



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



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

## ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

### 3.1. Γενικές αρχές

Τα τρόφιμα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας μόλυνσέως και ρυπάνσεώς τους, είναι πάντοτε φορείς μικροοργανισμών. Τα μικρόβια αυτά συμμετέχουν στις φυσικοχημικές και βιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στα τρόφιμα. Αυτό αποτελεί και το αντικείμενο της επιστήμης της μικροβιολογίας των τροφίμων.

Ο όρος "μικρόβιο" ή "μικροοργανισμός" είναι όρος της τεχνολογίας και αφορά ένα σύνολο εμβίων όντων από διάφορες ταξινομικές ομάδες με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί είναι άρατοι με γυμνό οφθαλμό, με μικροσκοπικές διαστάσεις μεγαλύτερες από τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου (0.16 μ). Γενικά, πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς ή κοινοκυτταρικούς χωρίς εγκάρσια τοιχώματα ή και πολυκυτταρικούς χωρίς όμως διαφοροποίηση των κυττάρων για σχηματισμό οργάνων ή ιστών.

Σύμφωνα με τον Haeckel, οι μικροοργανισμοί κατατάσσονται στα πρώτιστα, τα οποία διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- α) τα **ευκαρυωτικά** (φύκη, πρωτόζωα, μύκητες, μυξομύκητες) και
- β) τα **προκαρυωτικά** (βακτήρια, κυανοπράσινα φύκη, μυκοπλάσματα).

Ανάλογα με την πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας, τα μικρόβια διαιρούνται σε τέσσερις ομάδες:

- α)τα φωτοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub>,
- β)τα φωτοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις,
- γ) τα χημειοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν το CO<sub>2</sub> ως μοναδική πηγή άνθρακα και αντλούν ενέργεια από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ανοργάνων ουσιών, και
- δ)τα χημειοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ουσίες και αντλούν ενέργεια από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οργανικών πάντα ουσιών.

Τα μικρόβια της τελευταίας ομάδας, τα χημειοετερότροφα, είναι αυτά που ενδιαφέρουν κυρίως τη μικροβιολογία τροφίμων και διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη σχέση τους προς το υπόστρωμα ή τον ξενιστή πάνω στον οποίο αναπτύσσονται. Έτσι, διακρίνονται σε:

α) παθογόνα μικρόβια, τα οποία αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς και δημιουργούν με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους παθολογικές καταστάσεις. Στην περίπτωση μας ενδιαφέρον παρουσιάζουν μόνο όσα μικρόβια μεταφέρονται με τα τρόφιμα και το πόσιμο νερό, φθάνουν ως τον άνθρωπο και τα ανώτερα ζώα, τον μολύνουν και δημιουργούν παθολογικές καταστάσεις.

β) παράσιτα μικρόβια, που αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς χωρίς να δημιουργούν νοσηρές ή παθολογικές καταστάσεις, τουλάχιστον υπό ομαλές συνθήκες. Αν όμως μειωθεί η ανοχή του οργανισμού (π.χ. λοιμώξεις), τότε εξελίσσονται σε ισχυρά παθογόνα και προξενούν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις.

γ) σαπρόφυτα μικρόβια, που αναπτύσσονται πάνω σε νεκρή οργανική ουσία (όπως είναι πολλά τρόφιμα) και όχι πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς. Αναπτυσσόμενα όμως πάνω στα τρόφιμα προξενούν αλλοιώσεις, οπότε είναι ανεπιθύμητα, ή διασπάσεις προς ενδιάμεσα προϊόντα που είναι πολύτιμα για τον άνθρωπο, οπότε είναι ωφέλιμα.

Στο ταξινομικό σύστημα των μικροβίων αναγνωρίζονται οι ακόλουθες ταξινομικές κατηγορίες: **τάξη, γένος (genus), είδος (species), στέλεχος (strain)**.

Το είδος παρουσιάζει μια υψηλή βαθμίδα φαινοτυπικής ομοιότητας και σημαντικής ανομοιότητας ως προς άλλα αθροίσματα συγγενών πληθυσμών. Τα διάφορα στελέχη έχουν μεγάλη σημασία για την Μικροβιολογία Τροφίμων. Γένος και είδος συμβολίζονται με μια διώνυμη λατινική ονομασία (σε πλάγια γραφή). Για παράδειγμα στο *Saccharomyces cerevisiae*, ο όρος *Saccharomyces* αντιπροσωπεύει το γένος, ο όρος *cerevisiae* το είδος, ενώ χρησιμοποιούνται περισσότερα από 1000 διαφορετικά στελέχη της ζύμης *S. cerevisiae* ως μαγιές ψωμιού, κρασιού ή μύρας.

Μια κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών, η οποία είναι πρακτική για τα τρόφιμα, είναι η εξής:

A. Βακτήρια,

B. Ζυμομύκητες,

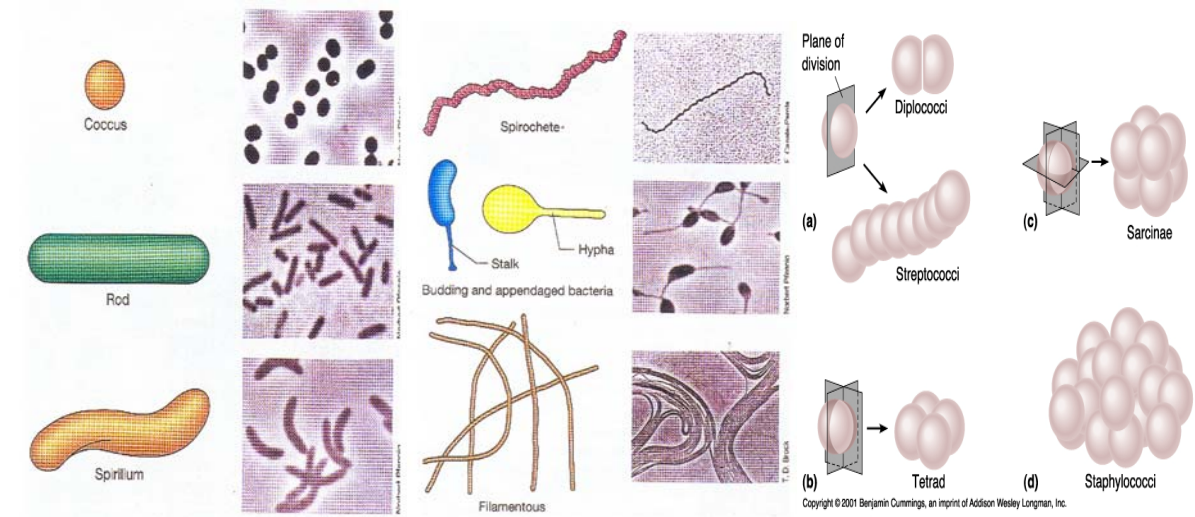
Γ. Ευρωτομύκητες.

Οι μικροοργανισμοί των τροφίμων μπορεί να είναι είτε ανεπιθύμητοι (παθογόνοι ή αλλοιωγόνοι), είτε χρήσιμοι (ζυμώσεις, ωρίμανση).

## **A. Βακτήρια**

Πρόκειται για μικροσκοπικούς μονοκύτταρους οργανισμούς, που πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Είναι ετερότροφοι, αγενείς, χωρίς διάκριτο κυτταρικό πυρήνα, χωρίς

χλωροφύλλη και με σφαιρικό (κοκκώδες), ραβδόμορφο ή σπειροειδές σχήμα. Τα σφαιρικά διαιρούνται προς κάθε επίπεδο και διακρίνονται σε διπλόκοκκους, τετράκοκκους, σαρκίνες, στρεπτόκοκκους και σταφυλόκοκκους. Τα ραβδόμορφα διαιρούνται εγκάρσια και διακρίνονται σε λεπποτριχοειδή κλωστρίδια (διόγκωση στο μέσο) κεφαλοσπόρια (διόγκωση στο άκρο). Τα σπειροειδή είναι σαν τα ραβδόμορφα παρουσιάζουν όμως απολήξεις ή ελικοειδή περιστροφή και διακρίνονται σε δονάκια και σπειρύλια. Τα βακτήρια που παρουσιάζουν σπορίωση ονομάζονται βάκιλλοι.



Σχήμα 3.1. Μορφολογία διαφόρων βακτηρίων

Τα βακτήρια, ανάλογα με τη χρώση τους κατά Gram, διακρίνονται σε θετικά (+) αν η τελική χρώση τους είναι κυανοϊώδης και σε αρνητικά (-) αν είναι κόκκινη. Η χρώση κατά Gram είναι μια διαδικασία προσθήκης διαλυμάτων Α (κρυσταλλοϊώδες σε οινόπνευμα) και Β (Lugol: υδατικό διάλυμα I<sub>2</sub> και KI) και τέλος φουξίνης. Η χρώση κατά Gram εξαρτάται από τη σύσταση και τη στρωμάτωση του βακτηριακού τοιχώματος και είναι θεμελιακή ιδιότητα που συνδέεται με διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παθογένεια, την αντοχή στα αντιβιοτικά και άλλους παράγοντες.

Η κυτταρική οργάνωση των βακτηρίων παρουσιάζει ορισμένες ιδιαιτερότητες:

- Δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα με κύριο συστατικό την πεπτιδογλυκάνη (με επιπλέον πολυσακχαρίτες για τα Gram (+) και πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες για τα Gram (-) ).
- Διαχωρισμός περιεχομένου σε κυτόπλασμα και πυρηνόπλασμα (κυκλικό διπλής περιελίξεως DNA, χωρίς μεμβράνη και οργανίδια).
- Πλασμίδια
- Έλλειψη γένους και μείξη κληρονομικής ουσίας μέσω συζευκτικών μηχανισμών.
- Έλυτρο: πηκτώδης περιβάλλουσα πολυσακχαρική μάζα με γλοιώδη υφή (χαρακτηριστική στα χαλασμένα από βακτήρια τρόφιμα).
- Βλεφαρίδες (ή μαστίγια): Εκφύσεις χαρακτηριστικές του βακτηρίου
- Σπόρια: συμπύκνωση κυτταρικού υλικού, που αποτελεί ένα μέσο άμυνας των κυττάρων. Τα σπόρια αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ κάτω από ευνοϊκές συνθήκες δίδουν εκ νέου βλαστικά βακτήρια (germination).

Όσον αφορά την ταξινόμηση των βακτηρίων, η πιο πρόσφατη και περισσότερο αποδεκτή καλύπτεται από αυτήν των προκαρυωτικών κατά Bergey (1984) σε 17 ομάδες.

Πρόκειται για μια εμπειρική ταξινόμηση με βάση τη μορφολογία, τη χρώση κατά Gram, την παθογένεια, το άθροισμα αζωτούχων βάσεων στο DNA, κ.λ.π.

Από το σύνολο των βακτηρίων μόνο ορισμένα είδη αφορούν τη βιομηχανία τροφίμων. Αυτά ανήκουν στις ομάδες 2, 4, 5, 12, 13, 14 και 15. Βάσει της δράσης τους μπορούν πρακτικά να κατηγοριοποιηθούν σε:

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΟΛΥΝΣΕΩΣ** : εκδήλωση παθογένειας δια προσβολής του δέκτη ή μέσω τοξίνης

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ** : ανεπιθύμητες αλλαγές οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μη παθογόνες,

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΩΦΕΛΙΜΙΣΤΙΚΗΣ ΧΡΗΣΗΣ** : για την παραγωγή χρήσιμων για τον άνθρωπο προϊόντων του μεταβολισμού τους όπως γαλακτικό οξύ (σε τρόφιμα όπως γιαούρτια, τυριά, βουτυρόγαλα, ελιές, τουρσιά, πίκλες, σαλάμι αέρος), προπιονικό οξύ (σε τυριά ελβετικού τύπου Emmenthaler), οξεικό οξύ (παραγωγή ξυδιού) κτλ

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1

ΟΜΑΔΑ 1.	Οι Σπειροχαίτες (Spirochetes) Γένη: Spirochaeta, Treponema, Borrelia κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 2.	Αερόβια / Μικροαερόφιλα, Κινούμενα, Ελικοειδή / Βιμπριοειδή. Αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Aerobic / Microaerophilic, Motile, Helical / Vibrioid Gram - Negative Bacteria). Γένη: Spirillum, Campylobacter κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 3.	Μη κινούμενα (ή σπανίως κινούμενα), αρνητικά κατά Gram, καμπύλα βακτήρια (Nonmotile or Rarely Motile, Gram Negative Curved Bacteria).
ΟΜΑΔΑ 4.	Αρνητικά κατά Gram, αερόβια ραβδία και κόκκοι (Gram Negative Aerobic Rods and Cocci). Οικογένειες: Pseudomonadaceae, Halobacteriaceae, Acetobacteriaceae, κ.λ.π. Γένη: Alcaligenes, Brucella κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 5.	Προαιρετικώς αναερόβια αρνητικά κατά Gram ραβδία (Facultatively Anaerobic Gram - Negative Rods). Οικογένειες: Enterobacteriaceae, Vibrionaceae κ.λ.π. Γένη: Zymomonas, Streptobacillus κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 6.	Αναερόβια, αρνητικά κατά Gram, ευθέα, καμπύλα ή ελικοειδή ραβδία (Αναεροβίω Γραμ - Νεγατιωε Στραιγητ , Ψθρωεδ ανδ Ηελιωαλ Ροδσ).
ΟΜΑΔΑ 7.	Αποικοδομούντα θεικά και ανάγοντα το θείο βακτήρια (Dissimilatory Sulfate - or - Sulfur - Reducing Bacteria). Γένη: Desulfovibrio, Desulfomonas κ.λ.π
ΟΜΑΔΑ 8.	Αναερόβιοι αρνητικοί κατα Gram κόκκοι (Anaerobic Gram - negative Cocci).
ΟΜΑΔΑ 9.	ΡΙκέττσιες και Χλαμύδια (Rickettsias and Chlamydias).
ΟΜΑΔΑ 10.	Μυκοπλάσματα (Mycoplasmas).
ΟΜΑΔΑ 11.	Ενδοσυμβιωτές (Endosymbionts).
ΟΜΑΔΑ 12.	Κόκκοι θετικοί κατά Gram (Gram - positive Cocci). Οικογένεια: Micrococcaceae. Γένη: Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus Sarcina κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 13.	Σποριογόνα θετικά κατά Gram ραβδία και κόκκοι (Endospore - forming Gram positive Rods and Cocci). Γένη: Bacillus, Clostridium, Sporosarcina κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 14.	Κανονικά ασποριογόνα, θετικά κατά Gram ραβδία (Regular, Non-sporing, Gram - positive Rods). Γένη: Lactobacillus, Listeria, Brochothrix κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 15.	Ακανόνιστα, ασποριογόνα, θετικά κατά Gram ραβδία (Irregular, Nonsporing, Gram-Positive Rods). Γένη: Corynebacterium, Actinomyces, Bifidobacterium κ.λ.π.
ΟΜΑΔΑ 16.	Mycobacteria (Μυκοβακτήρια). Οικογένεια: Mycobacteriaceae.Γένος: Mycobacterium.
ΟΜΑΔΑ 17.	Nocardioforms (Νοκαρδιότυπα). Γένη: Nocardia, Rhodococcus, Saccharopolyspora κ.λ.π.

Τα βακτήρια είναι η κυριότερη πηγή μόλυνσεως και αλλοίωσης των τροφίμων. Η συγκριτική “υπεροχή” τους αυτή έναντι των άλλων μικροβίων οφείλεται:

- I. Στη μεγάλη παραλλακτικότητα των διαφόρων ειδών τους ως προς τις απαιτήσεις σε pH, θρεπτικά συστατικά, θερμοκρασία, ERH.
- II. Στη δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων
- III. Στη δυνατότητα αναερόβιας ανάπτυξης
- IV. Στην έκκριση τοξινών

## **ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ**

### Εμπειρικός κανόνας:

Τα Gram ( - ) βακτήρια εκδηλώνουν παθογένεια δια προσβολής του δέκτη (ανθρώπου). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων συμβαίνει μετά από τουλάχιστον 24h. Τα συμπτώματα διαρκούν και καταπονούν αλλά είναι σπανίως θανατηφόρα. π.χ. *Salmonella* spp. Εξαιρέση: Τα *Escherichia coli* είναι Gram ( - ) βακτήρια αλλά παράγουν τοξίνη.

