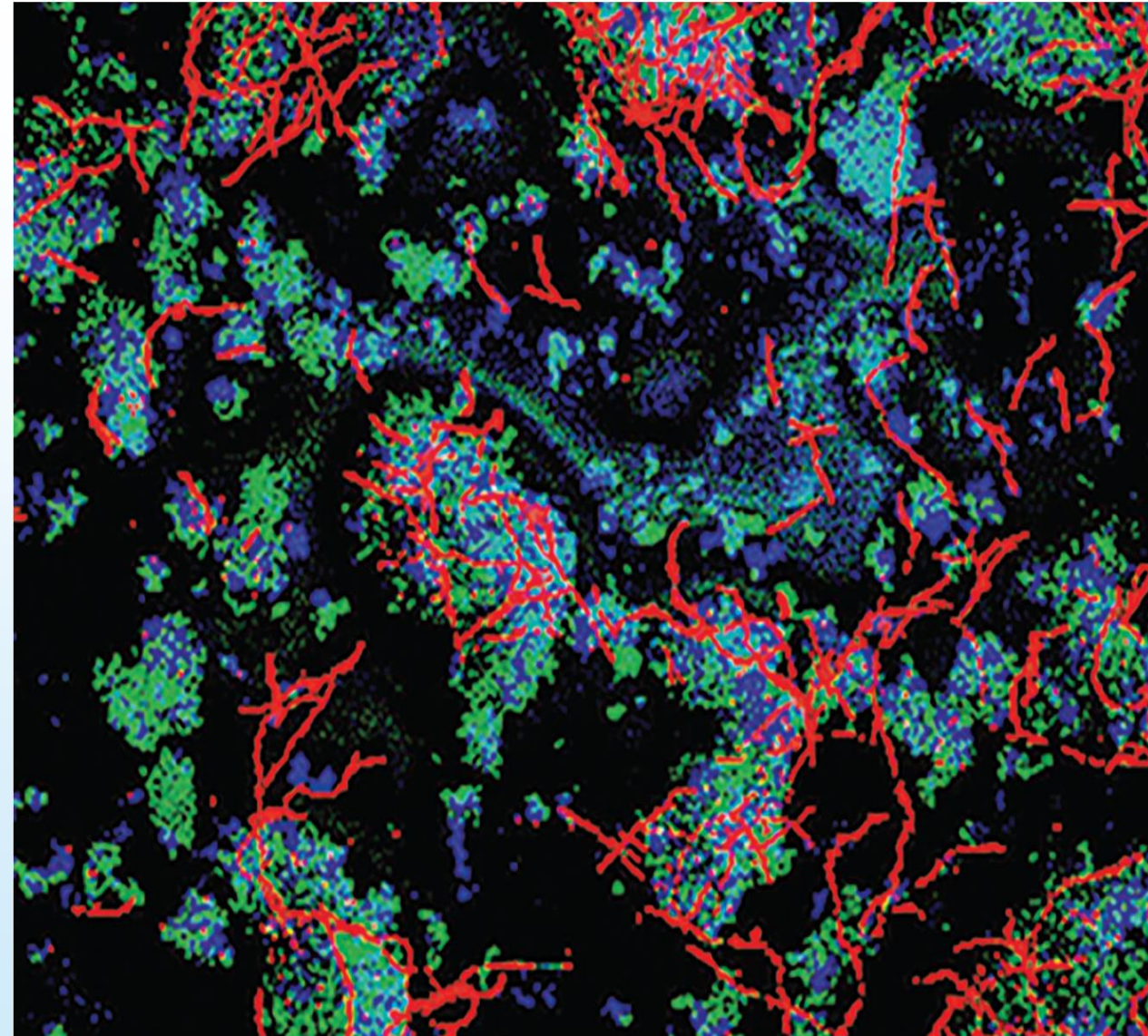
# Παράδειγμα Κυτταρικής Σηματοδότησης

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

## 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\*

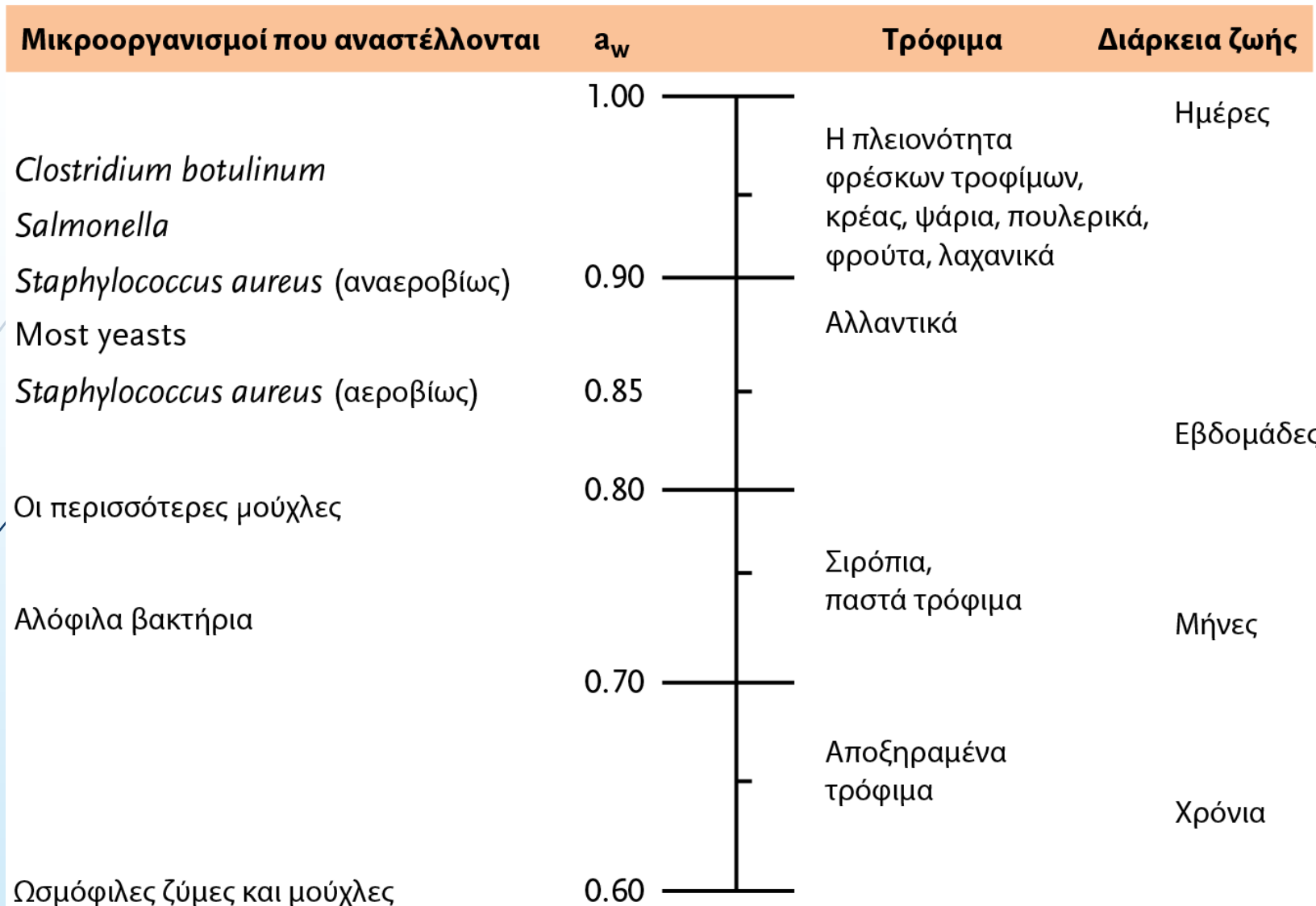
Τρόφιμα	$a_w$
Φρέσκα, νωπά φρούτα, λαχανικά,	
Κρέας και ψάρια	>0,98
Μαγειρεμένο κρέας, ψωμί	0,95-0,98
Παστά προϊόντα κρέατος, τυριά	0,87-0,91
Μαρμελάδες	0,75-0,80
Γλυκά	0,65-0,75
Ξηραμένα φρούτα	0,60-0,65
Αποξηραμένες φιδές, μπαχαρικά,	
Σκόνη γάλακτος	0,20-0,60

\* 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.

