

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΧΑΜΗΛΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

A. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ

B. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Χατζηκαμάρη Μαγδαληνή, MSc, PhD, Ε.ΔΙ.Π

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων

Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας

A. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ

Σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία (KAN 2073/2005 Μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα) επιβάλλεται η απουσία κάποιων παθογόνων βακτηρίων (π.χ. Σαλμονέλλα) σε 25 γρ. τροφίμου και ορίζεται και η μέθοδος σύμφωνα με την οποία πρέπει να γίνει ο μικροβιολογικός έλεγχος. Με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων το αποτέλεσμα που προκύπτει εκφράζεται σε cfu ανά gr ή ml τροφίμου, στην προκειμένη περίπτωση όμως αναμένεται πολύ χαμηλός πληθυσμός βακτηρίων (απουσία ανά 25 gr τροφίμου), οπότε θα πρέπει να ακολουθηθεί κάποια άλλη μέθοδος.

Η μέθοδος αυτή είναι η μέθοδος του εμπλουτισμού του δείγματος (enrichment). Η μέθοδος διαρκεί 3-7 ημέρες και περιλαμβάνει 4 φάσεις

- Προεμπλουτισμό του δείγματος σε μη εκλεκτικό υγρό
- Εμπλουτισμό σε εκλεκτικό υγρό υπόστρωμα
- Μεταφορά/επίστρωση με κρίκο σε εκλεκτικά στερεά υποστρώματα
- Βιοχημική και οροτυπική επιβεβαίωση πιθανών αποικιών του βακτηρίου στόχου

1^η μέρα

Προεμπλουτισμός. Ομογενοποιούνται 25 γρ του τροφίμου με 225 ml γενικού θρεπτικού υλικού (μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το τρόφιμα και το βακτήριο στόχο).

Ο προεμπλουτισμός στοχεύει:

α. στην αύξηση του πληθυσμού του βακτηρίου στόχου αν υπάρχει, ώστε να είναι ευκολότερη η ανίχνευσή του. Παράλληλα αναπτύσσονται και άλλα είδη βακτηρίων, καθότι το υγρό που χρησιμοποιείται δεν είναι εκλεκτικό.

β. να δοθεί ο χρόνος και οι άριστες συνθήκες σε τυχόν στρεσσαρισμένα/τραυματισμένα κύτταρα (λόγω επεξεργασίας του τροφίμου) να ανανήψουν και να γίνουν μεταβολικά ενεργά. Κατά τον εμπλουτισμό συνεχίζουν να αναπτύσσονται τα κύτταρα του βακτηρίου στόχου ενώ παράλληλα αναστέλλεται η ανάπτυξη άλλων ειδών βακτηρίων.

2^η μέρα

Εμπλουτισμός. Μεταφέρεται ποσότητα από τη φιάλη του προεμπλουτισμού σε εκλεκτικά υγρά θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη του βακτηρίου στόχου ενώ παράλληλα περιέχει ανασταλτικές ουσίες για την αναχαίτιση της ανάπτυξης άλλων ειδών.

3^η μέρα

Απομόνωση. Μεταφέρεται με κρίκο εμβολιασμού ποσότητα σε εκλεκτικά στερεά υποστρώματα με τρόπο ώστε να προκύψουν κατά το δυνατόν απομονωμένες αποικίες. Στα υποστρώματα αυτά ύποπτες αποικίες ξεχωρίζουν από τη μορφολογία τους. **Αν δεν υπάρχουν χαρακτηριστικές αποικίες του βακτηρίου στόχου, σταματάμε εδώ και δηλώνουμε απουσία του βακτηρίου στόχου στα 25 γρ τροφίμου.** Αν υπάρχουν χαρακτηριστικές αποικίες συνεχίζουμε.

4^η μέρα

Καθαρισμός. Ύποπτες αποικίες μεταφέρονται και καθαρίζονται σε στερεό άγαρ (streak). Οι επιβεβαιωτικές δοκιμές πρέπει να γίνονται σε καθαρά στελέχη του βακτηρίου στόχου.