Τα Gram ( + ) βακτήρια εκδηλώνουν παθογένεια μέσω τοξίνης. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων συμβαίνει εντός 1- 6 ωρών. Τα συμπτώματα διαρκούν 24-48 h και καταπονούν αλλά δέν είναι επικίνδυνα π.χ. *Staphylococcus aureus*. Σημαντική εξαίρεση στον κανόνα αυτό είναι το Gram ( + ) *Clostridium botulinum* που παράγει μια ισχυρότατη θανατηφόρο νευροτοξίνη.

### **Παθογόνα G (-) βακτήρια:**

*Salmonella, spp., Shigella spp., Escherichia coli, Campylobacter jejuni, Vibrio parahaemolyticus*

Βρίσκονται: σε έντερα, κόπρανα, έδαφος, γάλα, κρέας (πουλερικά), θαλασσινά.

Είναι δείκτες μη τήρησης ορθής βιομηχανικής πρακτικής και καλής υγιεινής πρακτικής- Good Manufacturing Practices (GMP) και Good Hygiene Practices (GHP).

Ελέγχονται με θερμική κατεργασία, διαχωρισμό α' υλών - ετοιμών, GHP, άλλα "εμπόδια".

### **Παθογόνα G (+) βακτήρια:**

*Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus subtilis.*

**Emerging pathogens** ("αναδύομενα" παθογόνα: βακτήρια και των δύο παραπάνω κατηγοριών η επικινδυνότητα και η επιδημιολογική σημασία των οποίων καθώς και η ανάγκη λήψεως ειδικών μέτρων κατά την παραγωγή των σχετικών τροφίμων αναγνωρίστηκε πρόσφατα):

*Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides, Vibrio vulnificus, Escherichia coli O157 H7*

Στους επόμενους δύο πίνακες δίνονται υπό μορφή συστηματοποιημένης βάσης δεδομένων τα στοιχεία των κυριότερων παθογόνων βακτηρίων περιλαμβανομένων της προέλευσης τους, των τροφίμων που συναντώνται, της επικινδυνότητάς τους, της παθογόνου δόσης, περιόδου επώασης και συμπτωμάτων, της μορφολογίας και των συνθηκών ανάπτυξης. Τα στοιχεία αυτά διευκολύνουν την εκτίμηση της επικινδυνότητας και τον ορισμό κρισίμων ορίων και προληπτικών μέτρων, κατά την ανάπτυξη ενός σχεδίου διασφάλισης ασφάλειας (HACCP) διεργασίας συγκεκριμένου τροφίμου.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

Βακτήριο	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<b>Ιδιότητα</b>					
Φυσικό περιβάλλον	Πουλερικά, κατοικίδια και άγρια ζώα, άνθρωπος, έντομα, πουλιά	Εδαφος, βλάστηση, άνθρωπος, λύματα, νερό, ζώα (ευρεία διάδοση)	Νερό, χοιρίδια, τρωκτικά	Εδαφος, φερέτες ύλες γλυκού νερού, βλάστηση (ευρεία διάδοση)	Εδαφος, θαλάσσια ιζήματα, σκόνη, περιπτώματα
Τρόφιμα σχετιζόμενα	Γάλα, ωμά πουλερικά, αυγά, ωμό κρέας	γάλα, μαλακά τυριά, ωμό κρέας, παγωτά, λαχανικά	γάλα, παγωτά, λαχανικά, ωμό χοιρινό.	ανεπαρκώς επεξεργασμένες ή επιμολυσμένες κονσέρβες	Κιμάς, πουλερικά, χοιρινό, γαλακτοκομικά προϊόντα
Σημαντικότητα	Συνήθης υπεύθυνος τροφικής παθογένειας λόγω κακής υγιεινής ή ανεπαρκούς επεξεργασίας Έντονα συμπτώματα. Σπάνια θανατηφόρο	Δυνατότητα ανάπτυξης σε T ψυγείου. Μικροοργανισμός ευρείας διάδοσης. Θανατηφόρο σε 30% των προσβαλομένων.	Αυξανόμενος αριθμός κρουσμάτων. Συμπτώματα παρεμφερή με κρίση σκληροκοειδίτιδας.	Σπόρια πολύ ανθεκτικά σε θέρμανση - ξήρανση και χημικούς παράγοντες. Τοξίνη ευαίσθητη στη θέρμανση αλλά πολύ θανατηφόρος.	Συνήθης αίτιος τροφικής παθογένειας. Θερμοάντοχα σπόρια. Παράγει τοξίνη αφού εισέλθει στο έντερο διά του μολυσμένου τροφίμου
Παθογόνος δόση	Χαμηλή: 5-24/ml γάλα, 4/kg γάλα σκόνη, 1-5/100g τυρί	10 <sup>4</sup> – χαμηλότερη για άτομα με επιβαρυνμένο ανοσοποιητικό σύστημα	Άγνωστη - πιθανόν υψηλή (> 10 <sup>6</sup> )	πολύ χαμηλή 0.2 μg τοξίνης	Υψηλή 10 <sup>6</sup> - 10 <sup>9</sup> /g τροφίμου (8-10 mg τοξίνης)
Περίοδος επώασης	12 - 72 hr	8 μέρες - 3 μήνες	1-10 μέρες	<18-96 ώρες	8-24 ώρες
Συμπτώματα	Ναυτία, εμετοί, κοιλιακοί πόνοι, πονοκέφαλοι, ρίγη, πυρετός. Διάρκεια: 2-3 μέρες.	Από γρίπτης έως μηνιγγίτιδας. Προκαλεί αποβολές.	Διάρροια, πυρετός, έμετοι, οξύς πόνος στο δεξί χαμηλό μέρος της κοιλίας.	Σκοτοδίνη, διαταραχές όρασης, αδυναμία κατάποσης → παράλυση και θάνατος	Διάρροια, ναυτία, αέρια
Μορφολογία	Gram(-) κοντά ραβδία με περιμετρικές βλεφαρίδες, 0.5-0.7x1.0-3.0 μ	Gram(+) κοντά ραβδία, 0.4-0.5x0.5-2.0 μ	Gram(-) κοντά ραβδία, 0.5-0.1x1.0-2.0 μ	Gram(+) σπορογόνα ραβδία, 0.5-2.4x1.7-22.0 μ	Gram(+) σπορογόνα ραβδία, 0.9-1.3x3.0-9.0 μ
Απαιτήσεις σε O <sub>2</sub>	Προαιρετικά αναερόβιο	Αερόβιο ή μικροαερόφιλο	Προαιρετικά αναερόβιο	Αναερόβιο	Αναερόβιο (μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία O <sub>2</sub> στη λογαριθμική φάση)
Θερμοκρασίες ανάπτυξης ( °C)	Μέγιστη 45-47 Βέλτιστη 37 Ελάχιστη 5.1	45 25-30 0	44 32-34 0-1	48 30-37 3.3 (μη πρωτεολυτικός τύπος E) 10.0(πρωτεολυτικοί τύποι A,B,...)	50 43-45 12
Περιοχή τιμών pH	Μέγιστη 9.0 Βέλτιστη 6.5-7.5 Ελάχιστη 4(HCl/κιτρικό) 4.4(γαλακτικό) 5.4(οξεικό)	9 7-7.5 4.4 στους 30° C (pH 5.0 στους 4°C)	9 7.0-8.0 4.6	9 6.5-7.0 5.0 (μη πρωτεολυτικός τύπος E) 4.6 (πρωτεολυτικοί τύποι A,B, ...)	8.3 6-7.5 5.0
Ελάχιστο aw για ανάπτυξη	0.95	0.92	0.95	0.97 (μη πρωτεολυτικός τύπος E) 0.94 (πρωτεολυτικοί τύποι A,B,...)	0.95
Μέγιστο % NaCl για ανάπτυξη	8	10	5-8	5 (μη πρωτεολυτικός τύπος E) 10 (πρωτεολυτικοί τύποι A,B, ...)	6



<b>Βακτήριο</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b><i>Bacillus Cereus</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i> 0157 H7</b>	<b><i>Aeromonas hydrophila</i></b>
<b>Ιδιότητα</b>				
Φυσικό περιβάλλον	Δέρμα, αμυχές, βλενογόνο.	Εδαφος, βλάστηση, γάλα	βοοειδή, κοπριά, κρέας, γάλα.	Γλυκά νερό, λύματα, θαλάσσιο νερό.
Τρόφιμα σχετιζόμενα	Ψάρια, κρέας, γάλα, τυρί, ζυμαρικά, αλλαντικά.	Ρύζι, μπαχαρικά, κρέας, γάλα, λαχανικά, ξηροί καρποί.	Κιμάς, κρέατα, γάλα.	Θαλασσινά, κόκκινο κρέας, πουλερικά, γάλα.
Σημαντικότητα	Μπορεί εύκολα να περάσει από τους ανθρώπους στο τρόφιμο σε συνθήκες μη σωστών χειρισμών. Παράγει θερμοάντοχη τοξίνη.	Θερμοάντοχα σπόρια. Δυνατότητα μόλυνσης με παραγωγή τοξίνης ή με πολλαπλασιασμό στο έντερο.	εντεροαιμορραγικό έντονα συμπτώματα - πιθανόν θανατηφόρα.	Ασθενείς με επιβαρυνόμενο ανοσοποιητικό σε κίνδυνο. Δυνατότητα ανάπτυξης σε Τ ψυγείου παράγει δύο τύπους τοξίνης.
Παθογόνος δόση	1 mg τοξίνης (για παραγωγή τοξίνης απαιτούνται 10 <sup>6</sup> /g κύτταρα)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>6</sup>	Άγνωστη	Άγνωστη
Περίοδος επώασης	2-6 ώρες	Διαρροϊκή τοξίνη 6-15 ώρες Εμετική τοξίνη 1/2 - 6 ώρες	3-9 μέρες	Άγνωστη
Συμπτώματα	Ναυτία, έμετοι και διάρροια που διαρκούν 1-2 μέρες	Ναυτία, έμετοι, διάρροια	Αιμορραγική κολίτιδα, αιμορραγική διάρροια, νεφρική ανεπάρκεια, θάνατος.	Διάρροια, έμετοι, κοιλιακοί πόνοι, πυρετός. Μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα και σηψαιμία.
Μορφολογία	Gram(+) σταφυλόκοκκοι διαμέτρου 0.7-0.9 μ	Gram(+) σπορογόνα ραβδία 1.0-1.2 x 3.0-7.0 μ	Gram(-) ραβδία 1.1-1.5 x 2-6 μ	Gram(-) ραβδία με στρογγυλεμένα άκρα 0.3-1.0 x 1.0-4.4 μ
Απαιτήσεις σε O <sub>2</sub>	Προαιρετικά αναερόβιο	Προαιρετικά αναερόβιο	Προαιρετικά αναερόβιο	Προαιρετικά αναερόβιο
Θερμοκρασίες ανάπτυξης (° C)	Μέγιστη 48 Βέλτιστη 37 Ελάχιστη 7-11	49 30 10	45 37 10	42 28 1-4
Περιοχή τιμών pH	Μέγιστη 9.8-10 Βέλτιστη 6.0-7.0 Ελάχιστη 4.0	9.3 6-7.5 4.35	9.5 6-7 4.4	10 4
Ελάχιστο aw για ανάπτυξη	0.86 (για παραγωγή τοξίνης 0.9)	0.912	0.95	άγνωστη
Μέγιστο % NaCl για ανάπτυξη	18.2 (για παραγωγή τοξίνης 10%)	10	6-8	7.5

## **B. Ζυμομύκητες**

Πρόκειται για ελλειψοειδείς, σφαιρικούς ή ραβδόμορφους μικροοργανισμούς. Το μέγεθός τους ποικίλλει από 2-6 μm, ενώ ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται με εκβλάστηση, διχοτόμηση (σχιζομύκητες) ή σπορογονία (δυσμενείς συνθήκες). Μπορεί να είναι σπορογόνοι ή και άσποροι.

Η κυτταρική οργάνωση των ζυμομυκήτων περιλαμβάνει:

-Κυτταρικό τοίχωμα από ημικυτταρίνη, χιτίνη. (Συχνά γλοιώδες περίβλημα που προκαλεί συγκόλληση).

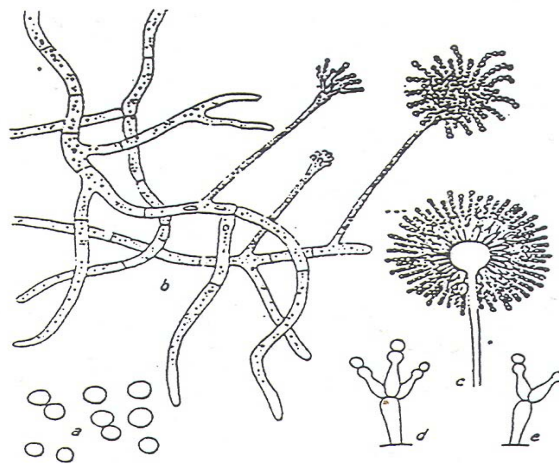
-Κυτταρική μεμβράνη

-Κυτταρόπλασμα με πυρήνα, χυμοτόπια και σπειρωτά κοκκία.

Οι ζυμομύκητες είναι αερόβιοι, ανθεκτικοί σε χαμηλό pH και ενεργότητα νερού, αλλά είναι ευαίσθητοι στη θερμοκρασία. Οι ζυμομύκητες προκαλούν αλλοιώσεις, αλλά όχι παθογένεια.

## **Γ. Ευρωτομύκητες (Μούγλες)**

Είναι πολυκύτταροι μικροοργανισμοί νηματοειδούς μορφής. Όσον αφορά την οργάνωσή τους, αποτελούνται από ένα βλαστικό κι ένα καρποφόρο μέρος. Το βλαστικό μέρος περιλαμβάνει διακλαδωμένα νηματοειδή κύτταρα (νηματώδη υφή) που σχηματίζουν μυκήλια. Το καρποφόρο μέρος αποτελεί μια νηματώδη υφή που σχηματίζει σπόρια (γονιδιοφόρος). Οι ευρωτομύκητες όπως και ζυμομύκητες είναι αερόβιοι, ανθεκτικοί σε χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλό pH και ενεργότητα νερού, και συνήθως ευαίσθητοι σε ψηλές θερμοκρασίες.



Σχήμα 3.2. *Aspergillus niger*

a) Γονίδια b)Μυκήλιο με γονιδιοφόρα c)Γονιδιοφόρα d,e)Διακλαδωμένα στηρίγματα

Οι ευρωτομύκητες διακρίνονται σε παθογόνους και κοινούς. Οι τελευταίοι μπορεί να είναι ευρωτομύκητες εδάφους, αλλοίωσης ή ωφέλιμοι (ωρίμανση τυριού, οργανικά οξέα, αντιβιοτικά, ένζυμα). Οι ευρωτομύκητες που αναπτύσσονται στα τρόφιμα δεν είναι παθογόνοι με εξαίρεση την κάτω από ορισμένες ακραίες συνθήκες κακής πρακτικής δυνατότητα παραγωγής από ορισμένους μυκοτοξινών που είναι ιδιαίτερα τοξικές. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες είναι:

Αφλατοξίνες ( από *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*)

Τύποι: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (σε ξηρούς καρπούς, δημητριακά) και M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> (μεταβολίτες των B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> σε γάλα)

Με αποθήκευση σε υγρές συνθήκες ή ανάπτυξη του καρπού σε συνθήκες ξηρασίας.

Προκαλούν ηπατοπάθειες.

Οχρατοξίνες ( από *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* spp.)

Σε καλαμπόκι, φασόλια, φυστίκια.

Προκαλούν νεφροπάθειες.

Πατσουλίνη (patulin) (από *Penicillium*)

Σε μονχλιασμένα φρούτα, φρουτοχυμούς.

Καρκινογόνο, αιμοραγίες.

Τριχοθεσίνες (trichothecenes) (*Fusarium graminearum*)

Τύποι: Ζεαραλινόνη, δεοξυνιβαλενόλη (DON).

Σε σίτο, καλαμπόκι.

### **3.2. Συνθήκες ανάπτυξης των μικροβίων στα τρόφιμα**

Τα μικρόβια, όπως αναφέρθηκε, είναι διαδεδομένα παντού. Τα τρόφιμα όμως φέρουν κατά κανόνα μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο απ' ότι οι άλλες μορφές οργανικής και πολύ περισσότερο ανόργανης ύλης. Οι διάφορες πηγές μόλυνσης των τροφίμων είναι οι εξής: 1) ο άνθρωπος, 2) το πεπτικό σύστημα αγροτικών ζώων, 3) τα έντομα (μύγες, κολεόπτερα), 4) τα τρωκτικά, 5) τα σπλάχνα και τα βράγχια θαλασσινών, 6) τα αστικά λύματα, 7) η κοπριά των ζώων, 8) η σκόνη, 9) το έδαφος, 10) το νερό.