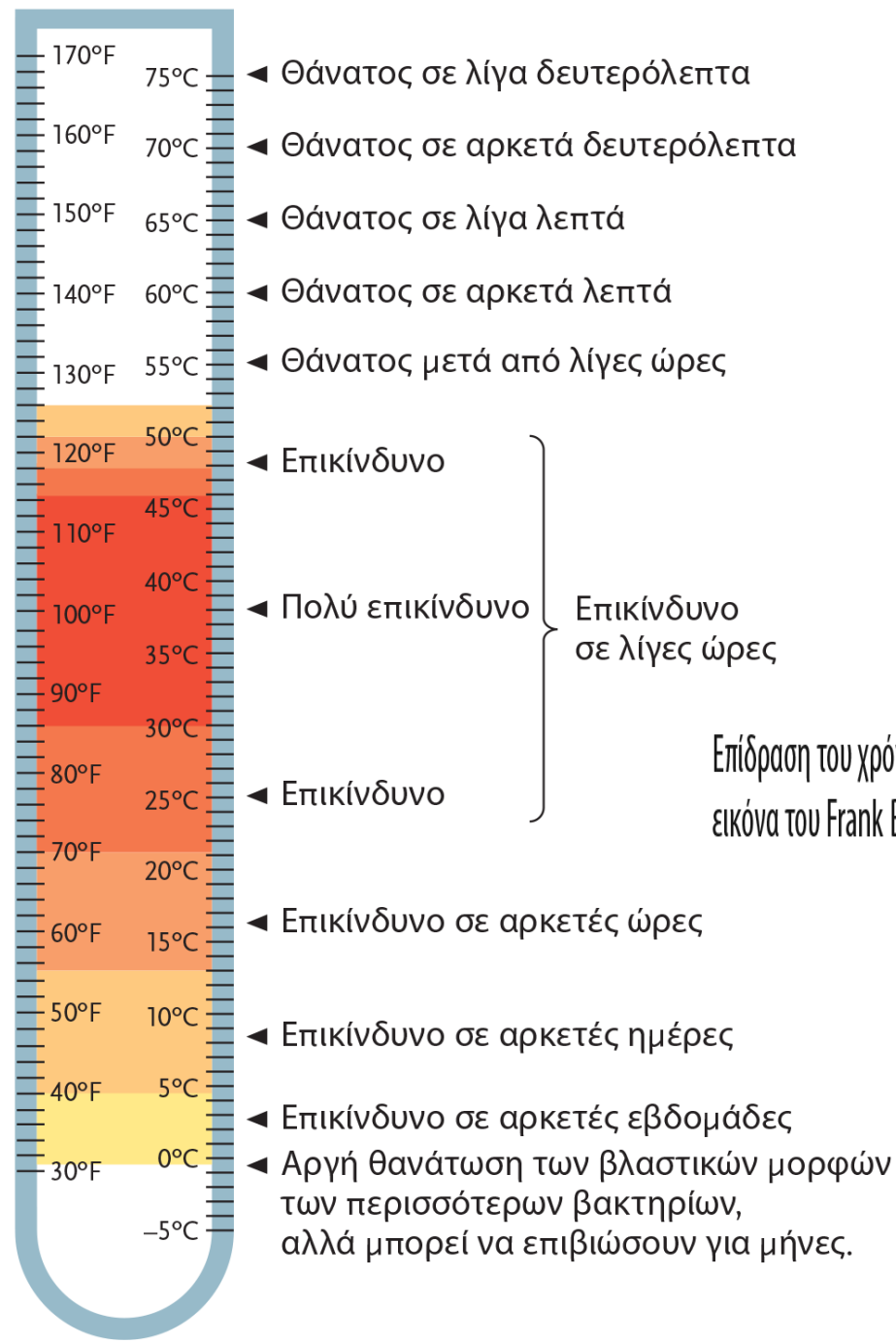


Απεικόνιση της επίδρασης της  $a_w$  στην διάρκεια ζωής και στην μικροβιακή ανάπτυξη

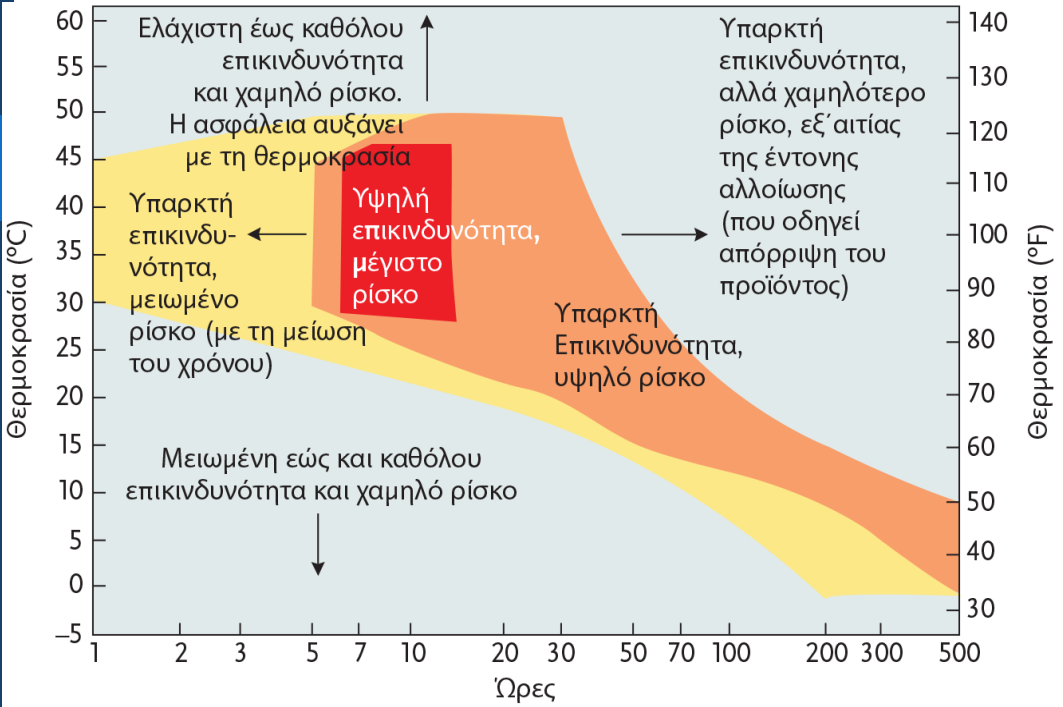


# Εξωγενείς παράγοντες

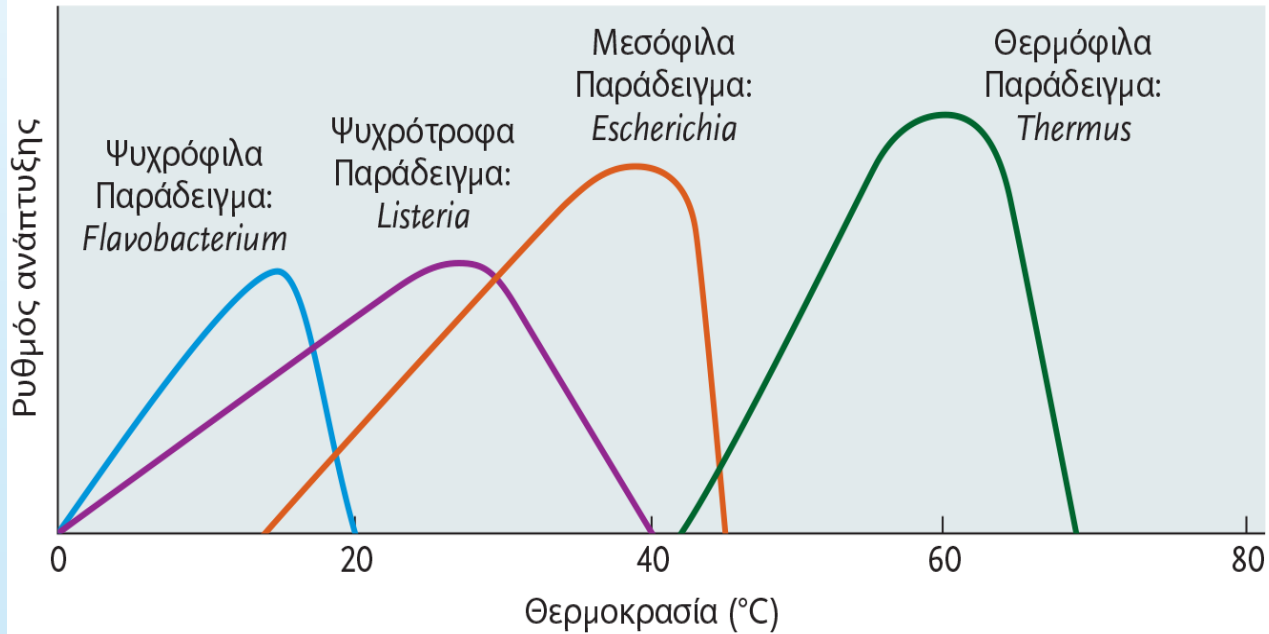
Θερμοκρασία & η σύνθεση των αερίων



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



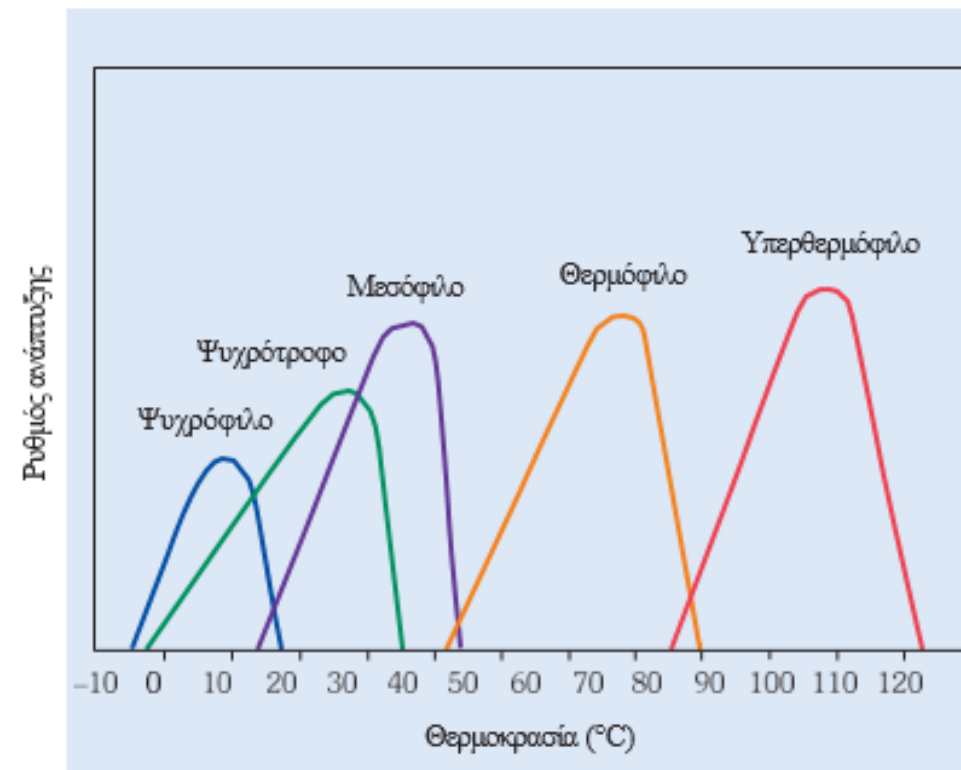
Μια πιο προχωρημένη ανάλυση του χρόνου και της θερμοκρασίας επιτρέπει σε κάποιον να αξιολογήσει την επικινδυνότητα και το ρίσκο ασφάλειας. (Ανατύπωση από μια εικόνα του Frank Bryan, με άδεια του περιοδικού Food Safety. Σημείωση ο x άξονας είναι σε λογαριθμική κλίμακα.)