5^η – 7^η μέρα

Βιοχημικές και οροτυπικές επιβεβαιωτικές δοκιμές σε καθαρά στελέχη.

Παρακάτω δίνεται ως παράδειγμα η μέθοδος ISO 6579/2002 που προτείνεται από τον ΚΑΝ 2073/2005 για την ανίχνευση της Σαλμονέλλας.

Τυπικό διάγραμμα απομόνωσης/ταυτοποίησης σαλμονελλών σε τρόφιμα με τη μέθοδο του εμπλουτισμού

Μη εκλεκτικός προ-εμπλουτισμός

25 γρ δείγματος ομογενοποιούνται με 225 ml phosphate buffer 10%
(επώαση: 36° +/- 1° C, 24h)



Εκλεκτικός εμπλουτισμός

0.1 ml σε 10 ml Rappaport-Vassiliadis Soy broth (επώαση: 41.5° +/- 0.5° C, 24h) και
1 ml σε 10 ml Tetrathionate broth (Müller-Kauffman) (επώαση: 36° +/- 1° C, 24h)



Απομόνωση

μεταφορά με κρίκο εμβολιασμού(streak) σε XLD agar και από τα δύο προηγούμενα broth
(επώαση: 36° +/- 1° C, 24h)
μεταφορά με κρίκο εμβολιασμού(streak) σε BGA agar και από τα δύο προηγούμενα broth
(επώαση: 36° +/- 1° C, 24h)



Μεταφορά πιθανόν αποικιών σε Nutrient agar (επώαση: 36° +/- 1° C, 24h)



Βιοχημικές επιβεβαιωτικές δοκιμές (επώαση: 36° +/- 1° C, 24h)

- Παραγωγή οξέος από γλυκόζη, λακτόζη, σουκρόζη, παραγωγή αερίου και H₂S σε Triple Sugar Iron agar (TSI) ή Kligler Iron agar (KIA)
 - Παραγωγή ουρεάσης σε Urea broth
 - Αποκαρβοξυλίωση λυσίνης σε Lysine Iron agar (LIA)
- Κινητικότητα, παραγωγή ινδόλης και αποκαρβοξυλίωση ορνιθίνης σε Motility-Indole-Ornithine agar (MIO agar)
 - Ζύμωση κιτρικών σε Citrate agar