Η μόλυνση όμως του τροφίμου με μικροοργανισμούς δεν συνεπάγεται αναγκαστικά και την αλλοίωσή του. Για να αλλοιώσουν το τρόφιμο που έχουν μολύνει, θα πρέπει τα μικρόβια να αυξηθούν σε αριθμό (να πολλαπλασιαστούν). Για να είναι εφικτός όμως ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων πρέπει να συντρέξουν ορισμένες προϋποθέσεις και να εξασφαλισθούν ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ο απρόσκοπτος πολλαπλασιασμός των μικροβίων επιζητείται στις καλλιέργειες που έχουν ως στόχο την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου ενός τροφίμου, στις επιθυμητές και ελεγχόμενες από τον άνθρωπο ζυμώσεις και οξειδώσεις και όταν τα μικρόβια χρησιμοποιούνται στην παρασκευή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (single cell protein).

Αντίθετα, για τη συντήρηση των τροφίμων με οποιαδήποτε μέθοδο, επιζητείται η παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των μικροβίων.

Γενικά οι παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό και κατ' επέκταση τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων στα τρόφιμα διακρίνονται σε: α) ενδογενείς, που σχετίζονται με τη σύσταση του τροφίμου (pH, Eh,  $a_w$ , θρεπτικά συστατικά, αντιμικροβιακοί παράγοντες, ανταγωνιστική χλωρίδα) και β) εξωγενείς, που σχετίζονται με τις συνθήκες συντήρησης (T, RH, P,  $p_{O_2}$ ,  $p_{CO_2}$ , κ.λ.π.)

Οι παράγοντες που επηρεάζουν, ή ορθότερα, προσδιορίζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των μικροβιακών κυττάρων, βρίσκονται σε συνεχή μεταξύ τους αλληλεξάρτηση και αλληλεπίδραση. Έτσι, το τελικό αποτέλεσμα δεν εξαρτάται μόνο από την απόλυτη τιμή καθενός από τους υπεύθυνους για την ανάπτυξη των μικροβίων παράγοντες, αλλά και από τον βαθμό στον οποίο ο παράγοντας αυτός επηρεάζει ή επηρεάζεται από όλους τους άλλους.

Για κάθε παράγοντα που επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οποιουδήποτε μικροβίου, έχουν προσδιορισθεί τρεις τιμές, η ελάχιστη (minimum), η άριστη (optimum) και η μέγιστη (maximum). Οι τιμές αυτές για κάποιους μικροοργανισμούς για τη θερμοκρασία, το pH και την ενεργότητα του νερού φαίνονται αντίστοιχα στους πίνακες 3.3, 3.4, και 3.5. Τα κύτταρα του μικροβίου πολλαπλασιάζονται σ' όλο το εύρος της διακυμάνσεως, μεταξύ των δύο ακραίων τιμών, ο ρυθμός όμως του πολλαπλασιασμού μειώνεται συνεχώς με την μετακίνηση από το μέσο προς τα δύο άκρα. Η φάση δηλαδή της καθυστέρησης (lag phase) και ο χρόνος μέσα στον οποίο ολοκληρώνεται μια κυτταρική διαίρεση επιμηκύνεται συνεχώς μέχρι που πρακτικά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και ο μεταβολισμός μηδενίζονται υπό αντίξοες συνθήκες.

Πίνακας 3.3

<b>Ευρος διακύμανσης της θερμοκρασίας αναπτύξης για επιλεγμένα μικρόβια</b>			
Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασία (°C)		
	Minimum	Optimum	Maximum
Bacteria	5	-	42
<i>Acetobacter</i>	0-5	25-30	38-40
<i>Aeromonas</i>	10	-	47-50
<i>Bacillus cereus</i>	5	-	42
<i>Brevibacterium</i>	0-45	-	60
<i>Clostridium</i>	3-10	30-40	42-45
<i>C. botulinum</i>	15-20	30-40	45-51
<i>C. perfringens</i>	0	20-25	30
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	43-45	55-62	70-71
<i>Escherichia coli</i>	3-10	37-41	48-50
<i>Lactobacillus</i>	5	30-40	53
<i>Leuconostoc</i>	10	20-30	40
<i>Micrococcus</i>	10	25-30	45
<i>Moraxella</i>	-1-2	30	41-42

<i>Propionibacterium</i>	2-3	30-37	45
<i>Proteus</i>	10	37	43-45
<i>Pseudomonas</i>	-7-4	20-30	31-43
<i>P. aeruginosa</i>	8	-	42
<i>P. fluorescens</i>	0-6	20-25	40
<i>Salmonella</i>	5-10	35-37	46-49
<i>Staphylococcus</i>	5-10	35-40	46-48
<i>S. aureus</i>	5-10	35-39	44-48
<i>Streptococcus cremoris</i>	-	25-30	-
<i>S. faecalis</i>	5-10	37	49-51
<i>S. lactis</i>	10-15	25-30	40
<i>S. thermophilus</i>	20	40-45	52
<i>Vibrio</i>	-	10-37	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	3-13	35-37	42-44
<i>Xanthomonas</i>	0-5	25-31	40
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0-4	-	37
<b>Molds</b>			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	30-40	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-1	20	30
<i>Cladosporium</i>	-1 - -8	-	-
<i>Penicillium rubrum</i>	-	25-28	-
<i>Rhizopus stolonifer</i>	5	-	25
<b>Yeasts</b>			
<i>Candida</i>	0	-	29-48
<i>C. lipolytica</i>	5	25	35-40
<i>Hansenula</i>	-	37-42	50
<i>Saccharomyces</i>	0-7	20-35	40
<i>Torulopsis</i>	0	17-25	30-35

Πίνακας 3.4

<b>Διακύμανση της τιμής του pH για την ανάπτυξη επιλεγμένων μικροβίων</b>			
Οργανισμός	pH		
	Minimum	Optimum	Maximum
Bacteria (most)	4.5	6.5-7.5	9.0
<i>Acetobacter</i>	4.0	5.4-6.3	-
<i>Bacillus subtilis</i>	4.2-4.5	6.8-7.2	9.4-10.
<i>Clostridium botulinum</i>	4.8-5.0	6.0-8.0	8.5-8.8
<i>C. perfringens</i>	5.0-5.5	6.0-7.6	8.5
<i>C. sporogenes</i>	5.0-5.8	6.0-7.6	8.5-9.0
<i>Erwinia carotovora</i>	4.6	7.1	9.3
<i>Escherichia coli</i>	4.3-4.4	6.0-8.0	9.0-10.0
<i>Gluconobacter oxydans</i>	4.0-4.5	5.5-6.0	-
<i>Lactobacillus (most)</i>	3.0-4.4	5.5-6.0	7.2-8.0
<i>L. acidophilus</i>	4.0-4.6	5.5-6.0	7.0
<i>L. plantarum</i>	3.5	5.5-6.5	8.0
<i>Leuconostoc cremoris</i>	5.0	5.5-6.0	6.5
<i>L. oenos</i>	-	4.2-4.8	7.8
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	2.9	4.5-6.5	-
<i>Propionibacterium</i>	4.7	6.2-7.0	7.5
<i>Proteus vulgaris</i>	4.4	6.0-7.0	8.4-9.2
<i>Pseudomonas (most)</i>	5.6	6.6-7.0	8.0
<i>P. aeruginosa</i>	5.6	6.6-7.0	8.0-9.0
<i>Salmonella (most)</i>	4.5-5.0	6.0-7.5	8.0-9.6
<i>S. typhi</i>	4.0-4.5	6.5-7.2	8.0-9.0
<i>S. choleraesuis</i>	5.0	7.0-7.6	8.2
<i>Serratia marcescens</i>	4.6	6.0-7.0	8.0

<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0-4.7	6.0-7.0	9.5-9.8
<i>Streptococcus lactis</i>	4.1-4.8	6.4	9.2
<i>Vibrio</i>	5.5-6.0	-	9.0
<i>V. cholerae</i>	-	8.6	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	4.8-5.0	7.5-8.5	11.0
<b>Yeasts</b>	1.5-3.5	4.0-6.5	8.0-8.5
<i>Hansenula</i>	-	4.5-5.5	-
<i>Kluyveromyces</i>	1.5-2.0	-	-
<i>Pichia</i>	1.5	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.0-2.4	4.0-5.0	-
<i>S. rouxii</i>	1.5	3.5-5.5	8.5-10.5
<b>Molds</b>	1.5-3.5	4.5-6.8	8.0-11.
<i>Aspergillus niger</i>	1.2	3.0-6.0	-
<i>A. oryzae</i>	1.6-1.8	-	9.0-9.3
<i>Botrytis cinerea</i>	-2.5	-	7.4
<i>Mucor</i>	-	3.0-6.1	9.2
<i>Penicillium</i>	1.9	4.5-6.7	9.3
<i>Rhizopus nigricus</i>	-	4.5-6.0	-

Πίνακας 3.5

Ελάχιστη τιμή $a_w$ για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών	
Οργανισμός	minimum $a_w$
Σπουδαιότερα βακτήρια προκαλούντα αλλοιώσεις	0.90-0.91
<i>Acinrtobacter</i>	0.95-0.98
<i>Aeromonas</i>	0.95-0.98
<i>Alcaligenes</i>	0.95-0.98
<i>Arthrobacter</i>	0.95-0.98
<i>Bacillus</i>	0.90-0.99
<i>B. cereus</i>	0.92-0.95
<i>Citrobacter</i>	0.95-0.98
<i>Clostridium botulinum</i>	0.90-0.98
Type A	0.93-0.95
Type B	0.93-0.96
Type E	0.94-0.97
<i>C. perfringens</i>	0.93-0.97
<i>Corynebacterium</i>	0.95-0.98
<i>Enterobacter</i>	0.95-0.98
<i>Escherichia coli</i>	0.94-0.97
<i>Flovobacterium</i>	0.95-0.98
<i>Klebsiela</i>	0.95-0.98
<i>Lactobacillus</i>	0.90-0.96
<i>Leuconostoc</i>	0.96-0.98
<i>Micrococcus</i>	0.90-0.95
<i>M. roseus</i>	0.90-0.93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.96-0.98
<i>P. fluorescens</i>	0.94-0.97
<i>Salmonella</i>	0.93-0.96
<i>Streptococcus</i>	0.92-0.98
<i>Staphylococcus albus</i>	0.88-0.92
<i>S. aureus</i>	0.83-0.92
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94-0.98
<i>Halophilic bacteria</i>	0.75
<i>Most yeasts</i>	0.87-0.94
<i>Osmophilic yeasts</i>	0.60-0.78
<i>Most molds</i>	0.70-0.80
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.60-0.61
<i>Aspergillus</i>	0.68-0.88
<i>A. glaucus</i>	0.70-0.75
<i>A. flavus</i>	0.78-0.90
<i>A. halophilicus</i>	0.68
<i>A. niger</i>	0.80-0.84
<i>Botrytis cinerea</i>	0.93
<i>Debaryomyces</i>	0.87-0.91
<i>Fusarium</i>	0.80-0.92
<i>Hansenula</i>	0.89-0.90
<i>Mucor</i>	0.80-0.93
<i>Penicillium</i>	0.78-0.90
<i>Rhodotorula</i>	0.89-0.92
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.90-0.94
<i>S. rouxii</i>	0.62-0.81
<i>Xerophilic molds</i>	0.60-0.70

**Θερμοκρασία:** Η θερμοκρασία αποτελεί πιθανώς τον σπουδαιότερο περιβαλλοντικό παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη, αλλά και τη δραστηριότητα των διαφόρων τύπων μικροβίων. Γενικά, η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να λάβει χώρα σ' όλη την κλίμακα μεταξύ  $-8^{\circ}\text{C}$  και  $90^{\circ}\text{C}$ . Συνήθως η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασιακό εύρος περίπου  $40^{\circ}\text{C}$ , χαρακτηριστικό για κάθε μικρόβιο (δηλαδή  $T_{\max}-T_{\min} \approx 40^{\circ}\text{C}$ ). Τα μικρόβια, με βάση το εύρος διακύμανσης της θερμοκρασίας μέσα στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν, χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες, δηλαδή τα θερμοφιλα, τα μεσόφιλα, τα ψυχρόφιλα και τα ψυχρότροφα, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6.

<b>Πίνακας 3.6: Διακύμανση της θερμοκρασίας ανάπτυξεως στις διάφορες κατηγορίες μικροβίων</b>			
Κατηγορία μικροβίων	Θερμοκρασία ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	Ελαχίστη	Αρίστη	Μεγίστη
Θερμόφιλα	35-45	45-65	60-90
Μεσόφιλα	5-10	25-45	35-47
Ψυχρόφιλα	-5 έως 0	12-15	15-20
Ψυχρότροφα	0 έως +5	25-30	30-35

### 3.3. Μέθοδοι απαρίθμησης μικροοργανισμών

Υπάρχουν αρκετές διαδικασίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό ενός μικροβιακού πληθυσμού. Αυτές περιλαμβάνουν: μικροσκοπικές μετρήσεις, ηλεκτρονικές μετρήσεις σωματιδίων, μετρήσεις σε τρυβλία (pour or spread plates), διάλυση (αραίωση) σε σωλήνες (tube dilution), τεχνική του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων (MPN), καλλιέργεια από μεμβράνη διήθησης, χημικούς δείκτες, τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), μέθοδοι οπτικής πυκνότητας, κ.ά. Ένα ιδανικό τεστ πρέπει να είναι ακριβές, γρήγορο, χρήσιμο για τους περισσότερους τύπους δειγμάτων και όχι ακριβό.

#### 1. Κατ' ευθείαν μέτρηση στο μικροσκόπιο (Direct Microscopic Count, DMC)

Η DMC είναι μια άμεση μέθοδος, η οποία όμως μετρά τον συνολικό αριθμό των κυττάρων χωρίς να διακρίνει τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα. Με τη μέθοδο αυτή τα αποτελέσματα αποκτούνται νωρίτερα από οποιαδήποτε άλλη διαδικασία αφού δεν χρειάζεται περίοδος επώασης για τον μεταβολισμό και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πρόκειται δηλαδή για μια ταχεία μικροβιολογική μέθοδο, εφόσον ο υπολογισμός του βακτηριακού φορτίου γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα, η οποία επιτρέπει την άμεση επέμβαση στον χειρισμό της διεργασίας για την αποκατάσταση οποιουδήποτε προβλήματος.

Η άμεση παρατήρηση και απαρίθμηση των μικροοργανισμών σε γνωστό όγκο τροφίμου είναι η ποσοτική αρχή στην οποία βασίζεται η DMC. Στα υγρά τρόφιμα ο προσδιορισμός είναι άμεσος, ενώ τα στερεά τρόφιμα πρέπει να διαλυθούν κατάλληλα πριν την ανάλυση. Κατά τη μέθοδο αυτή, μια γνωστή ποσότητα τροφίμου απλώνεται ομοιόμορφα σε μια προκαθορισμένη περιοχή πάνω σε πλάκα μικροσκοπίου. Το φιλμ ξηραίνεται, σταθεροποιείται, βάφεται με χρωστική και ο αριθμός των μικροβίων προσδιορίζεται με τη βοήθεια του μικροσκοπίου.

Παρά τα πλεονεκτήματα της DMC η εφαρμογή της περιορίζεται σε δείγματα με υψηλό αριθμό μικροβίων, ενώ δεν δίνει πληροφορίες για δείγματα με χαμηλό αριθμό μικροοργανισμών. Επίσης



μετρά και τα νεκρά και τα ζωντανά κύτταρα. Το γεγονός ότι εξετάζεται μόνο μικρή ποσότητα τροφίμου περιορίζει την ακρίβεια της μεθόδου. Η αξία της DMC εξαρτάται από το είδος του τροφίμου και των μικροοργανισμών που σχετίζονται με το τρόφιμο. Έτσι, για προϊόντα που έχουν υποστεί κατεργασία για τον έλεγχο των μικροβίων, όπως π.χ. θέρμανση, είναι αμφίβολο αν η DMC μπορεί να προβλέψει την διατηρησιμότητα του προϊόντος ή να προσδιορίσει την επικινδυνότητά του για τη δημόσια υγεία

## 2. Ηλεκτρονική μέτρηση σωματιδίων (Coulter)

Ο ηλεκτρονικός μετρητής βασίζεται στην αρχή ότι τα κύτταρα έχουν μικρή ηλεκτρική αγωγιμότητα σε σχέση μ' ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Ένα διάλυμα μικροβιακών κυττάρων σε κατάλληλο ηλεκτρολύτη φέρεται δια μέσου ενός ανοίγματος, το οποίο μεταφέρει ηλεκτρικό ρεύμα μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Τα κύτταρα που περνούν μέσα από το άνοιγμα εκτοπίζουν ίσο όγκο διαλύματος προκαλώντας παλμούς ανάλογους του μεγέθους ή του όγκου τους που ενισχύονται και μετρώνται. Η μέθοδος αυτή μετράει επίσης τον συνολικό αριθμό των κυττάρων κι όχι των ζωντανών.