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)



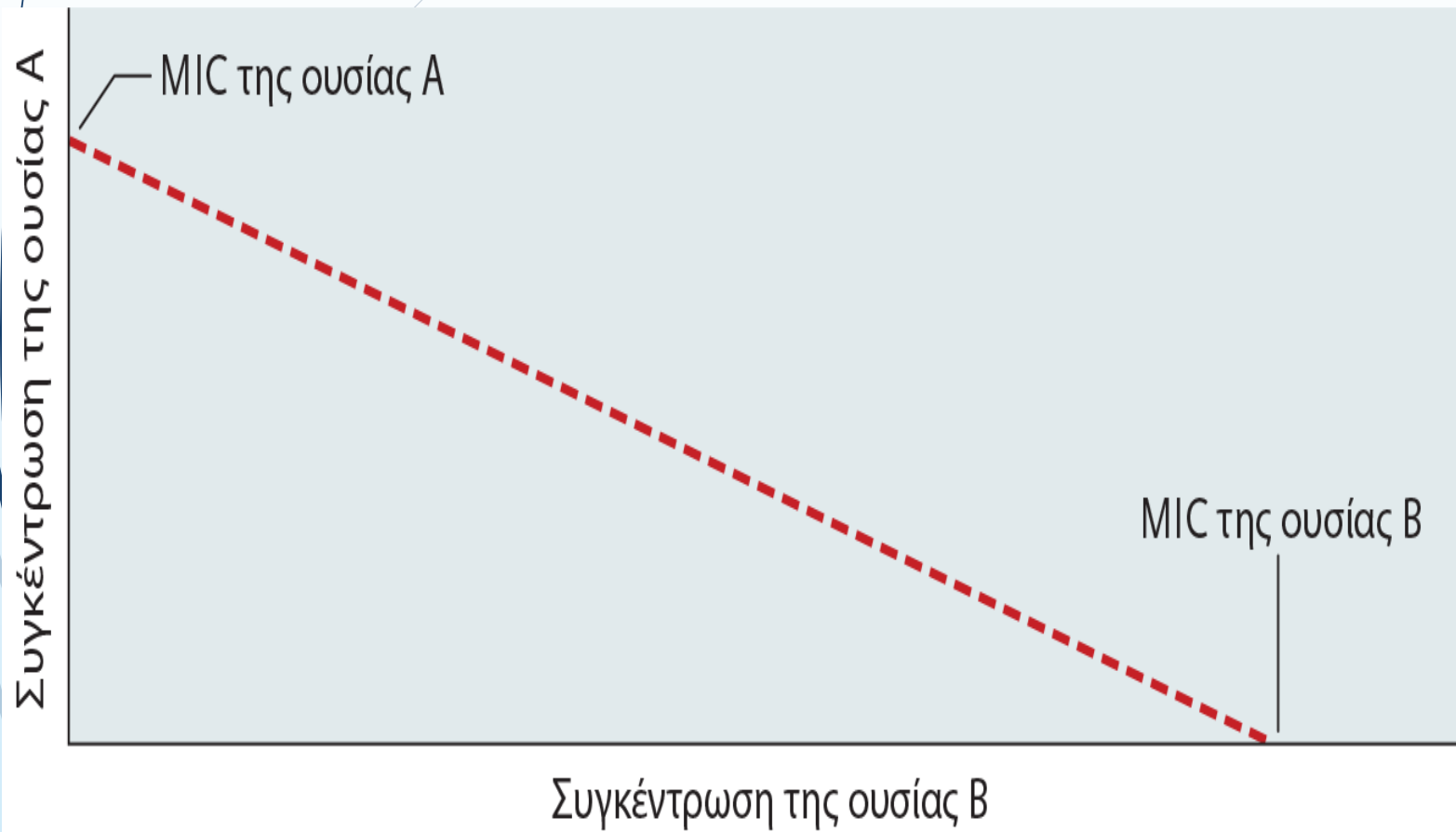
## Πίνακας 2.8 Αλληλεπιδράσεις του pH και της $a_w$ στη σταθερότητα των τροφίμων

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	Μπορεί να μην	Σταθερά στο ράφι
<5,0 ή $a_w$ <0,90	απαιτείται ψύξη	

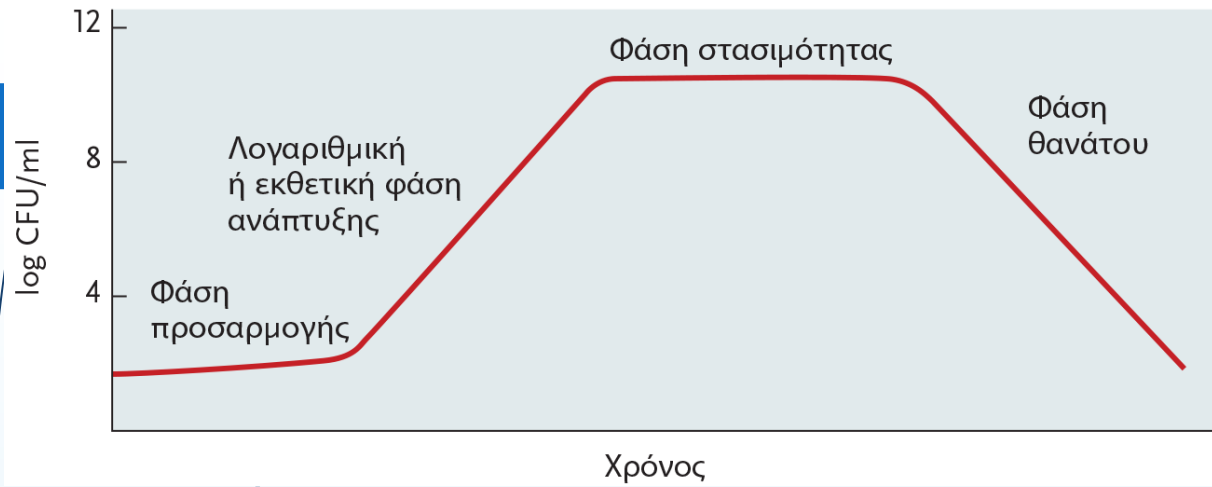


# Παρεμποδιστές

Θερμοκρασία & η σύνθεση των αερίων



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	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)
<b>Βακτήρια</b>		
Βέλτιστες Συνθήκες	2,3	0,3
Περιορισμένα θρεπτικά συστατικά	0,20	3,46
Ψυχρότροφα, 5°C	0,023	30
<b>Μούχλες</b>		
Βέλτιστες Συνθήκες	0,1-0,3	6,9-20

$N$ = αριθμός οργανισμών,  $N_0$ = αρχικός αριθμός οργανισμών ,

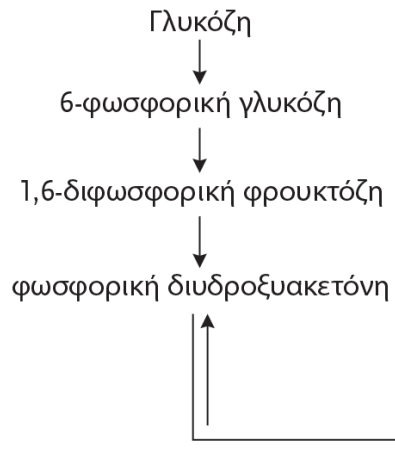
$t$ =χρονική στιγμή,  $\mu$ =ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

$$N = N_0 e^{\mu t}$$

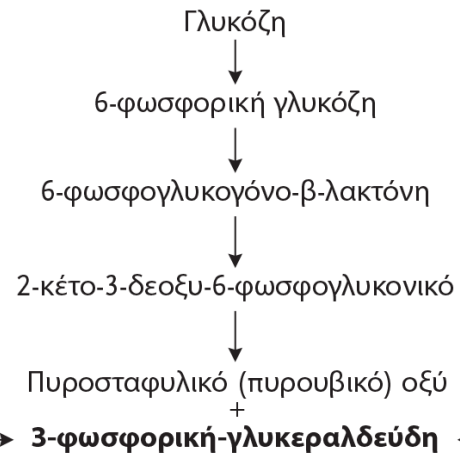
$$2,3 \log(N/N_0) = \mu \Delta t$$

$$t = [2,3 \log(10^8/10^4)]/0,025 \text{ ή } 368 \text{ ώρες.}$$

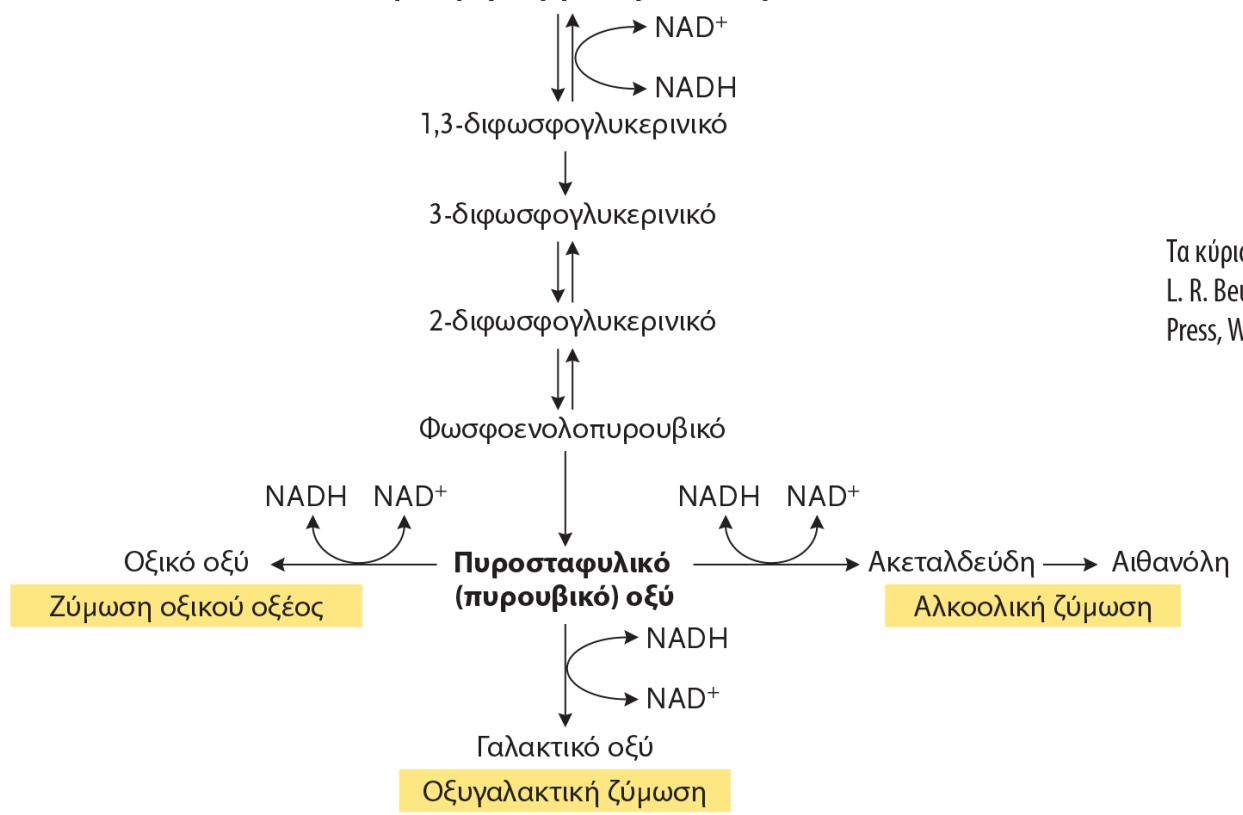
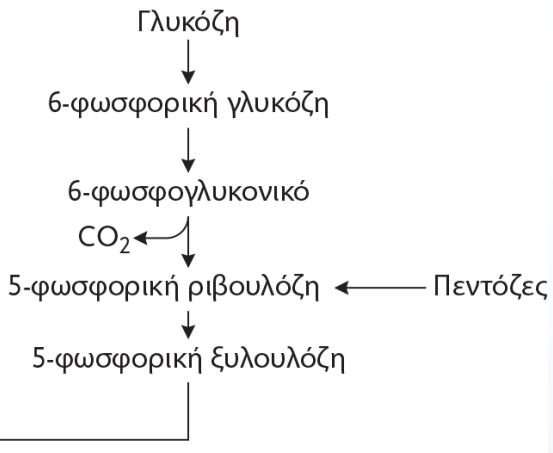
### Μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas



### 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.



# Κεφάλαιο 3

Τα Σπόρια και η Σημασία Τους



## *Περιεχόμενα Κεφαλαίου*

- Τα Σπόρια στη Βιομηχανία Τροφίμων
- Βιολογία των Σποριών
- Ο Κύκλος Σπορογονίας και Εκβλάστησης
- Περίληψη
- Προτεινόμενη Βιβλιογραφία
- Ερωτήσεις κριτικής σκέψης

# Προκαρυωτικό κύτταρο

## Ενδοσπόρια

- ✓ Αφυδατωμένες αδρανείς κυτταρικές μορφές.
- ✓ Μηχανισμός προστασίας των βακτηρίων σε αντίξοες συνθήκες.  
*Βρέθηκαν βακτήρια ηλικίας 7500 ετών στον πυθμένα λιμνών και ηλικίας 25 – 45 εκατομμυρίων ετών στο πεπτικό σύστημα απολιθωμένων εντόμων.*
- ✓ Όταν βρεθούν σε ευνοϊκές συνθήκες αναπτύσσονται.
- ✓ Η διαδικασία σχηματισμού σπορίων λέγεται σποριογένεση ή σποριοποίηση
- ✓ Η διαδικασία μετατροπής του ενδοσπορίου σε βλαστική κατάσταση (μπορεί να πολλαπλασιαστεί) ονομάζεται **βλάστηση**.



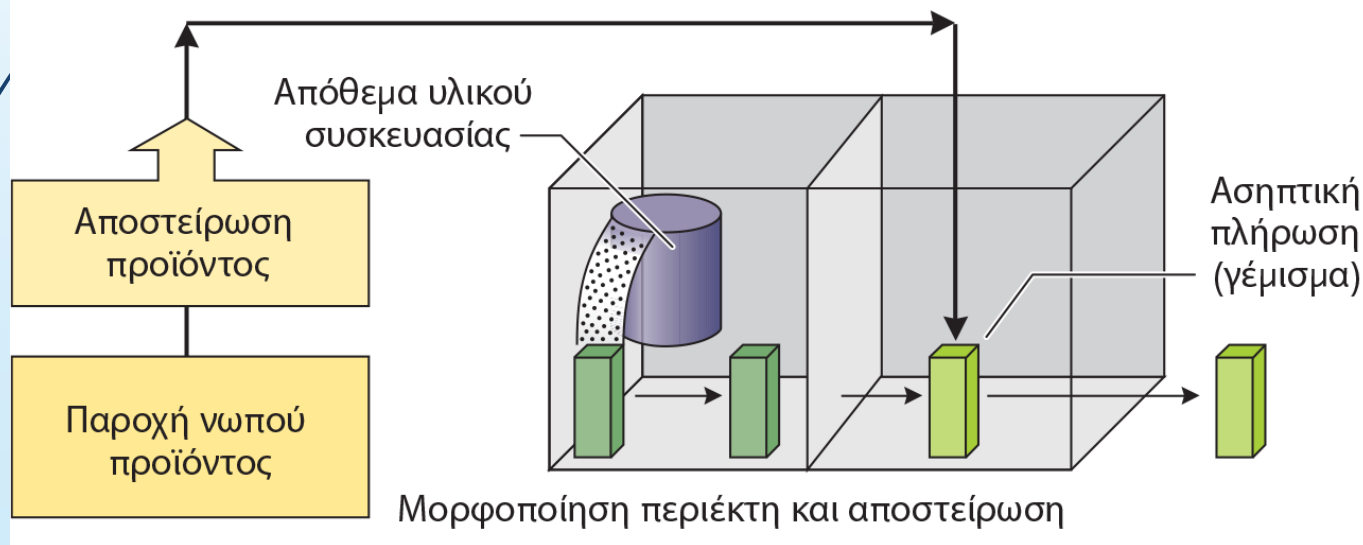
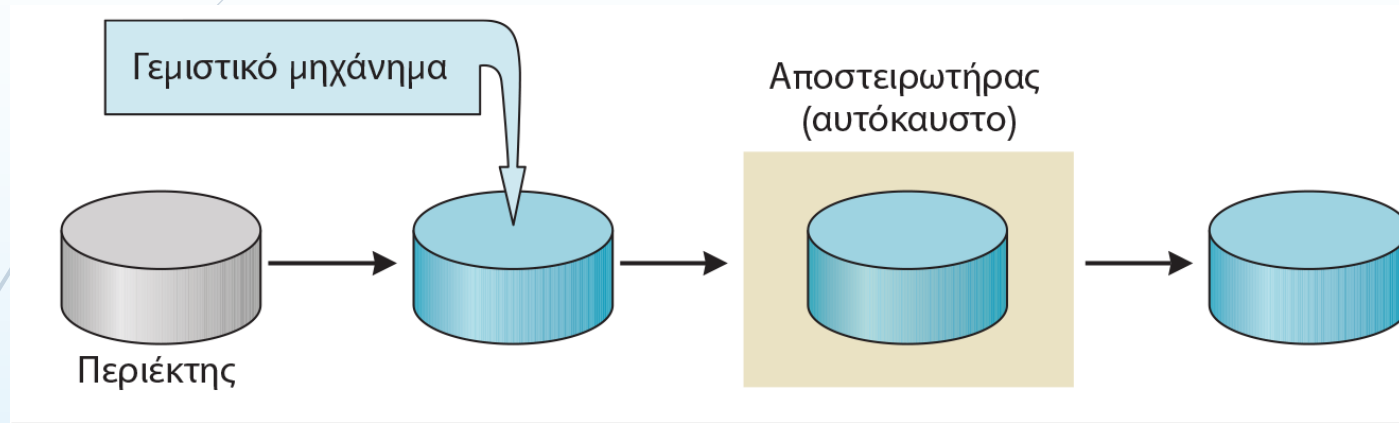
## Διαδικασία Κονσερβοποίησης – προστασία έναντι:

1. Του κινδύνου βουτυλισμού από τα σπόρια του *C. botulinum*
2. Της αλλοίωσης από μεσόφιλους σπορογόνους οργανισμούς
3. Της αλλοίωσης από θερμοφίλους οργανισμούς σε περιέκτες που αποθηκεύονται σε θερμό περιβάλλον.

- ✓ Τα σπόρια αποτελούν μοναδικές μορφές ζωής, ανθεκτικές σε πολλά είδη καταπόνησης.
- ✓ Η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων στα τρόφιμα μετριέται σύμφωνα με την **τιμή D** που έχουν: ο αριθμός των λεπτών σε μια δεδομένη θερμοκρασία που απαιτείται για να θανατωθεί το **90% των σπορίων**. Η **τιμή z** είναι ο αριθμός των βαθμών που χρειάζονται ώστε να μεταβληθεί η τιμή D κατά **10 φορές**.
- ✓ Κονσερβοποιημένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας είναι αυτά που έχουν  $pH > 4,6$  και τιμή  $a_w > 0,85$ .
- ✓ Η εμπορική σταθερότητα επιτυγχάνεται μέσω εφαρμογής θερμικής επεξεργασίας 12D για την καταστροφή των σπορίων του *Cl. botulinum*.
- ✓ Πολλοί σπορογόνοι οργανισμοί προκαλούν αλλοίωση.

# Κονσερβοποιημένα Τρόφιμα Χαμηλής Οξύτητας

## Σύγκριση της συμβατικής και ασηπτικής επεξεργασίας



Σύγκριση της συμβατικής (επάνω) και ασηπτικής (κάτω) επεξεργασίας τροφίμων. Στην συμβατική επεξεργασία, το τρόφιμο τοποθετείται στον περιέκτη, σφραγίζεται και αποστειρώνεται. Στην ασηπτική επεξεργασία, το τρόφιμο και ο περιέκτης αποστειρώνονται ξεχωριστά, ακολουθεί το γέμισμα του περιέκτη και σφραγίζεται κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

## Σπορογόνα που συνδέονται με τη βιομηχανία τροφίμων και μη

**Πίνακας 3.1** Γένη Gram θετικών βακτηρίων που σχηματίζουν σπόρια

Γένος	Χαρακτηριστικά
<i>Alicyclobacillus</i>	Θερμόφιλα οξυάντοχα σπορογόνα βακτήρια τα οποία επιβιώνουν από διεργασίες παστερίωσης και προκαλούν αλλοίωση στους χυμούς
<i>Amphibacillus</i>	Προαιρετικά αναερόβια σπορογόνα βακτήρια που αποικοδομούν την ξυλάνη
<i>Bacillus</i>	Αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια ραβδόμορφα σπορογόνα βακτήρια
<i>Clostridium</i>	Αναερόβια ραβδόμορφα σπορογόνα βακτήρια
<i>Desulfotomaculum</i>	Θειοαναγωγικά σπορογόνα βακτήρια
<i>Filobacillus</i>	Αλοφιλικά αερόβια σπορογόνα βακτήρια
<i>Geobacillus</i>	Θερμόφιλα σπορογόνα βακτήρια σχήματος ράβδου
<i>Sporolactobacillus</i>	Σπορογόνοι λακτοβάκιλλοι
<i>Sulfolobus</i>	θειο-οξειδωτικά θερμόφιλα οξυάντοχα σπορογόνα βακτήρια

# Θερμοανθεκτικότητα σπορογόνων σημαντικών για τα τρόφιμα

Πίνακας 3.2 Θερμοανθεκτικότητα σπορογόνων σημαντικών για τα τρόφιμα<sup>α</sup>

Οργανισμός	Κατά προσέγγιση τιμή D (σε λεπτά) στους 100°C
<b>Σπόρια σημαντικά για τη δημόσια υγεία</b>	
Τύποι A και B της Ομάδας I του <i>Clostridium botulinum</i>	7-30
Τύπος E του <i>C. botulinum</i>	0.01
<i>Bacillus cereus</i>	3-200
<i>Clostridium perfringens</i>	0.3-18
<b>Μεσόφιλοι αερόβιοι</b>	
<i>Bacillus subtilis</i>	7-70
<i>Bacillus licheniformis</i>	13.5
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus polymyxa</i>	0.1-0.5
<i>Bacillus thermoacidurans</i>	2-3
<b>Θερμόφιλοι αερόβιοι</b>	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	100-1.600
<i>Bacillus coagulans</i>	20-300
<b>Αναερόβιοι Μεσόφιλοι</b>	
<i>Clostridium sporogenes</i>	80-100
<b>Αναερόβιοι θερμόφιλοι</b>	
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	≤480
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	400

<sup>α</sup> Πηγή: P. Setlow και E. A. Johnson, σελ. 33-70, στο M. P. Doyle, L. R. Beuchat, και T. J. Montville (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2<sup>η</sup> έκδ. (ASM Press, Washington, D.C., 2001.)