Οροτυπική επιβεβαίωση

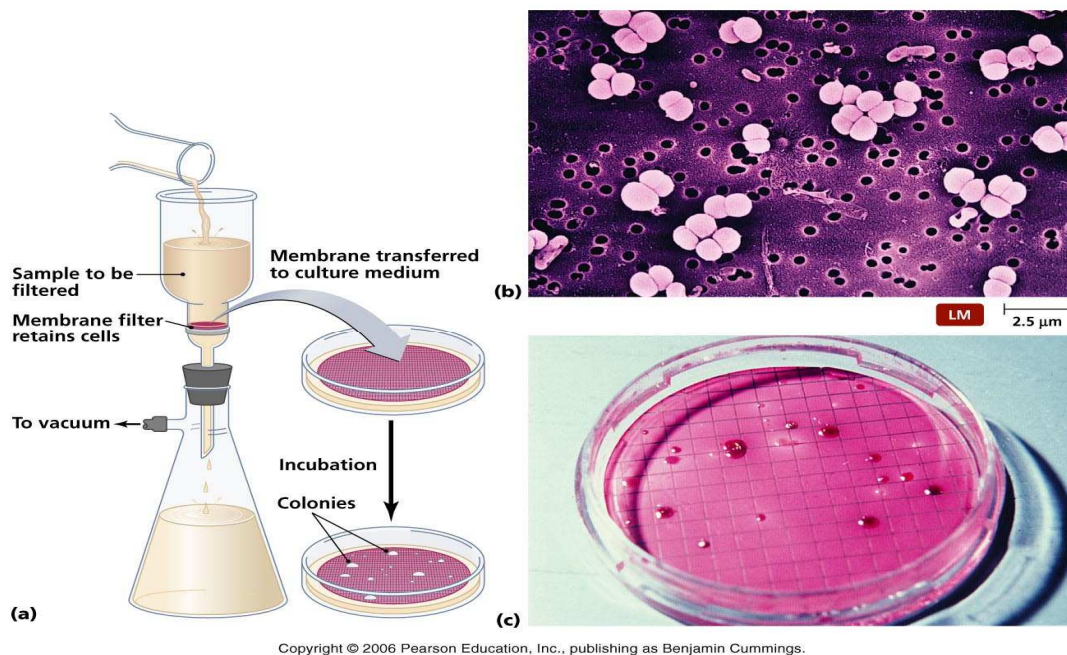
O-αντιγόνα
H-αντιγόνα

B. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η νομοθεσία για το νερό ΚΥΑ Υ2/2600/2001 (Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης σε συμμόρφωση με την οδηγία 98/83/ΕΚ) επιβάλλει απουσία κάποιων βακτηρίων σε 100 ή 250 ml νερού. Σε αυτές τις περιπτώσεις, εφαρμόζεται η μέθοδος της διήθησης μέσω μεμβρανών (membrane filtration).

Για τη διήθηση μέσω μεμβρανών, απαιτείται ειδική συσκευή (σχ. 1a), όπου τοποθετείται αποστειρωμένη μεμβράνη με πορώδες 0.22-0.45 μ και μέσω αυτής διηθείται η απαιτούμενη ποσότητα νερού με τη βοήθεια αντλίας κενού. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης δεν επιτρέπει την διόδο των βακτηρίων και έτσι αυτά κατακρατούνται στη μεμβράνη (1b).

Η μεμβράνη στη συνέχεια απομακρύνεται με αποστειρωμένη λαβίδα και μεταφέρεται σε τρυβλίο που περιέχει στερεό υπόστρωμα (1c) ανάλογα με την υπό εξέταση μικροχλωρίδα, ακολουθεί επώαση και οι αποικίες αναπτύσσονται επάνω στη μεμβράνη. Μπορούμε να τοποθετήσουμε διαδοχικά νέα μεμβράνη, να διηθήσουμε εκ νέου επιθυμητή ποσότητα νερού, να μεταφέρουμε την μεμβράνη σε άλλο τρυβλίο με διαφορετικό θρεπτικό υλικό και με αυτό τον τρόπο να εξετάσουμε διάφορες μικροχλωρίδες (π.χ. ΟΜΧ σε PCA, κολοβακτηριοειδή σε VRBA κ.α.).



Σχήμα 1. Μέθοδος διήθησης μέσω μεμβρανών

Η μέθοδος της διήθησης μέσω μεμβρανών χρησιμοποιείται εκτός από το νερό και σε οποιοδήποτε άλλο υγρό όπως αναψυκτικά, διαλύματα ζάχαρης κ.α.

Επίσης αποτελεί μέθοδο αποστείρωσης διαλυμάτων που είναι θερμοευαίσθητα και δεν μπορούν να αποστειρωθούν με θέρμανση (π.χ. διαλύματα αντιβιοτικών) αρκεί και η κάτω φιάλη όπου συλλέγεται το διάλυμα να είναι αποστειρωμένη

ΚΥΑ Υ2/2600/2001

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

ΜΕΡΟΣ Α

Μικροβιολογικές παράμετροι

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή (αριθμός/100 ml)
Escherichia coli (E. coli)	0
Εντερόκοκκοι	0

Για το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία, ισχύουν τα ακόλουθα:

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή
Escherichia coli (E. coli)	0/250 ml
Εντερόκοκκοι	0/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	0/250 ml
Αριθμός αποικιών σε 22 °C	100/ml
Αριθμός αποικιών σε 37 °C	20/ml

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Harrigan, W.F. (1998) Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd edn. Academic Press

WHO Global Foodborne Infections Network (2010) Laboratory Protocol "Isolation of *Salmonella* spp. from Food and Animal Faeces.