## 3. Μέθοδοι μέτρησης αριθμού ζωντανών κυττάρων

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι που έχουν σχεδιασθεί για τον υπολογισμό του αριθμού των ζωντανών μικροοργανισμών. Μερικές απ' αυτές είναι:

### 3.1. Αερόβια μέτρηση σε τρυβλία (aerobic plate count)

Η μέθοδος αυτή (pour plate count) είναι η πιο συνηθισμένη τεχνική για την μέτρηση των ζωντανών μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Βασίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν σε ένα δείγμα αναμειγμένο με άγαρ και θρεπτικά υλικά (πεπτόνες (αλμπουμίνη, πεπτόνη, πολυπεπίδια, αμινοξέα), εκχύλισμα κρέατος (πεπτόνες + P, K), ζελατίνη, CHO, ανόργανα συστατικά), σχηματίζουν ξεχωριστές και ορατές αποικίες. Η μέθοδος όμως αυτή δεν μετρά απαραίτητα τον πραγματικό συνολικό αριθμό των ζωντανών κυττάρων ανά γραμμάριο δείγματος, αφού τα βακτηριακά κύτταρα υφίστανται μόνα τους ή σε ζευγάρια, αλυσίδες, συμπλέγματα και ομάδες. Έτσι, οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή δεν πρέπει να αναφέρονται ως μετρήσεις ζωντανών κυττάρων, αλλά ως μετρήσεις αποικιών ανά μονάδα ή μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά μονάδα (Colony Forming Units, cfu). Επίσης χρησιμοποιείται ο όρος TPC (Total Plate Count).

Η διαδικασία είναι σχετικά απλή. Κατάλληλες αραιώσεις του δείγματος, ώστε τελικά να έχουμε αριθμό CFU μεταξύ 30 και 300, απλώνονται σ' ένα αποστειρωμένο τρυβλίο Petri και προστίθεται αποστειρωμένο, τηγμένο, ψυχρό άγαρ. Αν πρόκειται να προσδιοριστούν ειδικοί τύποι μικροβίων, εκτός των θρεπτικών υλικών το άγαρ φέρει και ουσίες που επιτρέπουν επιλεκτικά την ανάπτυξη των προς μέτρηση μικροοργανισμών (εκλεκτικό υπόστρωμα). Το άγαρ πρέπει να αναμειχθεί πλήρως με το εμβόλιο για να κατανεμηθούν τα κύτταρα ομοιόμορφα. Ύστερα από την στερεοποίηση, τα τρυβλία αναποδογυρίζονται για να εμποδίσουν την συμπύκνωση της υγρασίας στην επιφάνεια του άγαρ και στη συνέχεια επωάζονται. Η θερμοκρασία και ο χρόνος της επώασης ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που ο ερευνητής θέλει να απαριθμήσει (ψυχρότροφα, μεσόφιλα ή θερμόφιλα).

Η διαδικασία αυτή (pour plate count) είναι απλή, μπορεί να καλύψει μία ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων και προς το παρόν είναι ίσως η πιο ακριβής μέθοδος για τον προσδιορισμό των βακτηρίων που αναπτύσσονται σε άγαρ. Επίσης, οι μικροοργανισμοί μπορούν να ανακτηθούν για παρατέρα μελέτη. Τα αποτελέσματα πρέπει να αντικατοπτρίζουν το επίπεδο των ζωντανών μικροβίων του τροφίμου τη χρονική στιγμή που πάρθηκε το δείγμα.

Υπάρχουν όμως και πολλές πλευρές της μεθόδου αυτής οι οποίες είναι ανεπιθύμητες. Αυτές που μας ενδιαφέρουν κυρίως είναι ο χρόνος, το κόστος, οι τεχνικές απαιτήσεις, οι πληροφορίες που αποκτούνται και η ακρίβεια. Έτσι, η περίοδος επώασης μπορεί να κυμαίνεται από δύο έως δέκα ημέρες, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να μπορούν να παράγουν μία ορατή αποικία πριν την απαρίθμηση. Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ακριβή. Αν και η τεχνική αυτή φαίνεται αρκετά απλή, στην πραγματικότητα χρειάζεται ένας πολύ καλά εκπαιδευμένος τεχνικός για να πραγματοποιήσει αυτό το τεστ. Η ακρίβεια επομένως της μεθόδου εξαρτάται από την ικανότητα του τεχνικού, όσο κι από τις παραδοχές και τα σφάλματα που περιλαμβάνονται στην συγκεκριμένη μέθοδο.

Μια παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου είναι η επιφανειακή ανάπτυξη σε τρυβλία (spread plate count). Στο σύστημα αυτό, το αποστειρωμένο, τηγμένο και ψυχρό άγαρ απλώνεται πρώτα σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Ύστερα από την στερεοποίηση, τα τρυβλία προεπωάζονται κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η επώαση ξηραίνει την επιφάνεια του άγαρ, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να μην συνενωθούν κατά το άπλωμά τους πάνω στο άγαρ. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την κλασική μέθοδο απαρίθμησης σε τρυβλία (pour plate count). Έτσι, δεν είναι απαραίτητη η χρήση ημιδιαφανούς μέσου, όπως στην κλασική μέθοδο για την διευκόλυνση της εύρεσης των αποικιών. Η μορφολογία των αποικιών μπορεί να παρατηρηθεί καλύτερα στις επιφανειακές αποικίες, βελτιώνοντας την ικανότητα του αναλυτή να διακρίνει ανάμεσα σε διαφορετικά είδη αποικιών. Οι μικροοργανισμοί δεν εκτίθενται στην θερμότητα του τηγμένου άγαρ που μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να οδηγήσει σε χαμηλότερες τιμές μετρήσεων. Απ' την άλλη μεριά, η μέθοδος αυτή υστερεί σε ακρίβεια για δείγματα που περιέχουν λίγους μικροοργανισμούς, αφού πρέπει να χρησιμοποιηθούν σχετικά μικροί όγκοι δείγματος.

### 3.2. Καλλιέργεια από μεμβράνη διήθησης (membrane filters)

Όταν γίνεται διήθηση ρευστών μέσα από μεμβράνη, όλα τα σωματίδια, βακτήρια ή κύτταρα, που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους κατακρατούνται στην επιφάνεια της μεμβράνης. Τα μικροβιακά κύτταρα που έχουν κατακρατηθεί μπορούν να εξεταστούν και να μετρηθούν μ' ένα μικροσκόπιο με τρόπο παρόμοιο της DMC. Οι μικροοργανισμοί που κατακρατήθηκαν μπορούν να καλλιεργηθούν αν η μεμβράνη μεταφερθεί ασηπτικά σ' ένα αποστειρωμένο τρυβλίο Petri, με υγρά θρεπτικά συστατικά διπλής αξίας που διαχέονται μέσα από την πορώδη μεμβράνη και εφοδιάζοντας τους ώστε να αναπτυχθούν. Ύστερα από επώαση έξι έως οχτώ ωρών οι αποικίες μπορούν να μετρηθούν με ένα μικροσκόπιο.

### 3.3. Διάλυση σε σωλήνες (tube dilution)

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει βασικά τον εμβολιασμό μιας σειράς σωλήνων, που περιέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό ζωμό, με μια σειρά διαλυμάτων του τροφίμου. Ύστερα από την επώαση των εμβολιασμένων σωλήνων, ο ζωμός παρατηρείται ως προς τη θολότητα η οποία υποδεικνύει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Αν δεν υπάρχει καθόλου θολότητα, τότε συμπεραίνεται ότι δεν υπήρχαν μικροοργανισμοί ή δεν μπόρεσαν να πολλαπλασιαστούν. Συνήθως συνδιάζεται με την επόμενη τεχνική.

### 3.4. Τεχνική του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων (Most Probable Number, MPN)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παραδοχή ότι τα διάφορα δείγματα του ίδιου βάρους ή όγκου που προέρχονται από την ίδια πηγή θα πρέπει να περιέχουν κατά μέσο όρο τον ίδιο αριθμό μικροβίων που είναι ο περισσότερο πιθανός αριθμός μικροβίων που αποτελούν τη μικροχλωρίδα της αρχικής πηγής (τρόφιμο ή πόσιμο νερό). Χρησιμοποιώντας αρκετούς σωλήνες για κάθε διάλυμα και καταγράφοντας τους σωλήνες που παρουσιάζουν ανάπτυξη των μικροβίων (θετικοί) κι αυτούς που δεν παρουσιάζουν (αρνητικοί), παίρνουμε έναν πιο ακριβή αριθμό των παρόντων μικροοργανισμών. Η σχέση ανάμεσα στους θετικούς και τους αρνητικούς σωλήνες έχει προσδιορισθεί μαθηματικά κι έτσι έχουν προκύψει οι πίνακες του πιο πιθανού αριθμού μικροβίων. Για τη χρήση της μεθόδου αυτής χρειάζονται τουλάχιστον τρία διαλύματα. Στην ιδανική περίπτωση, οι σωλήνες με την μικρότερη αραιώση πρέπει να είναι θετικοί, ενώ αυτοί με τη μεγαλύτερη αρνητικοί. Όσο περισσότεροι σωλήνες χρησιμοποιούνται σε κάθε διάλυμα, τόσο πιο ακριβής είναι ο υπολογισμός, αλλά για λόγους ευκολίας έχει καθιερωθεί η χρήση μιας σειράς τριών ή πέντε σωλήνων. Ύστερα από την επιλογή των τριών σειρών διαλυμάτων, πρέπει κανείς να συμβουλευτεί τον κατάλληλο MPN πίνακα, να βρει τον πιο πιθανό αριθμό μικροβίων που ικανοποιεί τον αριθμό των θετικών σωλήνων και να τον πολλαπλασιάσει με τον συντελεστή διάλυσης, ώστε να προκύψει ο πιο πιθανός αριθμός μικροβίων ανά γραμμάριο προϊόντος. Η μέθοδος MPN είναι λιγότερο ακριβής από τις μεθόδους μέτρησης σε τρυβλία, αλλά είναι πιο εύκολη και απλή από αυτές. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με λίγους μόνο μικροοργανισμούς και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μικροοργανισμών σε δείγματα μεγαλύτερα του ενός gr.

## 4. Μέθοδοι που βασίζονται στο μεταβολισμό των μικροοργανισμών

Ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών και η παραγωγή μεταβολικών προϊόντων στα τρόφιμα μπορεί να μετρηθεί και να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του βακτηριακού πληθυσμού ή της μικροβιακής ποιότητας των τροφίμων. Μερικές από τις μεθόδους που βασίζονται στο μεταβολισμό είναι:

-Οι χημικοί δείκτες αποσύνθεσης (Chemical Indicators of Decomposition)

Τα τρόφιμα συντίθενται από ποικίλλες χημικές ενώσεις, οι οποίες υπόκεινται σε διάφορες βιοχημικές μεταβολές, επιθυμητές ή όχι. Η αποσύνθεση των τροφίμων που οδηγεί σε αλλοίωση της ποιότητάς τους αποτελεί μια ανεπιθύμητη μεταβολή. Ένα πλήθος χημικών ουσιών έχουν μελετηθεί ως δείκτες της αλλοίωσης αυτής της ποιότητας των τροφίμων. Ο βαθμός της μεταβολικής δραστηριότητας μπορεί να σχετίζεται ή να μην σχετίζεται με τον αριθμό των παρόντων μικροοργανισμών.

-Τα φυσικά τεστ

Η μικροβιακή ανάπτυξη προκαλεί μεταβολές στα τρόφιμα, όπως στην περιεκτικότητα των οξέων ή στο pH. Καθώς το pH αλλάζει, μεταβάλλεται και η ικανότητα των πρωτεϊνών για την δέσμευση του νερού. Η διαφορά αυτή μπορεί να προσδιορισθεί με το ERV τεστ (Extract Release Volume).

-Η τριφωσφορική αδενοσίνη

Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού, τα κύτταρα σχηματίζουν φωσφορικούς δεσμούς υψηλής ενέργειας, η οποία αποθηκεύεται στο ATP. Το ATP στα βακτηριακά κύτταρα εξαφανίζεται όταν αυτά πεθαίνουν. Απ' τη στιγμή που όλα τα ζωντανά βακτηριακά κύτταρα περιέχουν ATP είναι δυνατός ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων με την ποσοτικοποίηση του ATP σ' ένα σύστημα.

#### 5. Άλλες μέθοδοι

Εκτός από τις μεθόδους που περιγράφηκαν, πολλά άλλα συστήματα χρησιμοποιήθηκαν από τους μικροβιολόγους για την ανάπτυξη ταχείων μεθόδων για τον προσδιορισμό των μικροβίων. Μερικές από αυτές είναι: η αέρια χρωματογραφία ή η αέρια-υγρή χρωματογραφία, η μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, που επηρεάζεται από την μεταβολή στην σύνθεση του υποστρώματος ανάπτυξης λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας, η μικροσκοπία φθορισμού, ο προσδιορισμός του βάρους ή της μάζας των κυττάρων, της οπτικής πυκνότητας ή της θολότητας, κ.ά.

#### Ταχείες μικροβιολογικές μέθοδοι

Τα τελευταία 20 χρόνια, η μεγαλύτερη προσπάθεια έχει συγκεντρωθεί στην εξέλιξη ταχείων μικροβιολογικών μεθόδων για τον έλεγχο των τελικών προϊόντων, των συστατικών, του εξοπλισμού και του περιβάλλοντος κατά την διαδικασία παραγωγής. Οι ταχείες μικροβιολογικές μέθοδοι βασίζονται σε ενόργανες και βιοτεχνολογικές μεθόδους.

Απ' τη μια μεριά, οι μέθοδοι αυτές διευκολύνουν σημαντικά ελέγχους ρουτίνας, ενώ απ' την άλλη απαιτούν σημαντικά αυξημένη ευαισθησία της μεθοδολογίας, η οποία συχνά συγκρούεται με την απαιτούμενη ταχύτητα.

Στην πραγματικότητα, ένας αναλυτής αναζητά τουλάχιστον πέντε στοιχεία στις μεθόδους που αποσκοπούν στην εκτίμηση της μικροβιολογικής ακεραιότητας δειγμάτων τελικών προϊόντων ή της συμμόρφωσης των δειγμάτων γραμμής με κάποια πρότυπα υγιεινής. Τα στοιχεία αυτά είναι: (1) ευκολία, (2) ταχύτητα, (3) αξιοπιστία, (4) πραγματικές εγγυήσεις για την αποφυγή λαθών και (5) μηχανοποίηση ή και αυτοματοποίηση.

Οι ταχείες μικροβιολογικές μέθοδοι έχουν όμως κι αυτές μειονεκτήματα. Απαιτούν ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε υψηλά επίπεδα προτού τα αποτελέσματα είναι φανερά. Η πλειοψηφία των σημαντικών μικροοργανισμών υφίστανται με την επεξεργασία του τροφίμου τραυματισμό, σαν αποτέλεσμα της έκθεσής τους σε αντίξοες εξωτερικές συνθήκες, άμεσα, όπως με την θέρμανση, ή έμμεσα, όπως με την ελάττωση του pH ή της ενεργότητας του τροφίμου. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένα χαμηλά αποτελέσματα κι επομένως στην αποτυχία να πάρουμε διορθωτικά μέτρα, όπου αυτά απαιτούνται. Ένα άλλο μειονέκτημα σχετίζεται με την ίδια την φύση των τροφίμων. Μέθοδοι που δουλεύουν αξιοσημείωτα καλά με απλές καλλιέργειες ή μικροοργανισμούς στόχους, απέτυχαν αρχικά όταν εφαρμόστηκαν σε πραγματικά δείγματα τροφίμων λόγω παρουσίας σε πολλά τρόφιμα

μολυσματικού απαγορευτικού υλικού. Τέτοιες παρεμβολές ξεπερνώνται με προηγούμενη συμπύκνωση και καθαρισμό των μικροοργανισμών στόχων, σε βάρος όμως της απλότητας και της ταχύτητας. Τέλος οι νέες ταχείες μέθοδοι μετρούν παραμέτρους διαφορετικές από τις κλασσικά αποδεκτές θέτοντας πρόβλημα της ερμηνείας των αποτελεσμάτων.