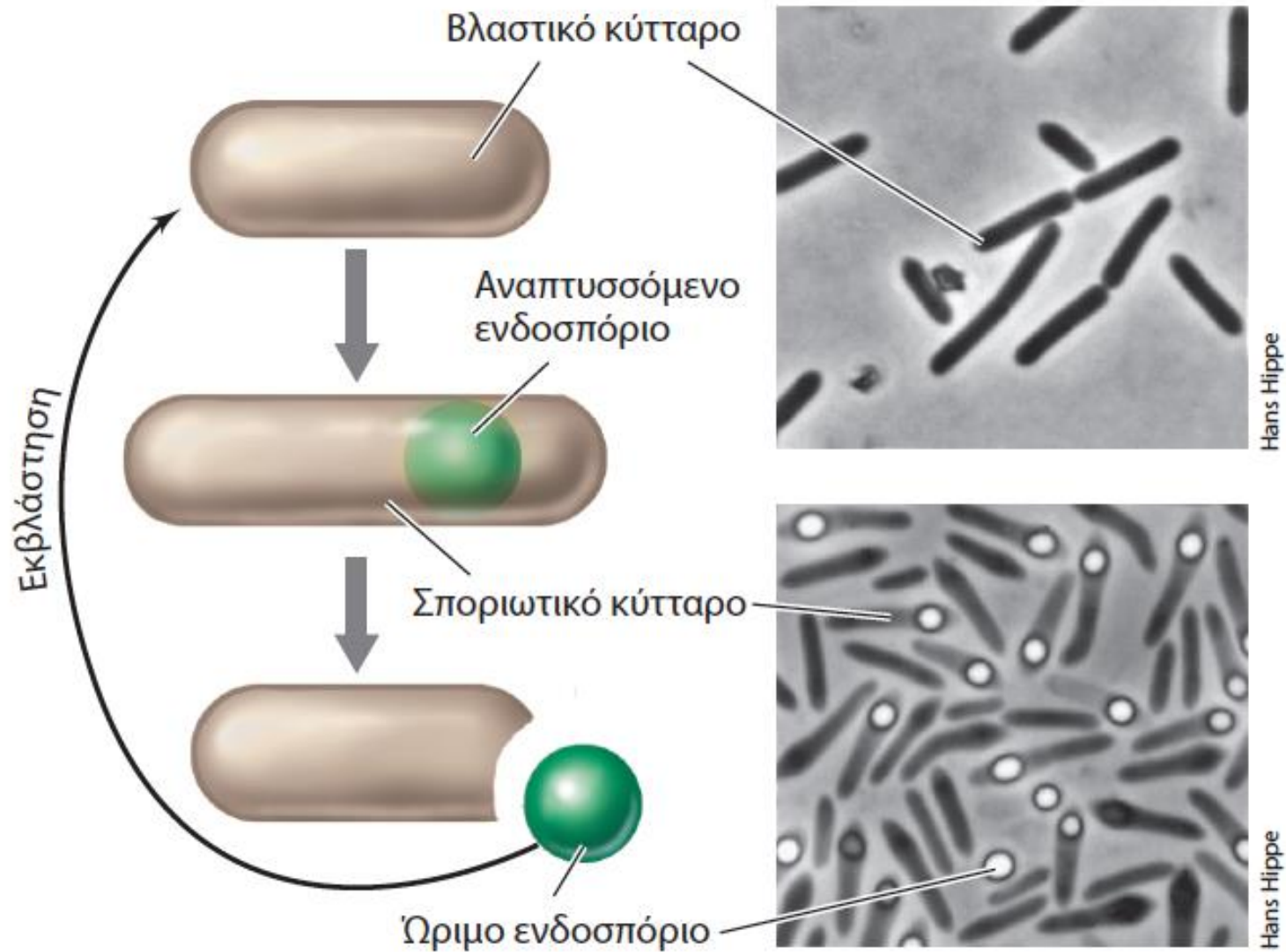
**Πίνακας 3.3** Αλλοίωση κονσερβοποιημένων τροφίμων από σπορογόνους οργανισμούς\*

Είδος αλλοίωσης ή σπορογόνου οργανισμού	pH	Κύριοι υπεύθυνοι σπορογόνου οργανισμοί	Προβλήματα που προκαλούνται λόγω της αλλοίωσης
Επίπεδη Οξίνιση (Flat-sour)	$\geq 5,3$	<i>Bacillus coagulans</i> , <i>B.stearothermophilus</i>	Καθόλου αέρια. Μειωμένο pH. Πιθανή μη φυσιολογική μυρωδιά και θολό υγρό (θόλωμα)
Θερμόφιλα αναερόβια	$\geq 4,8$	<i>C. thermosaccharolyticum</i>	Διόγκωση της κονσέρβας και πιθανή διάρρηξη. Οι αναερόβιοι οργανισμοί και τα προϊόντα τους παράγουν μια οσμή όξινη, ζύμωσης ή βουτυρικού οξέος. Χαρακτηριστικά τρόφιμα είναι το σπανάκι και το καλαμπόκι.
Θειοαναγωγικά αλλοιογόνα	$\geq 5,3$	<i>D. nigrificans</i> , <i>Clostridium bifermentans</i>	Παράγεται υδρόθειο, προσδίδοντας οσμή κλούβιου αυγού. Το ίζημα θειούχου σιδήρου δίνει μια σκούρα όψη. Χαρακτηριστικά τρόφιμα είναι το καλαμπόκι, τα μπιζέλια.
Σηπτικά αναερόβια	$\geq 4,8$	<i>Clostridium sporogenes</i>	Άφθονα αέρια. Μυρωδιά σαπίλας. Συχνά το pH αυξάνεται. Χαρακτηριστικά τρόφιμα είναι το καλαμπόκι, το σπαράγγι.
Ψυχρότροφα Κλωστρίδια	$\geq 4,6$		Αλλοίωση σε κρέατα συσκευασμένα υπό κενό και συντηρούμενα υπό ψύξη. Παραγωγή αερίου, δυσάρεστη γεύση και οσμή, αποχρωματισμός.

**Πίνακας 3.3** Αλλοίωση κονσερβοποιημένων τροφίμων από σπορογόνους οργανισμούς\*

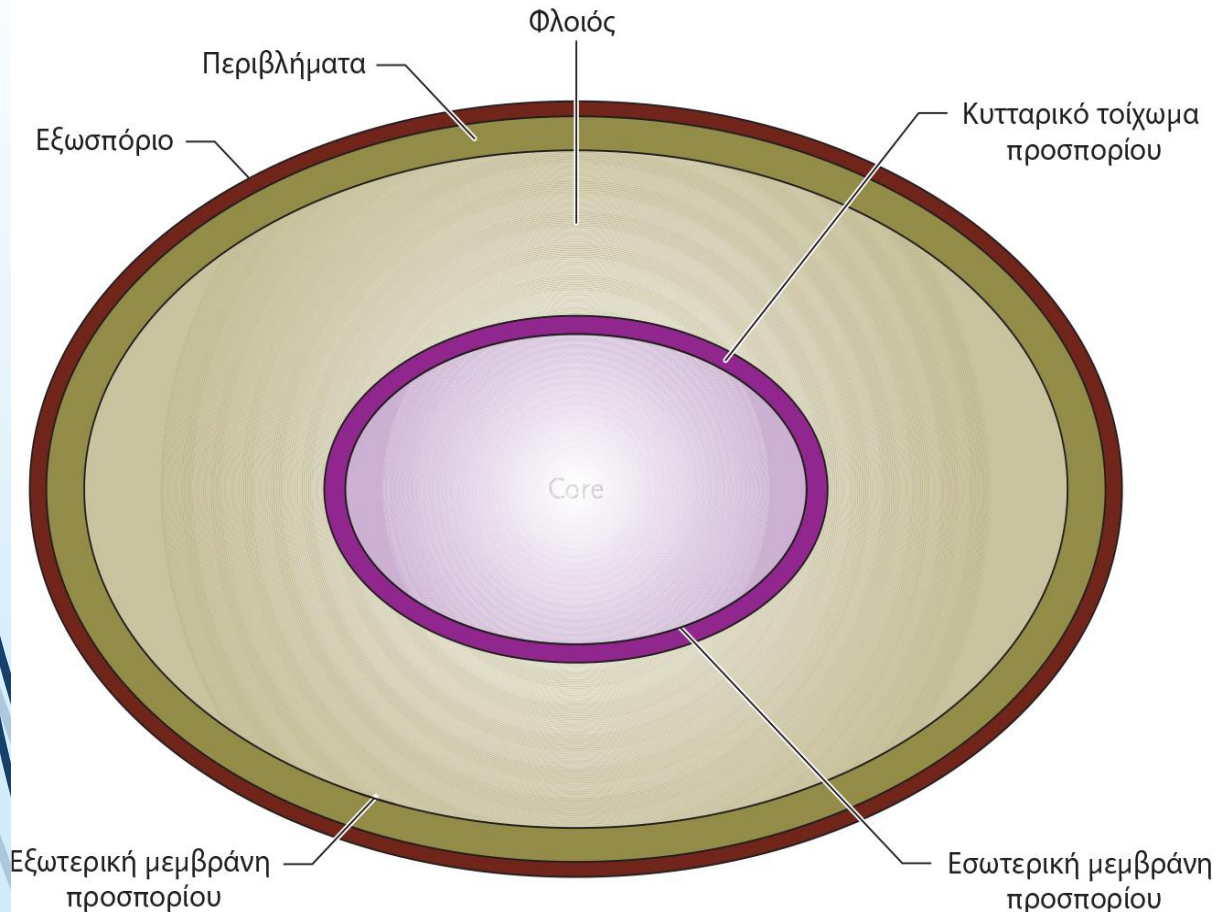
Είδος αλλοίωσης ή σπορογόνου οργανισμού	pH	Κύριοι υπεύθυνοι σπορογόνου οργανισμοί	Προβλήματα που προκαλούνται λόγω της αλλοίωσης
Αερόβιοι σπορογόνου οργανισμοί	≥4,8	<i>Bacillus</i> spp.	Συνήθως δεν υπάρχουν αέρια εκτός από την περίπτωση των παστών κρεάτων. Πήξη του γάλακτος. Χαρακτηριστικά τρόφιμα είναι το γάλα, τα κρέατα, τα τεύτλα
Βουτυρικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί	≥4,0	<i>C. butyricum</i> , <i>Clostridium tertium</i>	Αέρια. Οσμή οξικού ή βουτυρικού. Χαρακτηριστικά τρόφιμα είναι οι τομάτες, τα μπιζέλια, οι ελιές, τα αγγούρια.
Όξινη αλλοίωση	≥4,2	<i>B. thermoacidurans</i> , βουτυρικά αναερόβια Κλωστρίδια(προαιρετικά)	Επίπεδη οξίνιση ( <i>Bacillus</i> ) ή παραγωγή αερίων (βουτυρικά αναερόβια Κλωστρίδια). Η δυσάρεστη οσμή εξαρτάται από τον οργανισμό. Συνηθισμένα τρόφιμα είναι οι τομάτες, τα προϊόντα τομάτας, και τα φρούτα.
	≥4	<i>A. acidoterrestris</i>	Επίπεδη οξίνιση με άσχημη γεύση. Πιο συνηθισμένη σε χυμούς φρούτων και όξινα λαχανικά, ενώ έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αλλοίωση και στο ice tea (παγωμένο τσάι).