Ένας διαχωρισμός των ταχείων μεθόδων μπορεί να γίνει με βάση την ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στα διάφορα είδη μικροοργανισμών. Έτσι, διακρίνονται σε:

- α) Μεθόδους χαρακτηρισμού/αναγνώρισης και
- β) Μεθόδους απαρίθμησης

Παρακάτω αναπτύσσονται συνοπτικά ορισμένες από τις μεθόδους αυτές.

### Μέθοδοι χαρακτηρισμού/αναγνώρισης

- Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρουσία πολλαπλών αντιγράφων ορισμένων ακολουθιών νουκλεοτιδίων του χρωμοσώματος. Η αντίδραση PCR ενισχύει μια συγκεκριμένη ακολουθία-στόχο του χρωμοσώματος με μέγεθος μέχρι περίπου 4kb. Τα δύο άκρα της ακολουθίας, που πρόκειται να αντιγραφεί, ορίζονται από δύο μικρά τμήματα DNA, που καλούνται "primers", ένα για κάθε κλώνο. Επειδή όμως η ακολουθία αυτή δεν είναι μοναδική μέσα στο χρομόσωμα, η αντίδραση PCR ενισχύει όχι μόνο τη στενή ακολουθία-στόχο, αλλά και ευρύτερες περιοχές. Παράγονται έτσι τεμάχια διαφορετικού μεγέθους, που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση, δημιουργώντας ένα αποτύπωμα πάνω σε ταινία, χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου στελέχους.

- Ανιχνευτές DNA (DNA probes)

Οι ανιχνευτές DNA είναι μικρού μήκους επισημασμένα τμήματα DNA, τα οποία υβριδίζονται ή ζευγαρώνουν με συμπληρωματικές ακολουθίες DNA, που έχουν εξαχθεί από μικροβιακές καλλιέργειες των προς εξέταση δειγμάτων. Το ζευγάρι γίνεται όπως και στο δίκλωνο DNA (αδενίνη με θυμίνη και γουανίνη με κυτοσίνη). Αν η ακολουθία των βάσεων του DNA-ανιχνευτή συμπληρώνει μια ειδική ακολουθία του μικροοργανισμού-στόχου, τότε ο ανιχνευτής προσδένεται μόνο με το μικροοργανισμό αυτό.

- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη "σύλληψη" του αντιγόνου από ένα αντίσωμα, που βρίσκεται ακινητοποιημένο πάνω σε στερεή μήτρα. Μετά το πλύσιμο για την απομάκρυνση των μη προσδεδεμένων υλικών, προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα, που αναγνωρίζει ένα διαφορετικό τμήμα του συλληφθέντος αντιγόνου και αφήνεται να αντιδράσει με το σύμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου. Εάν το δεύτερο αντίσωμα είναι επισημασμένο με ένα ένζυμο, το υπόστρωμα του ενζύμου προστίθεται μετά το ξέπλυμα της περίσσειας του δεύτερου αντισώματος, που δεν έχει προσδεθεί, και ο αναλυτής παρατηρεί οπτικά το σχηματισμό χρώματος ή τον ποσοτικοποιεί φασματοφωτομετρικά.

### Μέθοδοι απαρίθμησης

- Αλλαγές στην αντίσταση (ή την αγωγιμότητα ή το ηλεκτρικό φορτίο)

Καθώς τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται σε μία καλλιέργεια, οι μεταβολικές τους δραστηριότητες προκαλούν αλλαγές στη χημική σύσταση του μέσου. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να παρακολουθούνται συνεχώς, χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια για τη μέτρηση της αντίστασης που παρουσιάζεται σε ένα εναλλασσόμενο ρεύμα που εφαρμόζεται στο μέσο. Ο χρόνος που απαιτείται για μια ανάλυση ποικίλλει ανάλογα με τον αρχικό αριθμό των μικροοργανισμών στο δείγμα. Όσο περισσότεροι μικροοργανισμοί παρευρίσκονται στο εξεταζόμενο δείγμα, τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος που χρειάζεται για να σημειωθούν ανιχνεύσιμες μεταβολές.

Απ' όλες τις τεχνικές για ταχεία και αυτόματη μικροβιολογία που περιγράφηκαν τη δεκαετία του 1970, αυτές που βασίζονται στις άμεσες ηλεκτρικές μετρήσεις των διαφόρων μέσων είναι οι πιο επιτυχημένες. Η προσέγγιση αυτή έχει αναπτυχθεί εμπορικά και τώρα υπάρχει μια ποικιλία οργάνων διαθέσιμων και σε χρήση σε εργαστήρια σε όλο τον κόσμο.

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την εμποροποίηση οργάνων για τη μέτρηση της αγωγιμότητας ή της αντίστασης και σήμερα υπάρχουν τέσσερις κατασκευαστές:

Τα Bactometer , BacTrac , Malthus , RABIT. Όλα είναι υψηλά αυτοματοποιημένα συστήματα ικανά να μετρήσουν πολλαπλά δείγματα και να παρουσιάσουν αυτόματα αναλυτικές αναφορές.

- ATP-Βιοφωτεινότητα (ATP-Bioluminescence)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί περιέχουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), η οποία αποτελεί την πηγή ενέργειας όλων των μεταβολικών δράσεων. Παρουσία ATP, το οργανικό συστατικό λουσιφερίνη οξειδώνεται σε οξυλουσιφερίνη, εκπέμποντας φωτόνια ως ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης. Το ένζυμο που συμμετέχει είναι η λουσιφεράση. Οι αντιδράσεις του παραπάνω ενζύμου είναι ταχείες, ολοκληρώνονται μέσα σε λίγα λεπτά και ποσοτικοποιώντας με ένα φωτόμετρο το ποσό των εκπεμπόμενων φωτονίων είναι δυνατόν να υπολογιστεί ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων στο δείγμα.

- Τεχνική του άμεσα επιφθορίζοντος φίλτρου (Direct Epifluorescent Filter Technique - DEFT)

Κατά τη μέθοδο αυτή, το προς εξέταση δείγμα υφίσταται μια προκατεργασία, ώστε να μπορεί να φιλτραρισθεί. Στη συνέχεια, το δείγμα φιλτράρεται πάνω σε πολυανθρακικές μεμβράνες, χρωματίζεται με τη φθορίζουσα χρωστική acridine orange, και εξετάζεται με μικροσκόπιο φθορισμού. Η ακριδίνη, όταν προσδένεται με DNA -κυρίαρχη αντίδραση στα νεκρά κύτταρα- εκπέμπει πράσινο φθορισμό, ενώ όταν προσδένεται με RNA, το οποίο αφθονεί στα ζωντανά κύτταρα, φθορίζει πορτοκαλί χρώμα. Ο αριθμός των ζωντανών μικροοργανισμών προσδιορίζεται από τον αριθμό των πορτοκαλοκίτρινων κυττάρων που μετρούνται πάνω στο φίλτρο.

### **3.4. ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ - ΦΙΛΟΣΟΦΙΑ - ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ**

Τα τρόφιμα, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν άριστα υποστρώματα για την ανάπτυξη των μικροβίων και πολλά απ' αυτά αποκτούν ένα μεγάλο εύρος μολυσματικών μικροοργανισμών, σαν αποτέλεσμα των διαδικασιών παραγωγής και μεταχείρισής τους. Συνήθως, μόνο ένα μέρος αυτών θα αναπτυχθούν και τελικά θα κυριαρχήσουν ως μικροοργανισμοί αλλοίωσης του τροφίμου.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, παθογόνων ή αλλοιογόνων, στα τρόφιμα ενδιαφέρει οποιονδήποτε σχετίζεται με την αλυσίδα παραγωγής, από τους αρχικούς παραγωγούς μέχρι τους υπεύθυνους βιομηχανικής παρασκευής, τους υπεύθυνους διανομής, τους πωλητές και τέλος τους καταναλωτές. Στα πλαίσια των προσπαθειών και μέτρων που είναι δυνατό και πρέπει να ληφθούν, για λόγους υγιεινής και ασφάλειας, με στόχο να περιορισθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, απαιτείται συστηματική γνώση της σχέσης μικρόβιο - υπόστρωμα - περιβάλλον. Είναι επίσης σημαντικό να είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε τον χρόνο ζωής που απομένει ή την μικροβιολογική ασφάλεια ενός συγκεκριμένου προϊόντος σ' ένα συγκεκριμένο στάδιο της αλυσίδας. Τα παραπάνω γίνονται ακόμα πιο σημαντικά για τρόφιμα που πρόκειται να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις ή να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η παραδοσιακή προσέγγιση για τον μικροβιολογικό έλεγχο των τροφίμων ήταν συγκεντρωμένη κυρίως στην εξέταση του τελικού προϊόντος (με εξαίρεση την αποστείρωση σε αυτόκλειστα για τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα και την παστερίωση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων). Τα διάφορα τρόφιμα παρασκευάζονταν και στη συνέχεια εξετάζονταν για το αν συμβαδίζουν με κάποια προκαθορισμένα μικροβιολογικά κριτήρια. Ο έλεγχος της μικροβιολογικής σταθερότητας γίνονταν πειραματικά με εμβολιασμό των τροφίμων με μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να προκαλέσουν πρόβλημα (challenge testing) και καταγραφή της ανάπτυξης ή της μείωσης των μικροοργανισμών αυτών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης με επαναλαμβανόμενη λήψη δειγμάτων.

Ακόμα κι αν ο μικροβιολογικός έλεγχος βασίζεται σ' ένα ασφαλές σχέδιο όσον αφορά τα δείγματα, οι παραδοσιακές μικροβιολογικές μέθοδοι είναι γενικά τόσο αργές και κοπιαστικές που δεν μπορούν να ανταποκριθούν στις σημερινές ανάγκες παραγωγής τροφίμων, που περιλαμβάνουν άμεση διανομή, έλεγχο της διαδικασίας σε πραγματικό χρόνο και υγειονομικό έλεγχο. Επίσης οι μέθοδοι αυτοί δεν επιτρέπουν την ποσοτική εκτίμηση σε συνθήκες διαφορετικές από αυτές που έχουν εξεταστεί, ιδιαίτερα όταν αλληλεπιδρούν δύο ή περισσότεροι παράγοντες.

### 3.5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ -ΝΕΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Τη δεκαετία του 1980 σημειώθηκε μια σημαντική αύξηση στον αριθμό τροφικών δηλητηριάσεων, η οποία οδήγησε σε μια αυξημένη απαίτηση για εξασφάλιση ασφαλών και υγιεινών τροφίμων από το κοινό. Την ίδια περίοδο πολλοί μικροβιολόγοι άρχισαν να δέχονται ότι οι παραδοσιακές μικροβιολογικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων περιορίζονται από τον χρόνο που απαιτείται για να δώσουν αποτελέσματα, ενώ οι έμμεσες μέθοδοι, που βασίζονται σε χημικές, φυσικές ή φυσικοχημικές αλλαγές, δεν δίνουν αποτελέσματα αν δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός κυττάρων. Στην περίπτωση των μικροοργανισμών αλλοίωσης, απαιτούνται  $10^7$  κύτταρα / g ή ml του προϊόντος, που σημαίνει ότι το τρόφιμο βρίσκεται ήδη στο αρχικό στάδιο αλλοίωσης και χρειάζεται μόνο μικρή εξάπλωση των μικροβίων για να γίνει ορατή η αλλοίωση. Παρομοίως, ακόμα και πολλές ταχείες μέθοδοι που έχουν προταθεί απαιτούν ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε υψηλά επίπεδα προτού τα αποτελέσματα είναι φανερά, ενώ άλλες μέθοδοι εξαρτώνται από τη χρήση πολύπλοκου και ακριβού εξοπλισμού. Η μέθοδος που θα επιλεγεί για να είναι πρακτικά χρήσιμη πρέπει να παρέχει γρήγορα αποτελέσματα, να είναι αναπαραγωγίσιμη, και ιδιαίτερα για τον υπολογισμό της διατηρησιμότητας, να δίνει ένα μέτρο του βαθμού της αλλοίωσης του τροφίμου κι όχι απλά να επιβεβαιώνει την έναρξη της αλλοίωσης, η οποία ούτως ή άλλως μπορεί να προσδιοριστεί οργανοληπτικά. Το τελευταίο κριτήριο δεν ακολουθείται από τις περισσότερες φυσικές και χημικές μεθόδους που έχουν προταθεί για τον υπολογισμό της διατηρησιμότητας, που σημαίνει ότι είναι περισσότερο διαγνωστικές, παρά προρρητικές.

Σήμερα, περισσότερο από ποτέ, ο αποτελεσματικός έλεγχος των μικροβιολογικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια της παραγωγής τροφίμων είναι απαραίτητος για την παρασκευή και διανομή ασφαλών και υγιεινών προϊόντων, τα οποία έχουν την επιθυμητή διατηρησιμότητα. Η επιστήμη και η μικροβιολογία τροφίμων αντιμετωπίζει την πρόκληση της νέας γενιάς προϊόντων που προτιμώνται από τους καταναλωτές, των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι η ευκολία χρήσης και μεγαλύτερη διατηρησιμότητα, σε συνδυασμό με την επίτευξη μεγαλύτερης “φρεσκάδας”. Γενικά, τα προϊόντα αυτά είναι ελάχιστα επεξεργασμένα (minimally processed), περιέχουν ελάχιστα ή καθόλου συντηρητικά και χρησιμοποιούν τεχνικές όπως η συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα αερίων προκειμένου να επεκταθεί η διατηρησιμότητά τους. Παράλληλα οι κατασκευαστές τροφίμων δεν ενδιαφέρονται μόνο για την παραγωγή προϊόντων απαλλαγμένων από παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά που ανθίστανται στην μικροβιολογική αλλοίωση. Μόνο στις ΗΠΑ η οικονομική απώλεια λόγω της μικροβιολογικής αλλοίωσης έχει εκτιμηθεί γύρω στα \$30 δισεκατομύρια το χρόνο.

Οι φαινομενικά αντικρουόμενοι στόχοι ελάχιστης επεξεργασίας και μέγιστης διατηρησιμότητας απαιτούν βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων παραγωγής και συντήρησης σε συνδυασμό με πρωτότυπες τεχνικές, για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια και η ελάχιστη υποβάθμιση μέχρι το χρόνο ανάλωσης του τροφίμου. Τρεις νέες προσεγγίσεις, που στοχεύουν στη συστηματοποίηση και βέλτιστη αξιοποίηση της έρευνας και της αποκτούμενης γνώσης της μικροβιολογίας τροφίμων, ώστε να διασφαλίζεται η υγιεινή και η ποιότητα των τροφίμων από το σχεδιασμό ως την κατανάλωση είναι η τεχνολογία εμποδίων, το σύστημα διασφάλισης ασφάλειας και υγιεινής HACCP και η προρρητική μικροβιολογία (predictive microbiology).

### **Τεχνολογία εμποδίων (Hurdle Technology)**

Οι Leistner (1977) και οι Rodel and Leistner (1982) εισήγαγαν την ιδέα των εμποδίων (hurdles), για την περιγραφή των επιδράσεων διαφόρων εσωτερικών παραγόντων σύνθεσης του τροφίμου (food composition factors) και εξωτερικών περιβαλλοντικών συνθηκών (environmental conditions) στην μικροβιακή ανάπτυξη και επιβίωση, που συνοψίζονται στον Πίνακα 3.6.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6.

<b>ΦΥΣΙΚΑ ΕΜΠΟΔΙΑ</b>	<b>ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΕΜΠΟΔΙΑ</b>
<b>1.</b> Θερμική επεξεργασία (π.χ. αποστείρωση, παστερίωση, λεύκανση)	<b>1.</b> $a_w$
	<b>2.</b> pH
<b>2.</b> Θερμοκρασία συντήρησης	<b>3.</b> Eh
<b>3.</b> Ακτινοβόληση	<b>4.</b> NaCl
<b>4.</b> Ηλεκτρομαγνητική ενέργεια	<b>5.</b> NaNO <sub>2</sub>
<b>5.</b> Υπερυψηλή πίεση	<b>6.</b> CO <sub>2</sub>
<b>6.</b> Ultrasonication	<b>7.</b> Οργανικά οξέα
<b>7.</b> Συσκευασία	<b>8.</b> Συντηρητικά
<b>8.</b> MAP	<b>9.</b> Κάπνισμα
<b>9.</b> Ασηπτική συσκευασία	<b>10.</b> Μπαχαρικά
<b>10.</b> Μικροϋφή	<b>11.</b> Ανταγωνιστική μικροχλωρίδα
	<b>12.</b> Βακτηριοσίνες

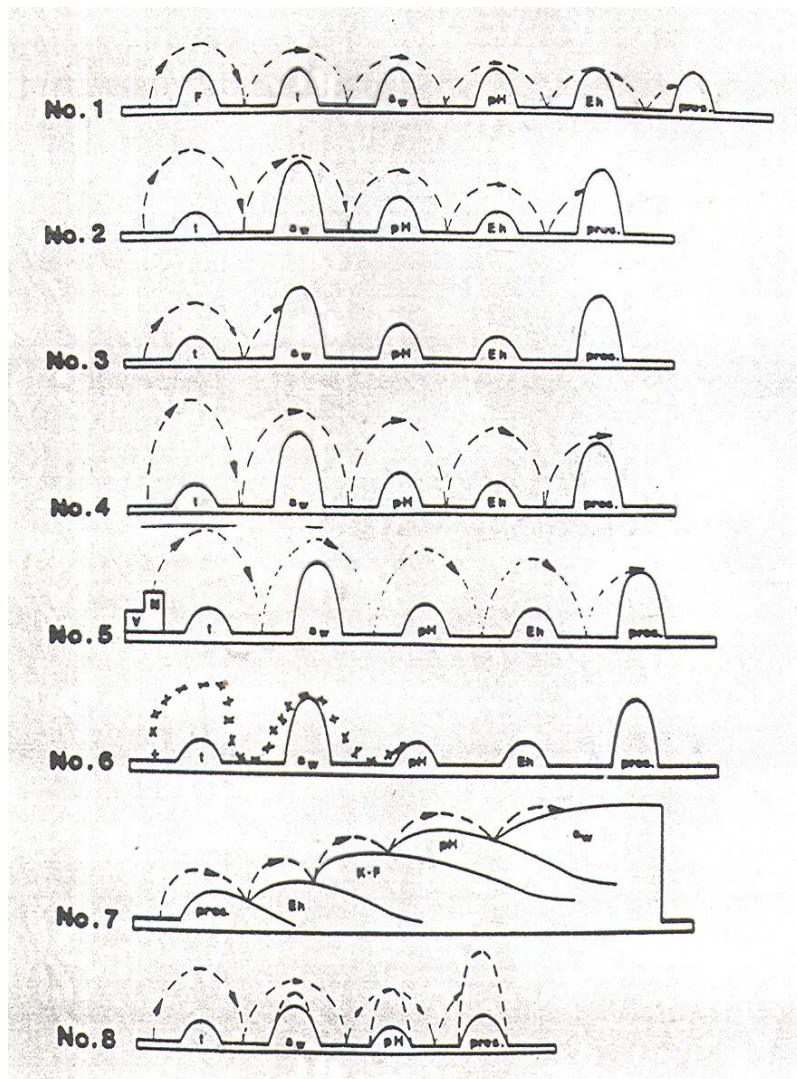
Η προσέγγιση αυτή έχει σαν σκοπό την επίτευξη της συντήρησης των τροφίμων με την συνεργιστική επίδραση διαφόρων παραμέτρων συντήρησης (εμποδίων), που



διαταράσσουν την ομοιοστασία (κατάσταση σταθερότητας και εσωτερικής ισορροπίας) των μικροοργανισμών, έτσι ώστε να μην αναπτύσσονται ή να εξαλείφονται.

Ποσοτικά πάντως δεδομένα για το ζητούμενο επίπεδο οποιουδήποτε εμποδίου και της συνεργιστικής του επίδρασης με άλλα εμπόδια είναι περιορισμένη.

Στο παρακάτω Σχήμα 3.3 απεικονίζεται η δράση διαφόρων εμποδίων όπως π.χ. θέρμανση, ψύξη,  $a_w$ , pH, Eh (οξειδοαναγωγικό δυναμικό), συντηρητικά, βιταμίνες, θρεπτικά συστατικά και ανταγωνιστική μικροχλωρίδα σε οχτώ διαφορετικά παραδείγματα.



Σχήμα 3.3. Απεικόνιση της δράσης των εμποδίων σε οχτώ παραδείγματα.

## HACCP

Το ακρωνύμιο HACCP αποτελεί συντομογραφία του Hazard Analysis Critical Control Points, ενός συστήματος διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων που βασίζεται στην Ανάλυση Κινδύνων και τον προσδιορισμό των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου. Το σύστημα HACCP αναπτύχθηκε από την αμερικανική εταιρία τροφίμων Pillsbury σε συνεργασία με την NASA με στόχο τη μέγιστη δυνατή διασφάλιση της μικροβιολογικής ασφάλειας των τροφίμων των πρώτων επανδρωμένων διαστημικών πτήσεις. Βασίστηκε στις αρχές του συστήματος FMEA (Failure, Mode and Effect Analysis) που μελετά σε κάθε στάδιο μιας διεργασίας τι μπορεί να πάει στραβά, τις πιθανές αιτίες και το αναμενόμενο αποτέλεσμα, με σκοπό να εγκαταστήσει αποτελεσματικούς μηχανισμούς ελέγχου. Το HACCP χρησιμοποιεί την ίδια προσέγγιση αλλά με έμφαση στην ασφάλεια του προϊόντος. Πρωτοπαρουσιάστηκε επίσημα το 1971 στο Εθνικό Συνέδριο για την Ασφάλεια Τροφίμων των ΗΠΑ και από τότε οι αρχές και η αναγκαιότητα του συστήματος συνειδητοποιήθηκαν σταδιακά από τη βιομηχανία τροφίμων.

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, περίοδο που συμπίπτει με την επικράτηση της φιλοσοφίας των συστημάτων ποιότητας που δίνουν έμφαση στην πρόληψη έναντι του ελέγχου του τελικού προϊόντος, η αναγνώριση του συστήματος HACCP, ως την πλέον αποτελεσματική προσέγγιση για τη διασφάλιση της ασφάλειας, αποκτά νέα δυναμική. Σήμερα το HACCP αποτελεί για την ασφάλεια των τροφίμων το διεθνές σύστημα αναφοράς. Με βάση την εμπειρία της εφαρμογής, όσον αφορά την μεθοδολογία εγκατάστασης του συστήματος και την αποτελεσματικότητά του, οι αρχές του HACCP κωδικοποιήθηκαν και αναπτύσσονται λεπτομερώς σε δύο δημοσιεύσεις που αποτελούν διεθνώς το σημείο αναφοράς. Η πρώτη από την Εθνική Επιτροπή για τα Μικροβιολογικά Κριτήρια στα Τρόφιμα των ΗΠΑ (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods - NACMCF, 1992) και η δεύτερη από την Επιτροπή για την Υγιεινή Τροφίμων του Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Committee on Food Hygiene, 1993).

Το σύστημα HACCP, όπως περιγράφεται στις παραπάνω πηγές, βασίζεται σε επτά Αρχές, που συνοψίζουν τον τρόπο εγκατάστασης, εφαρμογής και συντήρησής του στην υπό μελέτη μονάδα (πίνακας 1.7).

Το σύστημα HACCP είναι συμβατό με τη σύγχρονη φιλοσοφία πρόληψης και διασφάλισης της ποιότητας μέσω κατάλληλων διαδικασιών και όχι με έλεγχο του τελικού προϊόντος. Αναφέρεται όχι μόνο στους μικροβιολογικούς, αλλά και στους φυσικούς και χημικούς κινδύνους, που πιθανόν να υπεισέλθουν στη διαδικασία παραγωγής του τροφίμου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.7 : Αρχές Συστήματος HACCP

Αρχή HACCP 1	Διεξαγωγή ανάλυσης κινδύνων. Περιγραφή προληπτικών μέτρων ελέγχου.
Αρχή HACCP 2	Αναγνώριση Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (CCP) στη διεργασία.
Αρχή HACCP 3	Καθορισμός Κρίσιμων Ορίων για τα προληπτικά μέτρα που συνδέονται με κάθε αναγνωρισμένο CCP.
Αρχή HACCP 4	Καθορισμός απαιτήσεων παρακολούθησης και καταγραφής των CCP. Καθορισμός διαδικασιών για τη ρύθμιση και διατήρηση εντός ελέγχου της διεργασίας.
Αρχή HACCP 5	Καθορισμός διορθωτικών ενεργειών που ακολουθούνται όταν υπάρχει ένδειξη απόκλισης απο ένα κρίσιμο όριο.
Αρχή HACCP 6	Καθορισμός διαδικασιών αποτελεσματικής καταγραφής που αποδεικνύουν έγγραφα την εφαρμογή του συστήματος HACCP.
Αρχή HACCP 7	Καθορισμός διαδικασιών για την επαλήθευση ορθής λειτουργίας του συστήματος HACCP.

Η προσέγγιση της ασφάλειας και υγιεινής με τη φιλοσοφία HACCP επιβάλλει μια ουσιαστική επαναξιολόγηση κάθε διεργασίας της βιομηχανίας τροφίμων. Το σύστημα απαιτεί ενδελεχή εξέταση των κινδύνων σε όλα τα στάδια και αναγνώριση των σημείων που είναι κρίσιμα για τον έλεγχο. Η συστηματοποίηση της διαδικασίας αυτής γίνεται με τη χρήση λεπτομερών οδηγιών βασισμένων στις Αρχές HACCP. Ο τρόπος ανάπτυξης του συστήματος HACCP έχει διεθνώς παγιωθεί βάσει των ταυτόσημων οδηγιών του NACMCF (1992) και του Codex Committee on Food Hygiene (1993) βασισμένες στις 7 Αρχές HACCP (Πίνακας 1.7). Επαρκής βιβλιογραφία και εγχειρίδια αναλύουν τις οδηγίες αυτές και δίδουν πρακτικές εφαρμογές (Mortimore and Wallace, 1994 - Τζιά και Τσιαπούρης, 1996).

Της διεξαγωγής της Ανάλυσης Κινδύνων της Αρχής 1 προηγείται η συγκρότηση Ομάδας HACCP, η περιγραφή του τροφίμου και της διανομής του, η αναγνώριση χρήσης και καταναλωτών και η σύνταξη και επαλήθευση του διαγράμματος ροής της διεργασίας. Κατά την ανάλυση κινδύνων, και για ένα συγκριτικό καθορισμό της επικινδυνότητας (risk), του κάθε συστατικού, σταδίου διεργασίας ή προϊόντος, είχε προταθεί από την NACMCF ένα σύστημα κατηγοριοποίησης (assignment of risk categories) από VI ως 0, βάσει των χαρακτηριστικών των κινδύνων (hazard characteristics) Α ως F (NACMCF 1992, Appendix B). Η προσέγγιση αυτή δεν χρησιμοποιείται πλέον από την NACMCF έχοντας υποκατασταθεί από μια διαδικασία εξαντλητικού ερωτηματολογίου (NACMCF 1992,

Appendix A). Η αναγνώριση των Κρισίμων Σημείων Ελέγχου (CCP) που ακολουθεί είναι καθοριστική για την αποτελεσματικότητα του συστήματος. Είναι απόλυτα σημαντικό να αναγνωριστούν όλα τα CCP χωρίς να παραληφθεί κανένα αλλά και χωρίς να επιβαρυνθεί το σύστημα με επι πλέον Σημεία. Το δένδρο απόφασης των Κρισίμων Σημείων Ελέγχου (Σχήμα 1.5) δίνει τον αλγόριθμο για μια συστηματική αναγνώριση. Με τη ολοκλήρωση της διαδικασίας ανάπτυξης του συστήματος HACCP βάσει και των υπολοίπων Αρχών συμπληρώνεται το Έντυπο Ελέγχου HACCP (HACCP Control Chart) που μαζί με τα σχετικά διαγράμματα ροής δίνει συνοπτικά αλλά περιεκτικά την καταγραφή του συστήματος.

#### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ HACCP**

Codex Committee on Food Hygiene (1993). Guidelines for the Application of the HACCP System in Training Considerations for the Application of the HACCP System to Food Processing and Manufacturing, World Health Organization. WHO/FNU/FOS/93.3II.

Mortimore, S. and Wallace, C. (1994) HACCP, A practical approach, Chapman & Hall, London.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria of Foods (1992) Hazard Analysis and Critical Control Points System (adopted March 20, 1992), *International Journal of Food Microbiology*, 16, 1-23.

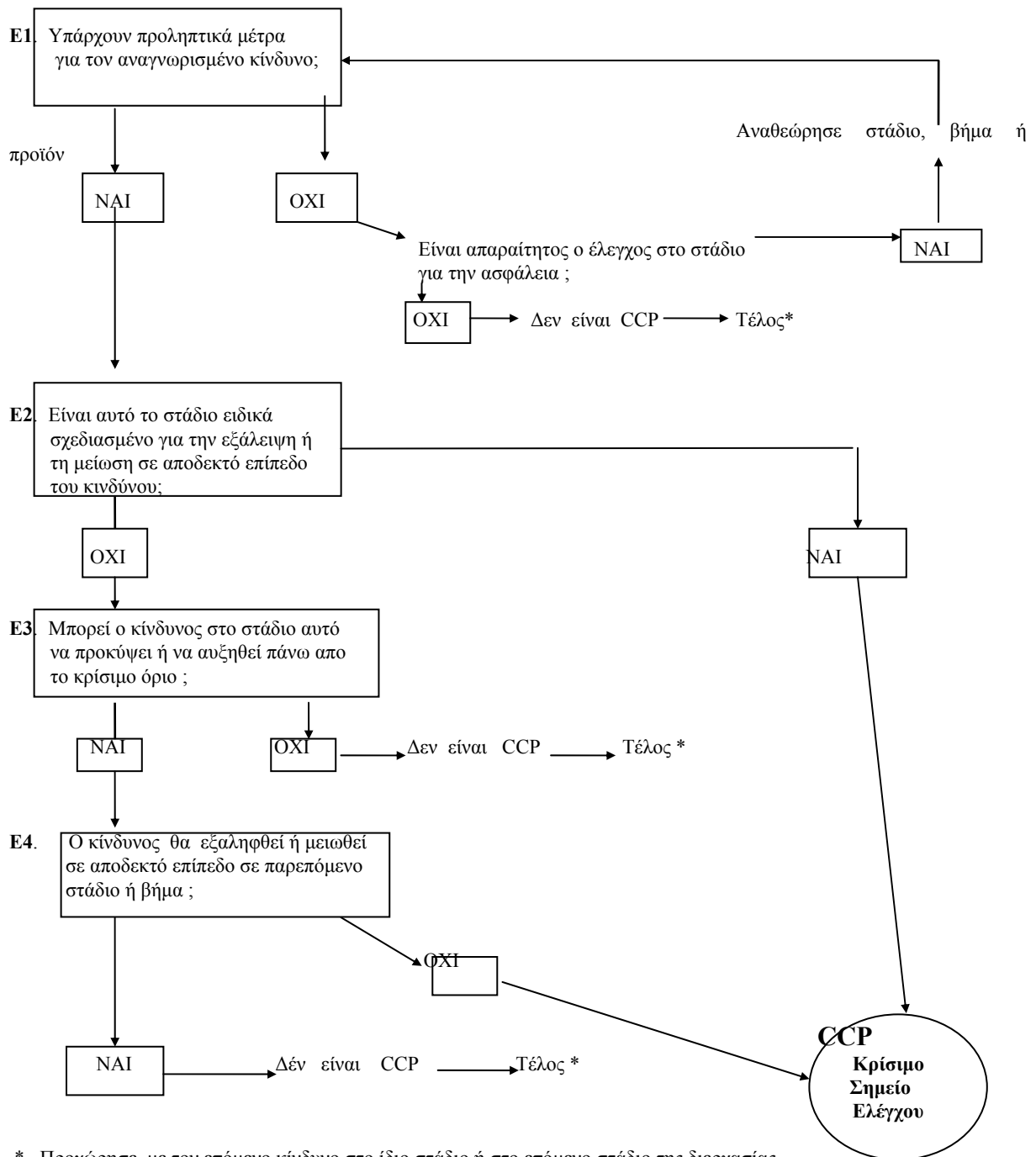
Τζιά, Κ. και Τσιαπούρης, Α. (1996) Ανάλυση Επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) στη βιομηχανία τροφίμων, Εκδ. Παπασωτηρίου, Αθήνα.

### **Προρρητική Μικροβιολογία**

Μια εναλλακτική μέθοδος στην αναπτυσσόμενη τεχνολογία, που παρέχει τη δυνατότητα για γρήγορες μικροβιολογικές εκτιμήσεις, χωρίς την απαίτηση για χρονοβόρες και δαπανηρές αναλύσεις, είναι η προρρητική μικροβιολογία. Πρόκειται για έναν αναπτυσσόμενο τομέα έρευνας που συνδυάζει στοιχεία μικροβιολογίας, μαθηματικών και στατιστικής.