\* Πηγή: Setlow P, Johnson EA, p. 33–68, in Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3<sup>η</sup> έκδοση, ASM Press, Washington, DC, 2007.

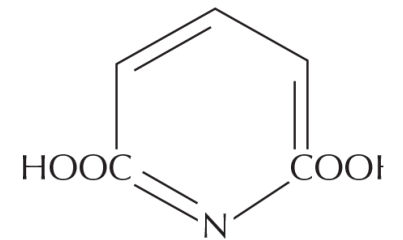


**Εικόνα 2.43** Ο κύκλος ζωής ενός βακτηρίου που σχηματίζει ενδοσπόρια. Οι μικροφωτογραφίες αντίθεσης φάσεων είναι από κύτταρα του *Clostridium pascui*. Πλάτος κυττάρου: περί τα 0,8 μm.

# ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ - Δομή



Δομή ενός σπορίου που βρίσκεται σε λήθαργο. Οι διάφορες δομές δεν είναι σχεδιασμένες ακριβώς με βάση την πραγματική κλίμακα, ιδίως το εξωσπόριο, του οποίου το μέγεθος ποικίλλει πάρα πολύ μεταξύ σπορίων διαφορετικών ειδών. Το σχετικό μέγεθος του τοιχώματος του σπερματικού κυττάρου είναι επίσης γενικά μικρότερο από αυτό που φαίνεται. Επισημαίνονται επίσης οι θέσεις της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης, του προσπορίου, μεταξύ του πυρήνα και του τοιχώματος του σπερματικού κυττάρου, και μεταξύ του φλοιού και του περιβλήματος, αντίστοιχα. (Πηγή: P. Setlow και E. A. Joh p.33-70, in M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (εκδ.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2η έκδ. [ASM Press, Washington, D.C., 2001].)



Η δομή DPA. Σημειώστε ότι σε φυσιολογικό pH και οι δύο καρβοξυλικές ομάδες θα ιονιστούν.

# ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ - Δομή

- ✓ Σπορογονία είναι η διαδικασία με την οποία ένα βλαστικό κύτταρο παράγει ένα σπόριο.
- ✓ Η απελευθέρωση και η εκβλάστηση επιτρέπουν στο σπόριο να συνεχίσει να ζει ως βλαστικό κύτταρο.
- ✓ Ο φλοιός του σπορίου είναι μια μοναδική μορφή πεπτιδογλυκάνης που συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα του σπορίου.
- ✓ Το DPA και οι SASP συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα του σπορίου.
- ✓ Η θερμοανθεκτικότητα μιας ομάδας σπορίων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι και η θερμοκρασία σπορογονίας.
- ✓ Η σχετικά χαμηλή υδατοπεριεκτικότητα του πυρήνα του σπορίου συμβάλλει στην ανθεκτικότητά του.
- ✓ Η σπορογονία, η απελευθέρωση και η εκβλάστηση αποτελούν μέρη του κύκλου ζωής του σπορίου.

# Μικρά μόρια

**Πίνακας 3.4** Μικρά μόρια που βρίσκονται σε κύτταρα και σπόρια ειδών του γένους *Bacillus*

Μόριο <sup>α</sup>	Περιεκτικότητα (mmol/g [ξηρό βάρος]) σε :	
	Κύτταρα <sup>β</sup>	Σπόρια <sup>γ</sup>
ATP	3,6	≤0,005
ADP	1	0,2
AMP	1	1,2-1,3
Δεοξυνουκλεοτίδια	0,59 <sup>δ</sup>	<0,025 <sup>στ</sup>
NADH	0,35	<0,002 <sup>στ</sup>
NAD	1,95	0,11 <sup>στ</sup>
NADPH	0,52	<0,001 <sup>στ</sup>
NADP	0,44	0,018 <sup>στ</sup>
Ακετυλο-CoA	0,6	<0,01 <sup>στ</sup>
CoASH	0,7	0,26 <sup>στ</sup>
CoASSX	<0,1	0,54 <sup>στ</sup>
3PGA	<0,2	5-18
Γλουταμινικό οξύ	38	24-30
DPA	<0,1	410-470
Ca <sup>2+</sup>		380-916
Mg <sup>2+</sup>		86-120
Mn <sup>2+</sup>		27-56
H <sup>+</sup>	7,6-8,1 <sup>ζ</sup>	6,3-6,9 <sup>ζ</sup>

<sup>α</sup> Συντομογραφίες: ATP, 5-τριφωσφορική αδενοσίνη; ADP, 5-διφωσφορική αδενοσίνη; AMP, 5-μονοφωσφορική αδενοσίνη; NADH, ανηγμένη μορφή νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο; NAD, μορφή νικοτιναμιδο-αδενινο δινουκλεοτίδιο; NADP, φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο δινουκλεοτίδιο; CoA SH, ελεύθερο ακετυλο-συνένζυμο A; CoASSX, ακετυλο-συνένζυμο A συνδεδεμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς με ένα ακετυλο-συνένζυμο A ή μια πρωτεΐνη; 3PGA, 3-φωσφογλυκερικό

<sup>β</sup> Οι τιμές για τον *B. megaterium* στη μέση της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης.

<sup>γ</sup> Οι τιμές είναι το εύρος για τα σπόρια των *B. cereus*, *B. subtilis* και *B. megaterium*.

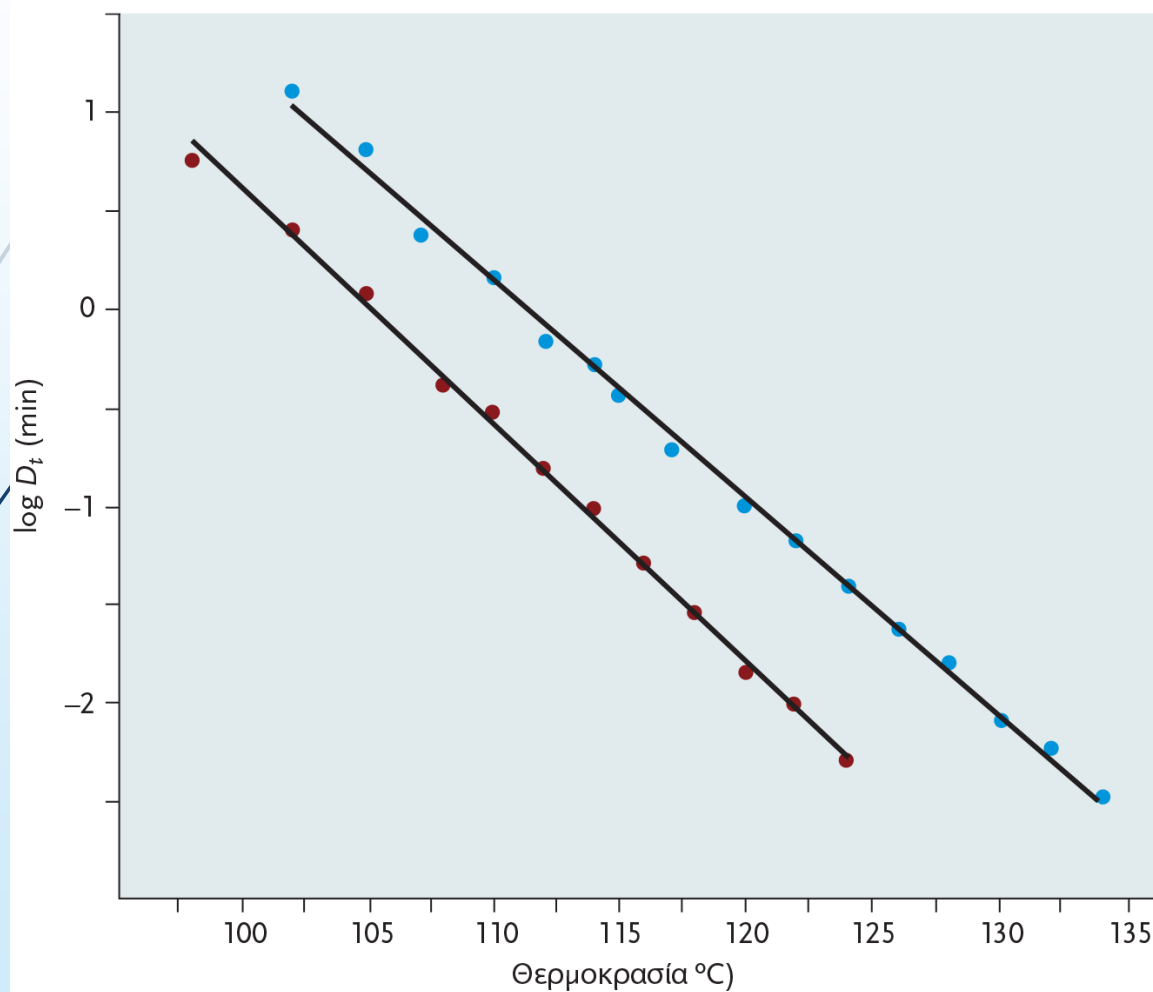
<sup>δ</sup> Η τιμή είναι το σύνολο των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυ-νουκλεοτιδίων.

<sup>ε</sup> Η τιμή είναι το άθροισμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυ-νουκλεοτιδίων.

<sup>στ</sup> Οι τιμές είναι μόνο για τον *B. megaterium*.

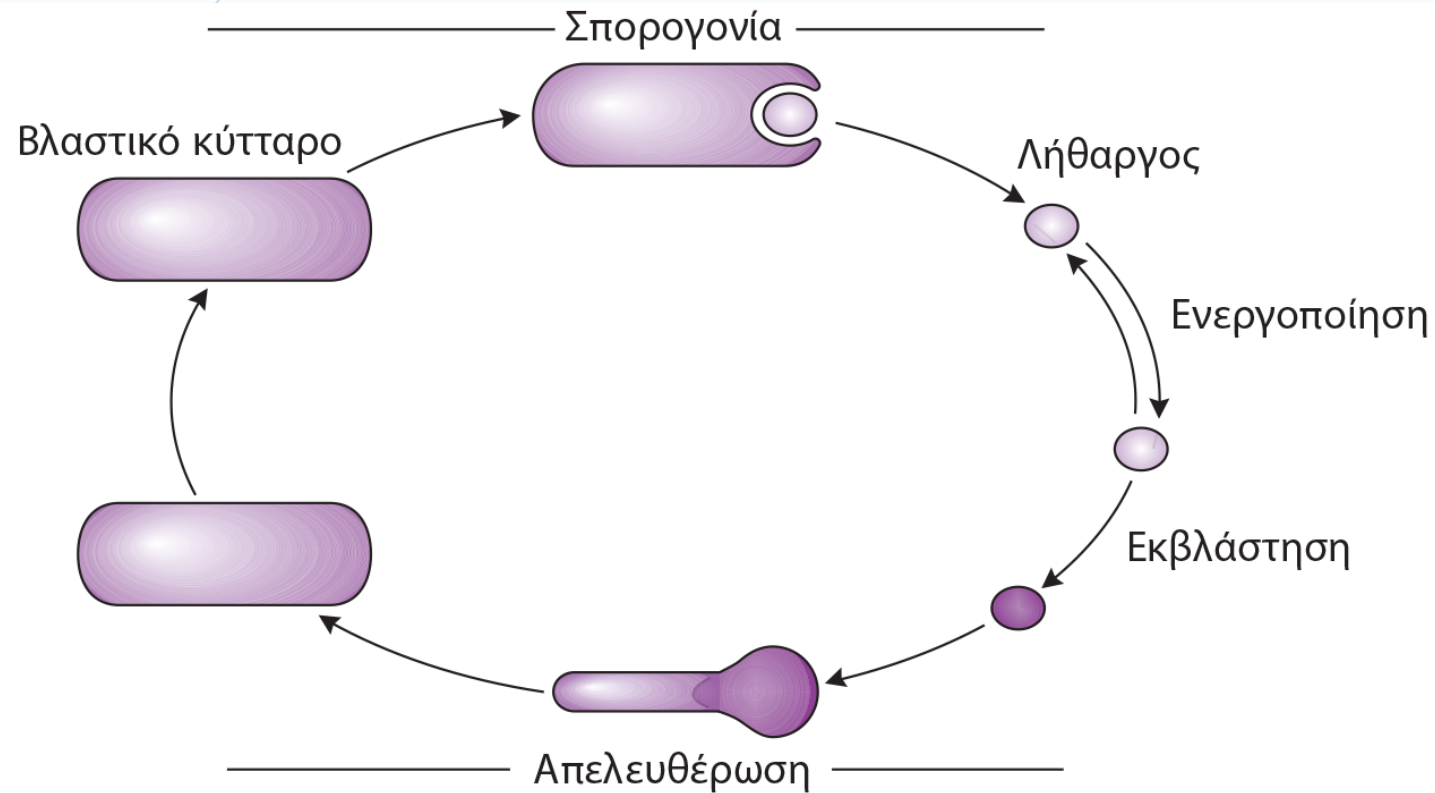
<sup>ζ</sup> Οι τιμές εκφράζονται ως pH και είναι το εύρος τιμών των *B. cereus*, *B. megaterium* και *B. subtilis*.

# Θερμοκρασία Σπορογονίας

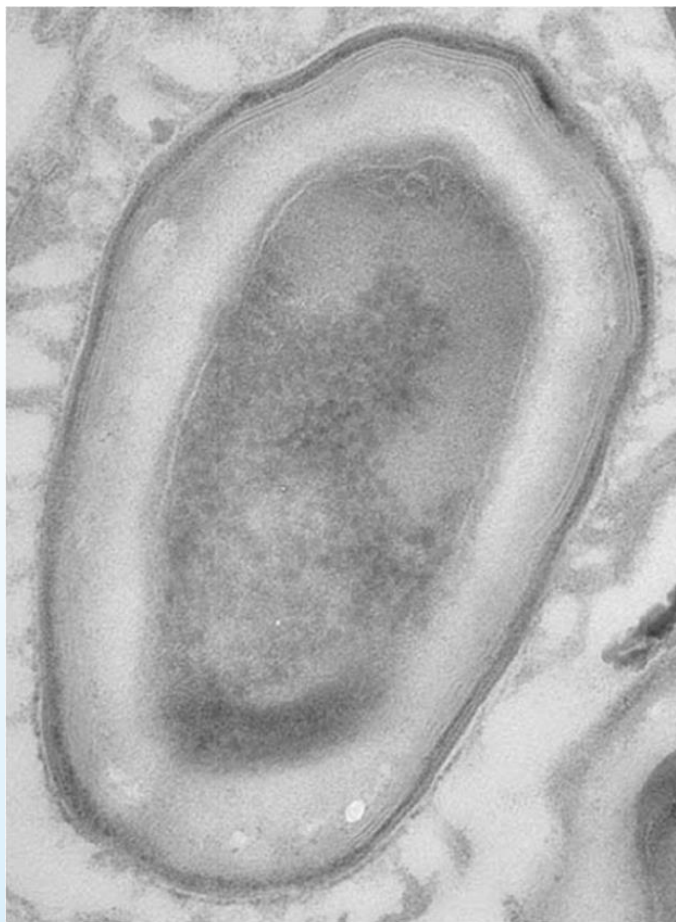


Επίδραση της θερμοκρασίας εκβλάστησης στις τιμές D του *Bacillus subtilis*, εκβλάστηση στους 32°C (κόκκινες κουκίδες) ή στους 52°C (μπλε κουκίδες). (Ξανασχεδιάστηκε από τη δημοσίευση των **Sala FJ, Ibarz P, Palop A, Raso J, Condon S, J Food Prot 58:239–243, 1995**. Copyright International Association for Food Protection, Des Moines, IA.)

# Ο Κύκλος Σπορογονίας και Εκβλάστησης



Ο κύκλος σπορογονίας, ληθάργου, ενεργοποίησης και εκβλάστησης



Απεικονίζεται στο μικρογράφημα ενός τμήματος διαμέσου του σπορίου και του σποράγγειου του *Bacillus subtilis* (Παραχώρηση του Lee Simon και του εργαστηρίου Montville, Πανεπιστήμιο Rutgers).

# Κεφάλαιο 4

Ανίχνευση και Απαρίθμηση των Μικροβίων στα Τρόφιμα

## *Περιεχόμενα Κεφαλαίου*

- Εισαγωγή
- Συλλογή και Επεξεργασία Δειγμάτων
- Ανάλυση
- Έλεγχος Επιφανειών
- Περίληψη
- Προτεινόμενη Βιβλιογραφία
- Ερωτήσεις κριτικής σκέψης

## Στόχοι Κεφαλαίου

Οι πληροφορίες που περιέχονται σε αυτό το κεφάλαιο θα βοηθήσουν το φοιτητή:

- Να συζητήσει τις διαθέσιμες μεθόδους για τη μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων.
- Να συγκρίνει τις μεθόδους ανάλυσης, υποδεικνύοντας τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου.
- Να παρακολουθήσει λεπτομερώς τις διαδικασίες συλλογής και επεξεργασίας τροφικών δειγμάτων.
- Να υπολογίσει το μικροβιακό φορτίο ενός δείγματος.
- Να αναγνωρίσει τις διαφορές μεταξύ συμβατικών, ταχέων και υβριδικών μικροβιολογικών μεθόδων.