Η προρρητική μικροβιολογία βασίζεται στην ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων, τα οποία μπορούν να προβλέψουν το ρυθμό ανάπτυξης ή μείωσης των μικροοργανισμών κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση πολλαπλών ανεξάρτητων μεταβλητών και των αλληλεπιδράσεων τους. Δεν περιορίζεται δηλαδή στη μελέτη συγκεκριμένων συστημάτων αλλά επιχειρεί να μαθηματικοποιήσει την επίδραση των καθοριστικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα νερού, η συγκέντρωση αλάτων, οργανικών οξέων, η μερική πίεση οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακος και άλλων αερίων, η παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων και άλλων εμποδίων, έτσι ώστε να επιτρέπεται η συναγωγή συμπερασμάτων για διαφορετικά συστήματα και διεργασίες. Αναμφισβήτητα, ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων επηρεάζει τους μικροοργανισμούς. Στα περισσότερα όμως τρόφιμα λίγοι μόνο από αυτούς τους παράγοντες ασκούν τη μεγαλύτερη επίδραση στην ανάπτυξη ή την μείωση των μικροοργανισμών.

ΣΧΗΜΑ 1.5 . Δένδρο απόφασης Κρισίμων Σημείων Ελέγχου

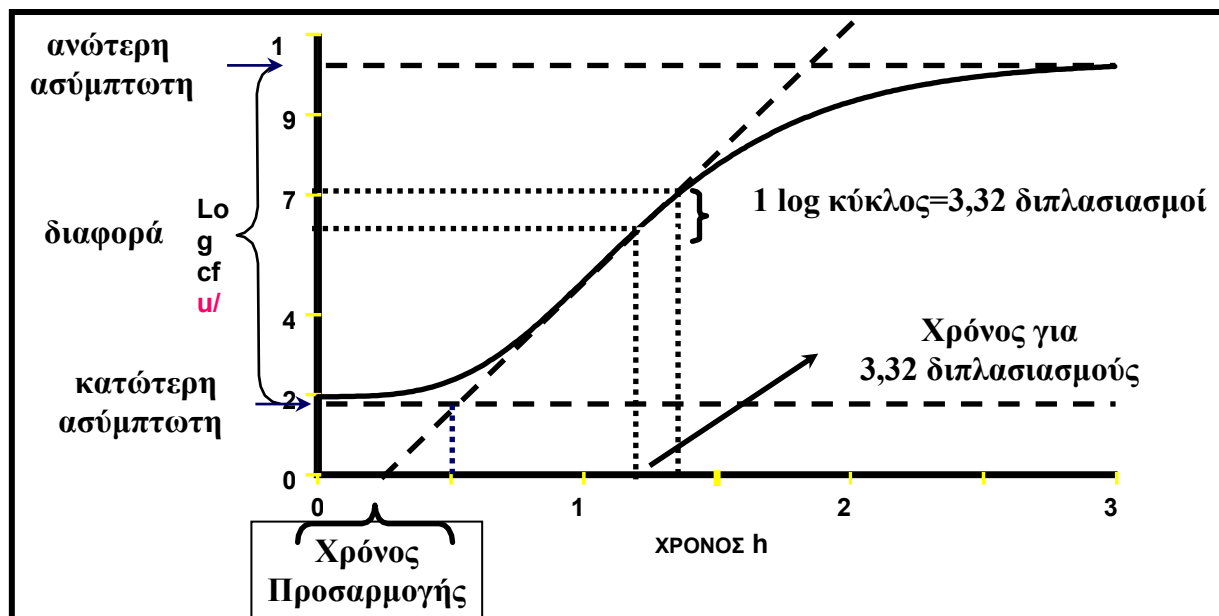


Η προρρητική μικροβιολογία είναι στην ουσία μια κινητική προσέγγιση στα πλαίσια της γενικών αρχών της κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων που αναπτύσσεται στο επόμενο κεφάλαιο. Στη συνέχεια αναφέρεται συνοπτικά το θέμα της κινητικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

## 1.6. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

### Γενική καμπύλη ανάπτυξης - Φάσεις ανάπτυξης μικροβιακού πληθυσμού

Σ' ένα περιβάλλον, στο οποίο τα θρεπτικά συστατικά δεν αποτελούν περιοριστικό παράγοντα, ένα βακτήριο ή ένας μικροβιακός πληθυσμός θα αναπαραχθεί και θα αυξηθεί στον αριθμό. Γενικά, για οποιοδήποτε ομοιογενή μικροβιακό πληθυσμό κάτω από συνθήκες σταθερής κατάστασης, η ανάπτυξη σ' ένα θρεπτικό μέσο ή σ' ένα πραγματικό σύστημα τροφίμου μπορεί να τυποποιηθεί από την καμπύλη του Σχήματος 3.5, η οποία προκύπτει αν κανείς σχεδιάσει το λογάριθμο της πυκνότητας των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου.



Σχήμα 3.5. Τυπική καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης

Όπως φαίνεται, υπάρχει ένας αρχικός αργός ρυθμός αύξησης του λογαρίθμου της πυκνότητας των κυττάρων, που αυξάνεται σ' έναν σχεδόν σταθερό ρυθμό ανάπτυξης, μειώνεται ξανά στο μηδέν και τελικά ο ρυθμός γίνεται αρνητικός. Αυτές οι τέσσερις φάσεις της καμπύλης αναφέρονται αντίστοιχα ως: λανθάνουσα φάση, εκθετική φάση, φάση στασιμότητας και φάση κάμψης ή θανάτου. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι η λανθάνουσα φάση είναι μια χρονική περίοδος, στην οποία τα κύτταρα προσαρμόζουν τη φυσιολογία και βιοχημεία τους στο καινούριο περιβάλλον που βρίσκονται, ενώ κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης τα κύτταρα αναπτύσσονται όσο πιο γρήγορα είναι δυνατό σ' αυτό το περιβάλλον. Κατά την φάση αυτή τα κύτταρα επιδεικνύουν εξισορροπημένη ανάπτυξη, κατά την οποία ο ρυθμός σύνθεσης κάθε συστατικού του κυττάρου (ένζυμα, δομικά μόρια, DNA, κ.ά.) είναι τέτοιος ώστε να μην γίνεται μεγαλύτερη σύνθεση απ' αυτή που απαιτείται για την παραγωγή νέων κυττάρων, δηλαδή ολόκληρη η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων κατευθύνεται στην αναπαραγωγή. Στην εκθετική φάση όλα τα συστατικά των κυττάρων βρίσκονται σε σταθερές αναλογίες και τα κύτταρα θεωρούνται, για πρακτικούς σκοπούς, φυσιολογικά ταυτόσημα (πανομοιότυπα). Καθώς ο πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται, η συσσώρευση των μεταβολιτών μέσα στο περιβάλλον γίνεται αρκετά απαγορευτική (παρεμποδιστική), ώστε να προκαλεί μείωση στο ρυθμό αύξησης του αριθμού των κυττάρων. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης, οι συνθήκες μπορεί να γίνουν τόσο απαγορευτικές ώστε να οδηγήσουν στο θάνατο και την λύση των κυττάρων, οπότε ο καθαρός ρυθμός αύξησης του πληθυσμού μειώνεται συνεχώς μέχρι την τιμή μηδέν (φάση στασιμότητας). Η διάρκεια αυτής της φάσης

ποικίλλει, αλλά τελικά καθώς όλο και περισσότερες τοξίνες συσσωρεύονται, ο ρυθμός θανάτου των κυττάρων γίνεται μεγαλύτερος από την ικανότητα του περιβάλλοντος να υποστηρίξει την κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα την μείωση του μεγέθους της βακτηριακής πυκνότητας και την είσοδο των μικροβίων σε μια νέα φάση, που αναγνωρίζεται ως φάση θανάτου της καλλιέργειας. Η σύνθεση του τροφίμου, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η ηλικία και η κατάσταση των μικροβίων, μπορεί να επηρεάσουν τη μορφή της καμπύλης ανάπτυξης.

Υπάρχουν πολλές περιγραφικές μέθοδοι που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία για την περιγραφή μιας καμπύλης μικροβιακής ανάπτυξης, όπου οι κύριες υποθέσεις είναι ότι ο πληθυσμός είναι ομοιογενής και ο ρυθμός ανάπτυξης ή ο χρόνος διπλασιασμού είναι ανεξάρτητοι της ηλικίας. Για ένα βακτήριο, τα τρόφιμα αποτελούν ένα νέο περιβάλλον το οποίο μπορεί να εκμεταλλευτεί. Το βακτήριο θα αναπτυχθεί και θα αναπαραχθεί στο περιβάλλον αυτό όπως και σε ένα εργαστηριακό υπόστρωμα. Για το λόγο αυτό οι μικροβιολόγοι τροφίμων ενδιαφέρονται για την κινητική της ανάπτυξης των βακτηρίων, ιδιαίτερα για την λανθάνουσα και εκθετική φάση. Αν οι μικροοργανισμοί σ' ένα τρόφιμο αναγκαστούν να παραμείνουν στη λανθάνουσα φάση, τότε ο χρόνος ζωής (διατηρησιμότητα) του τροφίμου θα επιμηκυνθεί. Αν τελικά φτάσουν στην εκθετική φάση, τότε ο ρυθμός ανάπτυξης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης θα καθορίσουν τη διατηρησιμότητα του προϊόντος. Έτσι λοιπόν, για τους σκοπούς της προρρητικής μικροβιολογίας είναι χρήσιμο να μπορούμε να μοντελοποιήσουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού, ιδιαίτερα τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης και την κλίση της εκθετικής φάσης, που αντιπροσωπεύει το ρυθμό ανάπτυξης του οργανισμού. Ο προσδιορισμός των δύο αυτών κινητικών παραμέτρων και η μοντελοποίηση των ποσοτικών επιδράσεων διαφόρων εμποδίων σε αυτές αποτελούν κρίσιμα σημεία για την μικροβιακή πρόρρηση της διατηρησιμότητας και την ανάλυση επικινδυνότητας. Η φάση στασιμότητας είναι λιγότερου άμεσου ενδιαφέροντος γιατί τα περισσότερα τρόφιμα θα έχουν ήδη αλλοιωθεί και θα είναι μη αποδεκτά πριν το μικροβιακό φορτίο φτάσει στη φάση στασιμότητας.

Με τον παραδοσιακό τρόπο, ο χρόνος λανθάνουσας φάσης και ο εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης προσδιορίζονται από την εφαπτομένη της καμπύλης στο σημείο της εκθετικής φάσης με την μεγαλύτερη κλίση. Ο χρόνος που απαιτείται για τον διπλασιασμό του πληθυσμού (generation time) μπορεί να προσδιορισθεί από την κλίση αυτής της γραμμής.

Όταν ο δεκαδικός λογάριθμος απεικονίζεται γραφικά συναρτήσει του χρόνου, τότε η σχέση ανάμεσα στην κλίση ( $k$ ) και στο χρόνο διπλασιασμού ( $GT$ ) είναι:  $k = \frac{\log_{10} 2}{GT}$ . Η κλίση αντιπροσωπεύει τον εκθετικό ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης. Για τον υπολογισμό της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης, η εφαπτομένη προεκτείνεται μέχρι την πυκνότητα των μικροοργανισμών σε χρόνο μηδέν και ο χρόνος στο σημείο αυτό θεωρείται ως το τέλος της λανθάνουσας φάσης.

### **Μοντέλα ανάπτυξης μικροοργανισμών**

Έχει προταθεί ένας αριθμός μαθηματικών συναρτήσεων, οι οποίες περιγράφουν σιγμοειδείς καμπύλες και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μοντέλων ανάπτυξης των μικροβίων. Το πλεονέκτημα τέτοιων συναρτήσεων είναι ότι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να προσδιοριστεί μαθηματικά η γραμμή καλύτερης προσαρμογής (line of best fit), η γραμμή δηλαδή εκείνη που περνά απ' όλα τα σημεία των δεδομένων, όσο αυτό είναι δυνατό, μ' έναν αντικειμενικό και αναπαραγωγίσιμο τρόπο. Την εξίσωση προσαρμογής μπορούμε να την επεξεργαστούμε

παραπέρα ώστε να υπολογίσει όσο το δυνατό καλύτερα το χρόνο λανθάνουσας φάσης και το χρόνο διπλασιασμού χρησιμοποιώντας όλα τα δεδομένα. Ένα μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης δεν μπορούν να εφαρμοστούν χωρίς την βοήθεια υπολογιστών και κατάλληλου λογισμικού. Μερικές από αυτές τις συναρτήσεις είναι οι παρακάτω:

**Μοντέλο Monod:** Ο ρυθμός με τον οποίο αυξάνεται ο μικροβιακός πληθυσμός είναι ανάλογος με τον αριθμό των μελών του πληθυσμού, δηλαδή ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ή ο χρόνος διπλασιασμού θεωρείται σταθερός για σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτό είναι αποτελεσματικό μέσα σ' ένα μικρό χρονικό διάστημα, πριν δηλαδή αρχίσει να μειώνεται σημαντικά το διαθέσιμο υπόστρωμα ή να μεταβάλλεται το περιβάλλον (π.χ μείωση pH). Η ολοκληρωμένη μορφή του μοντέλου Monod είναι:

$$N = N_0 \exp[k(t - t_L)] \quad (1)$$

όπου N:ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t, N<sub>0</sub>:το αρχικό φορτίο, k:ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και t<sub>L</sub>:ο χρόνος λανθάνουσας φάσης

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι η κλίση του διαγράμματος του lnN συναρτήσει του t, για t>t<sub>L</sub>. Ο χρόνος λανθάνουσας φάσης μπορεί να προσδιορισθεί γραφικά και αντιστοιχεί στο σημείο τομής της ευθείας N<sub>0</sub> με την ευθεία γραμμικής παλινδρόμησης της εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

Το μοντέλο αυτό είναι απλό και συνήθως επαρκές και έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά, ακόμα και για μεικτούς πληθυσμούς.

Η λογιστική συνάρτηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη οποιουδήποτε πληθυσμού σ' ένα απεριόριστο περιβάλλον, με την παραδοχή ότι ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης, δηλαδή η μεταβολή του αριθμού μικροβίων με το χρόνο, είναι ανάλογος με την πυκνότητα τους σε οποιοδήποτε χρόνο. Αυτό συμπίπτει με την εξίσωση για την εκθετική ανάπτυξη. Πρακτικά όμως τις περισσότερες φορές το περιβάλλον δεν είναι απεριόριστο και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης δεν είναι σταθερός, αλλά μειώνεται συναρτήσει της πυκνότητας του πληθυσμού, εξαιτίας της μείωσης των θρεπτικών συστατικών ή της συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών. Έτσι ο παρατηρούμενος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, k', είναι συνάρτηση του N, δηλαδή k'=f(N). Οι παραδοχές πάνω στις οποίες βασίζεται το μοντέλο υπαγορεύουν ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης γίνεται μέγιστος (k), για N=0, δηλ. k'=k. Στη φάση στασιμότητας, το k' μειώνεται στο 0. Η λογιστική εξίσωση έτσι μπορεί να γραφεί:

$$N_{(t)} = \frac{C}{1 + \exp\{-B(t - M)\}} \quad (2)$$

όπου: t: χρόνος, N(t): πυκνότητα πληθυσμού σε χρόνο t, C: η τιμή της ανώτερης ασύμπτωτης, δηλ. η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού που δίνεται από το N(∞), M: ο χρόνος στον οποίο ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης είναι μέγιστος, B/2: ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο t=M και όπου N(0)<<C, B:ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο t=0.

Η λογιστική συνάρτηση είναι συμμετρική ως προς το σημείο (M,C/2). Όπως παρατηρούμε η εξίσωση αυτή δεν έχει κανένα σαφή όρο που να αναφέρεται στο αρχικό εμβόλιο N<sub>(0)</sub>. Αυτό συμβαίνει γιατί το μοντέλο αυτό προβλέπει ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι συνάρτηση του μεγέθους του πληθυσμού, κι έτσι για κάθε τιμή της πυκνότητας του εμβολίου ο ρυθμός ανάπτυξης θα είναι ο ίδιος όπως θα ήταν κι αν ο πληθυσμός είχε φτάσει σ' αυτό το μέγεθος απ' οποιαδήποτε άλλη αρχική πυκνότητα εμβολίου.