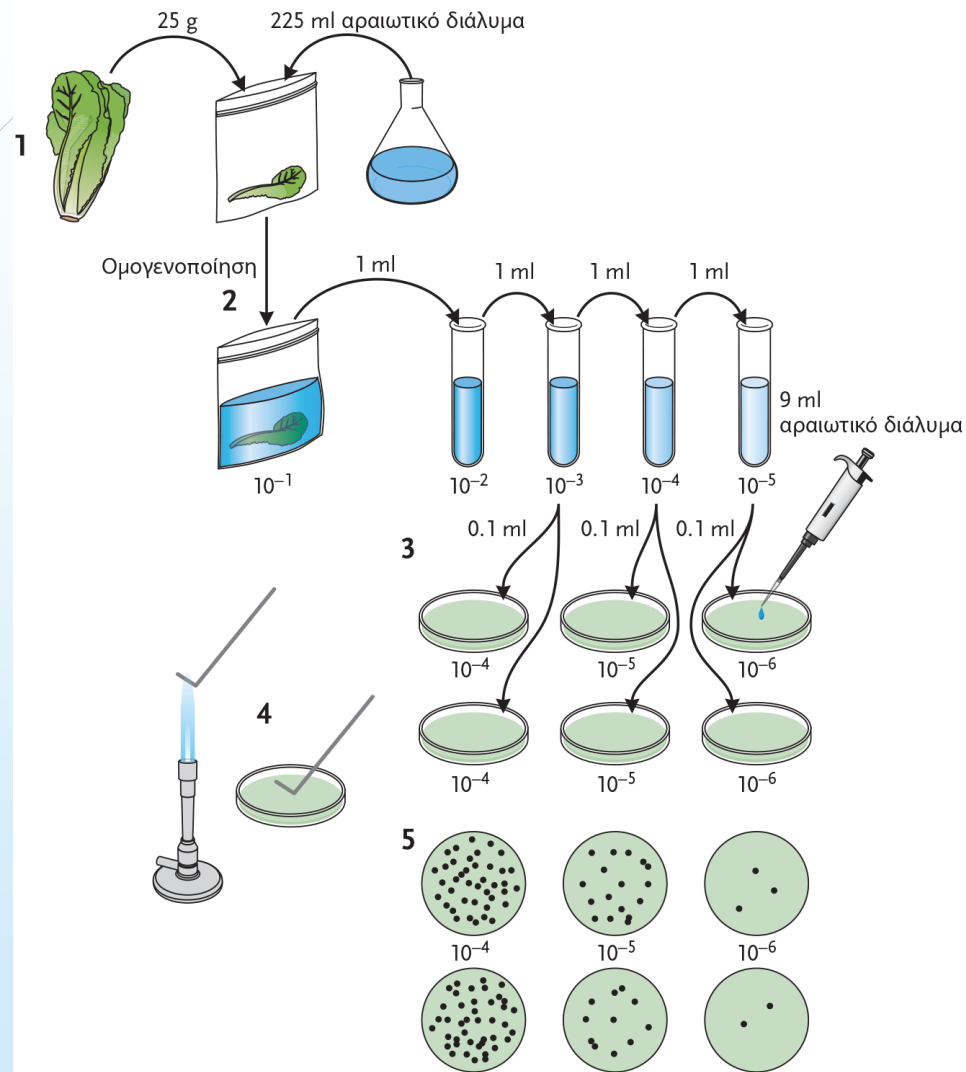
## Περίληψη

- Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται χρησιμοποιώντας ασηπτικές τεχνικές και να συντηρούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
- Τα υγρά και στερεά δείγματα τροφίμων θα πρέπει αναμιγνύονται ή να ομογενοποιούνται πριν την εξέταση.
- Η μέθοδος ενσωμάτωσης σε τρυβλία είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για να παρέχει μια εκτίμηση του αριθμού των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα.
- Οι μέθοδοι ελέγχου επιφανείας είναι σημαντικές για να προσδιοριστεί εάν οι επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα παραμένουν σε καλή κατάσταση υγιεινής.

## Περίληψη

- Οι συμβατικές βιοχημικές μέθοδοι αντικαθίστανται όλο και περισσότερο με γρήγορες (μικροσκοπικές δοκιμές), μειώνοντας τον χρόνο που απαιτείται για την ταυτοποίηση ενός μικροοργανισμού.

# Συλλογή και Επεξεργασία Δειγμάτων

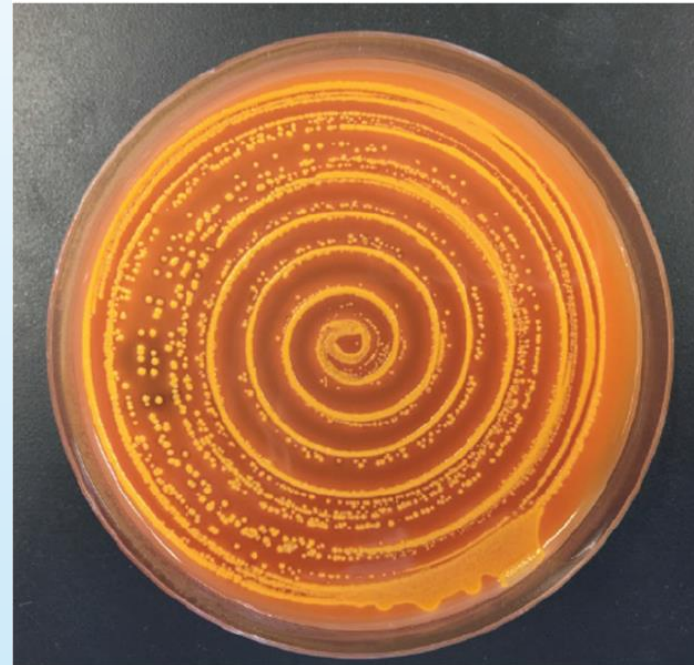


Προετοιμασία δείγματος για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου. Δείγμα μαρουλιού, το οποίο αρχικά περιέχει εκατομμύρια μικροβίων, αραιώνεται, και οι αραιώσεις επιστρώνονται σε τρυβλία έτσι ώστε να μπορέσουν να καταμετρηθούν μεμονωμένες αποικίες. Στη συνέχεια γίνονται οι κατάλληλοι υπολογισμοί ώστε να προσδιοριστεί ο πραγματικός αριθμός των μικροβίων στο μαρούλι. Βήμα 1: αφού γίνει έλεγχος του δείγματος, το προϊόν τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια και στη συνέχεια ομογενοποιείται με το αραιωτικό υγρό (συνήθως 25g δείγματος ομογενοποιούνται με 225ml αραιωτικού υγρού). Λαμβάνεται 1 ml και προστίθεται σε 9 ml αραιωτικού για την απευθείας προετοιμασία διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Βήμα 2: μεταφέρονται 100 µl (0,1 ml) από κάθε αραιώση για επανάληψη των τρυβλίων. Βήμα 3: μια γυάλινη ράβδος επιστρωσης αποστειρώνεται σε φλόγα, αφήνεται να κρυώσει και χρησιμοποιείται ώστε να απλωθεί το δείγμα πάνω στην επιφάνεια του άγαρ. Το τρυβλίο θα πρέπει να περιστρέφεται ώστε να διασφαλιστεί ότι το δείγμα έχει απλωθεί σε ολόκληρη την επιφάνεια. Βήμα 4: Τα τρυβλία επάζονται υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Βήμα 5: Καταμετρούνται οι αραιώσεις που οδήγησαν στη δημιουργία 25 έως 250 αποικιών ανά τρυβλίο και εκφράζονται ως αριθμοί CFU (colony forming units – μονάδες σχηματισμού αποικιών) ανά ml μαρουλιού.

# Ανάλυση



Ένας τυπικός περιστρεφόμενος σωλήνας στερεού θρεπτικού υποστρώματος (role tube). Παρατηρείτε ότι οι αποικίες εμφανίζουν ένα σπειροειδές μοτίβο, μια λειτουργία του σωλήνα που περιέχει το εμβολιασμένο μέσο ο οποίος περιστρέφεται ενώ το υπόστρωμα ψύχεται



(Επάνω) Μια τυπική μονάδα περιστροφικού εμβολιασμού. Αυτές οι μονάδες είναι πλήρως αυτοματοποιημένες και έχουν μικρό αποτύπωμα. (Κάτω) Οι αποικίες σχηματίστηκαν σε ένα τρυβλίο στο οποίο το δείγμα δοκιμής επιστρώθηκε με περιστροφικό εμβολιασμό.

# Έλεγχος Επιφανειών

## Προετοιμασία δείγματος

Φυλλώδες λαχανικό: Ζυγίζονται 125g από το λαχανικό και τοποθετούνται σε 125ml διπλής συγκέντρωσης (double strength) εμπλουτιστικό υγρό modified Buffered Peptone Water με πυρουβικό οξύ (mBPWp)

5 h, 37°C

## Εμπλουτισμός

Προσθήκη 1ml από το καθένα από τα πρόσθετα (supplements): acriflavine-cefsulodin-vancomycin και επώαση στους 42°C στατικά για ένα βράδυ (18-24 ώρες)

## Ανίχνευση με Real-time PCR

1ml από το εμπλουτιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για προετοιμασία του μίγματος για την PCR. Η μέθοδος βασίζεται είτε στην χρήση του SmartCycler II ή του Light Cycler 2.0  
Γονίδια-Στόχοι: *stx1*, *stx2*, *uidA*

Αρνητικά δείγματα: Δεν χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση.  
Πιθανώς θετικά STEC ή O157 δείγματα: Ακολουθεί απομόνωση και ταυτοποίηση καλλιέργειας

## Απομόνωση καλλιέργειας και ταυτοποίηση πιθανώς θετικού δείγματος

1. Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στο δείγμα από το εμπλουτιστικό υγρό σε Butterfield's phosphate buffer και επίστρωση των κατάλληλων αραιώσεων εις διπλούν σε TC-SMAC και ένα στο χρωμογόνο άγαρ (Rainbow Agar O157 ή R&F *E. coli* O157:H7 agar).
2. Επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 18-24 ώρες.
3. Έλεγχος χαρακτηριστικών αποικιών, δοκιμή για αντιγόνα O157 με το latex test οροσυγκόλλησης.
4. Επίστρωση μεμονωμένων αποικιών (streak) σε τρυβλία με TSAYE.
5. Τοποθέτηση ενός δισκίου ColiComplete στην περιοχή με το πιο πυκνό streak. Επώαση των τρυβλίων για 18-24 ώρες στους 37°C.
6. Διενέργεια τεστ ινδόλης.
7. Οι χαρακτηριστικές αποικίες εμφανίζονται θετικές στο X-gal, αρνητικές στο MUG, και θετικές σε ινδόλη. Η παρουσία O157 και H7 αντιγόνων επιβεβαιώνεται με έναν εμπορικό αντιορό.
8. Οι επιβεβαιωμένες ως O157-θετικές και H7-θετικές απομονώσεις, ταυτοποιούνται ως *E. coli* με API20E τεστ ή το σύστημα Vitek. Για τις απομονώσεις που ταυτοποιούνται ως O157:H7, καθώς και όσες είναι θετικές ως O157 και αρνητικές ως H7, πραγματοποιείται μια 5P multiplex PCR για την τελική επιβεβαίωση των O157:H7 απομονώσεων.

Περιγράφεται η μέθοδος ανίχνευσης και καταμέτρησης της *E. coli* O157:H7 σε φυλλώδη λαχανικά, σύμφωνα με το εγχειρίδιο του FDA «Bacteriological Analytical Manual». Η μέθοδος συνδυάζει διαφορετικά στάδια ανάλυσης με χρήση συμβατικών και μοριακών μεθόδων. Περισσότερα εδώ: <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm070080.htm>.  
STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*;  
TC-SMAC: tellurite cefixime-sorbitol-MacConkey agar;  
TSAYE: tryptic soy agar-yeast extract;  
X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside; MUG: methylumbelliferyl-β-glucuronide.