Συνάρτηση του Gompertz: Ενώ τα μοντέλα λογιστικού τύπου βασίζονται στη γραμμική μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης συναρτήσει της πυκνότητας του πληθυσμού, η συνάρτηση του Gompertz βασίζεται στην εκθετική σχέση αυτών των δύο ιδιοτήτων. Η συνάρτηση του Gompertz μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$N(t) = C \exp\{\exp[-B(t - M)]\} \quad (3)$$

όπου: t: χρόνος, N(t): πυκνότητα πληθυσμού σε χρόνο t, C: η τιμή της ανώτερης ασύμπτωτης, δηλ. η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού που δίνεται από το  $N(\infty)$ , M: ο χρόνος στον οποίο ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης είναι μέγιστος, B: ο σχετικός ρυθμός ανάπτυξης στο M

Οι Gibson et al. (1987) εισήγαγαν εξισώσεις παρόμοιες στην εμφάνιση με τη λογιστική συνάρτηση και τη συνάρτηση Gompertz, οι οποίες περιγράφουν καμπύλες βακτηριακής ανάπτυξης με τη μορφή του λογαρίθμου της πυκνότητας των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου, σε όρους ρυθμού εκθετικής ανάπτυξης και διάρκειας λανθάνουσας φάσης. Η τροποποίηση του λογιστικού μοντέλου μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$\log N_{(t)} = A + \frac{D}{1 + \exp[-B(t - M)]} \quad (4)$$

ενώ η τροποποίηση της συνάρτησης του Gompertz γράφεται:

$$\log N_{(t)} = A + D \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (5)$$

όπου: t: χρόνος, N(t): πυκνότητα πληθυσμού σε χρόνο t, A: η τιμή της κατώτερης ασύμπτωτης ( $\log N_{(-\infty)}$ ), D: η διαφορά μεταξύ των τιμών ανώτερης και κατώτερης ασύμπτωτης ( $\log N_{(\infty)} - \log N_{(-\infty)}$ ), M: ο χρόνος στον οποίο ο εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης είναι μέγιστος και B: σχετίζεται με την κλίση της καμπύλης στο M και είναι :για την εξίσωση (4):  $BD/4 =$  κλίση της εφαπτομένης στο M και για την εξίσωση (5):  $BD/e =$  κλίση της εφαπτομένης στο M

Μετά την μαθηματική περιγραφή της καμπύλης ανάπτυξης μπορούμε να υπολογίσουμε τις κινητικές παραμέτρους, όπως το χρόνο διπλασιασμού, το χρόνο λανθάνουσας φάσης ή το χρόνο ώστε οι μικροοργανισμοί να φτάσουν σ' ένα συγκεκριμένο επίπεδο. Με διαφοροποίηση μιας εξίσωσης μπορούν να προκύψουν εκφράσεις για τον μέγιστο ρυθμό εκθετικής ανάπτυξης, τον χρόνο διπλασιασμού, κ.ά. Έτσι, για την τροποποιημένη εξίσωση του Gompertz, έχουμε:

$$\bullet \quad \mu = \frac{BD}{e}, \quad GT = \frac{0.8183}{BD}, \quad t_{lag} = M - \frac{1}{B} + \frac{\log N_{(0)} - A}{\frac{BD}{e}} \quad (6)$$

όπου  $\mu$ : μέγιστος ρυθμός εκθετικής ανάπτυξης, GT: ο χρόνος διπλασιασμού και  $t_{lag}$ : η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης.

### **Μοντέλα επίδρασης θερμοκρασίας**

Η μεγάλη σημασία της θερμοκρασίας για την μικροβιακή ανάπτυξη έχει οδηγήσει στην δημοσίευση διαφόρων μοντέλων. Τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης κατά την εκθετική φάση ( $\mu_{max}$ ). Τα μοντέλα παρουσιάζουν επίσης ενδιαφέρον για την δυνατότητα μιας συνεχούς περιγραφής με παρεμβολή και την πρόρρηση με προεκβολή.

Για την περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη μικροβίων έχουν προταθεί δύο τύποι μοντέλων, τα μοντέλα τύπου Arrhenius και τα μοντέλα τύπου Belehradek.

Τα μοντέλα τύπου Belehraděk γράφονται με τη γενική μορφή:

$$k = \alpha(t - t_0)^d \quad (7)$$

όπου: k: ρυθμός, t: θερμοκρασία και  $\alpha$ , d,  $t_0$ : παράμετροι προσαρμογής

Το  $t_0$  θεωρείται ως βιολογικό μηδέν, δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία (και φυσικά κάτω από την οποία) δεν είναι δυνατή η ανάπτυξη των μικροβίων.

Μεγάλη εφαρμογή στην προρρητική μικροβιολογία έχει το απλό μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας που προκύπτει από την (7)

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (8)$$

το οποίο εφαρμόζεται μόνο στην περιοχή χαμηλών θερμοκρασιών, οι οποίες κυμαίνονται από την ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία μπορεί να παρατηρηθεί ανάπτυξη μικροοργανισμών έως αυτήν ακριβώς πριν τη βέλτιστη θερμοκρασία. Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι αυτή στην οποία η σταθερά ειδικού ρυθμού ανάπτυξης γίνεται μέγιστη. Στην ελάχιστη θερμοκρασία  $T_{\min}$ , ο ρυθμός ανάπτυξης εξ ορισμού είναι μηδέν. Πρόκειται δηλαδή για την ελάχιστη θερμοκρασία μικροβιακής ανάπτυξης όπου η γραμμή παλινδρόμησης κόβει τον άξονα των θερμοκρασιών στο  $\sqrt{k} = 0$ . Συνήθως, η ελάχιστη θερμοκρασία  $T_{\min}$  είναι 2-3°C μικρότερη από τη θερμοκρασία στην οποία πραγματικά παρατηρείται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Μια επέκταση της προηγούμενης εξίσωσης, που επιτρέπει την χρησιμοποίηση δεδομένων απ' όλο το βιοκινητικό θερμοκρασιακό εύρος είναι:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \{1 - \exp[c(T - T_{\max})]\} \quad (9)$$

Όπως ακριβώς το  $T_{\min}$  είναι το "βιολογικό μηδέν" στο χαμηλό άκρο της θερμοκρασιακής περιοχής, έτσι και το  $T_{\max}$  αποτελεί το "βιολογικό μηδέν" στο υψηλό άκρο της περιοχής. Κάτω δηλαδή από το  $T_{\min}$  και πάνω από το  $T_{\max}$  δεν παρατηρείται ανάπτυξη μικροβίων. Η  $T_{\max}$  είναι η μεγαλύτερη θερμοκρασία όπου η γραμμή παρεμβολής κόβει τον άξονα θερμοκρασίας στο  $\sqrt{k} = 0$ . Οι παράμετροι c και b δεν έχουν μικροβιολογική ερμηνεία, αλλά απλά βοηθούν στην προσαρμογή δεδομένων για θερμοκρασίες μεγαλύτερες της βέλτιστης. Απ' τη στιγμή που το να αποκτήσει κανείς ακριβή δεδομένα σε πολύ χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης είναι δύσκολο, οι  $T_{\min}$  και  $T_{\max}$  συνήθως δεν είναι οι πραγματικές θερμοκρασίες, στις οποίες η ανάπτυξη είναι μηδενική.

Καθώς η μικροβιακή ανάπτυξη είναι μία βιοχημική διαδικασία, είναι αναμενόμενο για ένα συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος να μπορεί να εφαρμοστεί ο νόμος του Arrhenius. Η πιο απλή σχέση του τύπου Arrhenius είναι :

$$k = A \exp(-E_a / RT) \quad (10)$$

όπου k: η σταθερά μικροβιακού ρυθμού ανάπτυξης,  $E_a$ : η ενέργεια ενεργοποίησης και A: εμπειρική σταθερά

και χρησιμοποιείται για την προσαρμογή δεδομένων σε θερμοκρασίες μικρότερες της βέλτιστης.

Σε διάγραμμα  $\ln k$  συναρτήσει του αντιστρόφου της απόλυτης θερμοκρασίας  $1/T$  προκύπτει ευθεία γραμμή αν τα  $E_a$  και A δεν μεταβάλλονται με τη θερμοκρασία. Η σχέση Arrhenius μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για την μοντελοποίηση της θερμοκρασιακής εξάρτησης της λανθάνουσας φάσης, η οποία είναι σημαντική για την πρόρρηση της διατηρησιμότητας κάτω από μεταβλητές συνθήκες θερμοκρασίας όπου υπάρχει χαμηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο.

Στην περίπτωση αυτή για τη δημιουργία της γραφικής παράστασης του Arrhenius χρησιμοποιείται το αντίστροφο του χρόνου λανθάνουσας φάσης,  $1/t_L$ .

Ο Davey (1989) πρότεινε ένα γραμμικό μοντέλο τύπου Arrhenius για να περιγράψει την επίδραση της θερμοκρασίας και της ενεργότητας του νερού στο ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης. Όταν η ενεργότητα του νερού διατηρείται σχεδόν σταθερή, το οποίο μπορεί να συμβαίνει για τα περισσότερα νωπά τρόφιμα αφού απαιτείται σημαντική αλλαγή της περιεχόμενης υγρασίας γαι  $v'$  αλλάζει η ενεργότητα του νερού σημαντικά, ο όρος αυτός παραλείπεται και καταλήγει στην εξίσωση:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} \quad (11)$$

όπου  $k$ : ρυθμός,  $T$ : θερμοκρασία (K),  $C_0, C_1$  και  $C_2$  παράμετροι προσαρμογής

#### ΜΟΝΤΕΛΑ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ, ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Σε ορισμένα τρόφιμα, όπως ψάρι, κρέας, γάλα και πουλερικά, τα οποία παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ενεργότητας νερού και σχεδόν ουδέτερες τιμές pH, η θερμοκρασία είναι ο μοναδικός ή ο σημαντικότερος παράγοντας που ελέγχει το ρυθμό μικροβιακής ανάπτυξης. Σε πολλά όμως προϊόντα η θερμοκρασία αποτελεί μόνο τον ένα από μια σειρά παραγόντων που επιδρούν στο ρυθμό της αλλοίωσης του προϊόντος. Η συνδυαστική επίδραση διαφορετικών περιορισμών στην ανάπτυξη μικροβίων περιγράφηκε στην τεχνολογία των εμποδίων. Σε λίγες περιπτώσεις έχουν γίνει προσπάθειες για την μοντελοποίηση των συνδυαστικών επιδράσεων δύο ή περισσότερων παραγόντων στο ρυθμό ανάπτυξης. Τις περισσότερες φορές οι προσπάθειες περιορίστηκαν στην απλή παρουσίαση ενός συγκεκριμένου συνδυασμού εμποδίων για να αποτρέψουν την μικροβιακή ανάπτυξη.

Θερμοκρασία και ενεργότητα νερού: Λαμβάνοντας ως αρχικό σημείο τα μοντέλα τετραγωνικής ρίζας δοκιμάστηκαν οι εξισώσεις:

$$\sqrt{k} = d(T - T_{\min})\sqrt{(a_w - a_{w_{\min}})} \quad (12)$$

$$\text{και } \sqrt{k} = d(T - T_{\min})\{1 - \exp[c(T - T_{\max})]\}\sqrt{(a_w - a_{w_{\min}})} \quad (13)$$

Η μορφή των παραπάνω εξισώσεων φανερώνει ότι οι επιδράσεις της θερμοκρασίας και της ενεργότητας του νερού είναι προσθετικές και όχι συνεργιστικές.

Βάσει της σχέσης Arrhenius προτάθηκε η:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T} + C_3 a_w + C_4 a_w^2 \quad (14)$$

όπου  $k$ : ο ρυθμός ανάπτυξης και  $C_i$  με  $i=0,1,2,3,4$  : συντελεστές που προσδιορίζονται με τεχνικές πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης

Η εξίσωση αυτή έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για δεδομένα σχετικά με το χρόνο λανθάνουσας φάσης αντικαθιστώντας το  $k$  με το  $1/t_L$ .

Θερμοκρασία και pH: 
$$\sqrt{k} = C\sqrt{pH - pH_{\min}}(T - T_{\min}) \quad (15)$$

Το  $pH_{\min}$  είναι η χαμηλότερη τιμή pH στην οποία παρατηρείται ανάπτυξη μικροβίων και εξαρτάται από το συγκεκριμένο οξύ (οξικό, γαλακτικό, κιτρικό, κ.ά.) που χρησιμοποιείται. Η θερμοκρασία και το pH, όπως φαίνεται από την παραπάνω σχέση, επίσης δρουν ανεξάρτητα.

Θερμοκρασία, ενεργότητα νερού και pH

$$\sqrt{k} = C\sqrt{a_w - a_{w_{\min}}}\sqrt{pH - pH_{\min}}(T - T_{\min}) \quad (16)$$

Ανακεφαλαιώνοντας, την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί ολοκληρωμένα μοντέλα πρόρρησης και ικανός αριθμός δεδομένων που επιτρέπουν την ανάπτυξη λογισμικού με τη δυνατότητα πρόρρησης του ρυθμού ανάπτυξης και αδρανοποίησης της μικροχλωρίδας του τροφίμου και συνεπώς ποσοτικής εκτίμησης του κινδύνου από παθογόνους μικροοργανισμούς, στις συγκεκριμένες συνθήκες της διεργασίας. Τα θεωρούμενα ως ελέγχοντα χαρακτηριστικά του τροφίμου, όπως το pH, η ενεργότητα νερού, η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου και πιθανόν και οργανικών οξέων ή άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων αποτελούν τα προς εισαγωγή δεδομένα (input) για το τρόφιμο. Επι πλέον τροφοδοτούνται τα χαρακτηριστικά του εξεταζόμενου σταδίου της διεργασίας όπως ο χρόνος, η θερμοκρασία και η μερική πίεση οξυγόνου και άλλων αερίων. Τέτοιο λογισμικό έχει αναπτυχθεί από τη USDA (U.S. Department of Agriculture) (Pathogen Modeling Program v.4) και στο Ηνωμένο Βασίλειο από ένα μεγάλο ερευνητικό πρόγραμμα του Υπουργείου Γεωργίας μεταξύ άλλων στο Institute of Food Research, το Campden και το Leatherhead Food Research Association (Food MicroModel) . Το Pathogen Modeling Program v.4 στηρίζεται στην προσομοίωση των καμπυλών αύξησης των μικροοργανισμών με την συνάρτηση Gompertz στις διάφορες ελέγχουσες συνθήκες που αναφέρθηκαν. Χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη δυνατή βάση δεδομένων από εκτεταμένα πειράματα για τους βασικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (*Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* κ.λ.π) και εμπλουτίζεται συνεχώς με δεδομένα για “νέους” σημαντικούς μικροοργανισμούς όπως ο *E.coli* O157:H7. Το πρόγραμμα επιτρέπει την ποσοτική πρόρρηση της δυνατότητας και της έκτασης ανάπτυξης των κρίσιμων μικροοργανισμών στις συνθήκες και παραμέτρους της διεργασίας παραγωγής. Το Food MicroModel (Food Micromodel Ltd., Surrey, UK) είναι διαθέσιμο ως εμπορικό λογισμικό και βασίζεται σε παρόμοια ως άνω προσέγγιση. Δίνει μεγαλύτερες δυνατότητες όσον αφορά το διάστημα τιμών ορισμένων ελεγχουσών παραμέτρων π.χ. NaCl και τον συνυπολογισμό περισσότερων αντιμικροβιακών παραγόντων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Food microbiology / M.R. Adams and M.O. Moss, 2000  
 The Microbiology of safe food / S. J. Forsythe, 2000  
 Modern food microbiology / James M. Jay, 2000  
 The microbiological safety and quality of food / Edited by Barbara M. Lund, Tony C. Baird-Parker, 2000  
 Food hygiene, microbiology and HACCP / S.J. Forsythe and P.R. Hayes, 1998  
 HACCP : a practical approach / Sara Mortimore, Carol Wallace 1998

International Commission on Microbiological Specifications for Foods . Microorganisms in foods 5 : characteristics of microbial pathogens / ICMSF, 1996

International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union, Characteristics of microbial pathogens / International Commission on Microbiological Specification for Food, 1996

Food biotechnology : microorganisms / Edited by Y. H. Hui, George G. Khachatourians, 1995

HACCP : establishing hazard analysis critical control point programs / edited by Kenneth E. S., 1995

Μικροβιολογία τροφίμων : βακτήρια-ζύμες-μύκητες, Μπαλατσούρας Γεώργιος, 1992