



# **ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου**

**Μικροβιολογία Τροφίμων**

**1<sup>ο</sup> & 2<sup>ο</sup> Εργαστήριο**

**Μάρτιος 2026**



## ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ

Οι μέθοδοι εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου των τροφίμων διακρίνονται σε έμμεσες και άμεσες.

- ✓ Έμμεσοι είναι οι μέθοδοι της αναγωγής χρωστικών (methylene blue), της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, της μετρήσεως της ATP, της μικροθερμιδομετρίας, της μέτρησης βακτηριακών μεταβολιτών κ.λ.π. Οι μέθοδοι αυτοί είναι γρήγοροι και αποτελεσματικοί και επομένως μπορούν να εφαρμοσθούν στη βιομηχανία, αλλά έχουν υψηλό κόστος εγκατάστασης του εξοπλισμού.
- ✓ Άμεσοι είναι οι μικροσκοπικές μέθοδοι και οι μέθοδοι που βασίζονται στη μέτρηση/εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης μετά από επώαση του δείγματος σε στερεά ή υγρά υποστρώματα, οι οποίες επομένως μετρούν τα ζωντανά μικρόβια.



## ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ ΜΕ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η εκτίμηση του ζωντανού μικροβιακού πληθυσμού των τροφίμων με τη χρήση στερεών υποστρωμάτων βασίζεται στην παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται στο άγαρ και σχηματίζει μια ορατή αποικία.

Αυτή η παραδοχή δεν είναι απόλυτα σωστή διότι τα μικροβιακά κύτταρα του δείγματος ανήκουν σε διαφορετικά είδη με διαφορετικές φυσιολογικές απαιτήσεις και έτσι δεν αναπτύσσονται όλα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Μερικά μικρόβια λόγω θρεπτικών ελλείψεων του υποστρώματος, δυσμενών συνθηκών επώασης ή αντιμικροβιακών ουσιών (είτε είναι παρούσες στο υπόστρωμα είτε παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς) δεν σχηματίζουν ορατές αποικίες.

Επιπλέον, μια αποικία δεν προέρχεται πάντα από ένα μικροβιακό κύτταρο. Μια αποικία μπορεί να σχηματιστεί από ένα ή περισσότερα κύτταρα.



## ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ ΜΕ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων το δείγμα ομογενοποιείται όσο γίνεται καλύτερα για το διασκορπισμό των μικροβιακών κυττάρων.

Έπειτα χρησιμοποιούνται διαφορετικά υποστρώματα και διαφορετικές συνθήκες επώασης, ώστε να καταστεί δυνατή η καταμέτρηση των διαφόρων μικροβιακών ομάδων (αερόβια, μεσόφιλα, ψυχρότροφα, κ.λ.π.) του δείγματος.

Το αποτέλεσμα της εκτιμήσεως των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζεται σε **Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units - CFU) / g ή ml δείγματος.**



## Περιγραφή μεθόδου καταμέτρησης αποικιών σε τρυβλία Petri

Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος και την παρασκευή της αρχικής αραιώσεως και σε σύντομο χρονικό διάστημα παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις με τη μεταφορά ενός όγκου δείγματος και 9-πλάσια ποσότητα αραιωτικού υγρού, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1.

Ανάλογα το είδος του τροφίμου, χρησιμοποιείται φυσιολογικός πεπτονούχος ορός, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, διάλυμα Ringer κ.α. Πάντως όσο μεγαλύτερος όγκος υγρού μεταφέρεται τόσο η ακρίβεια της μεθόδου μεγαλώνει.

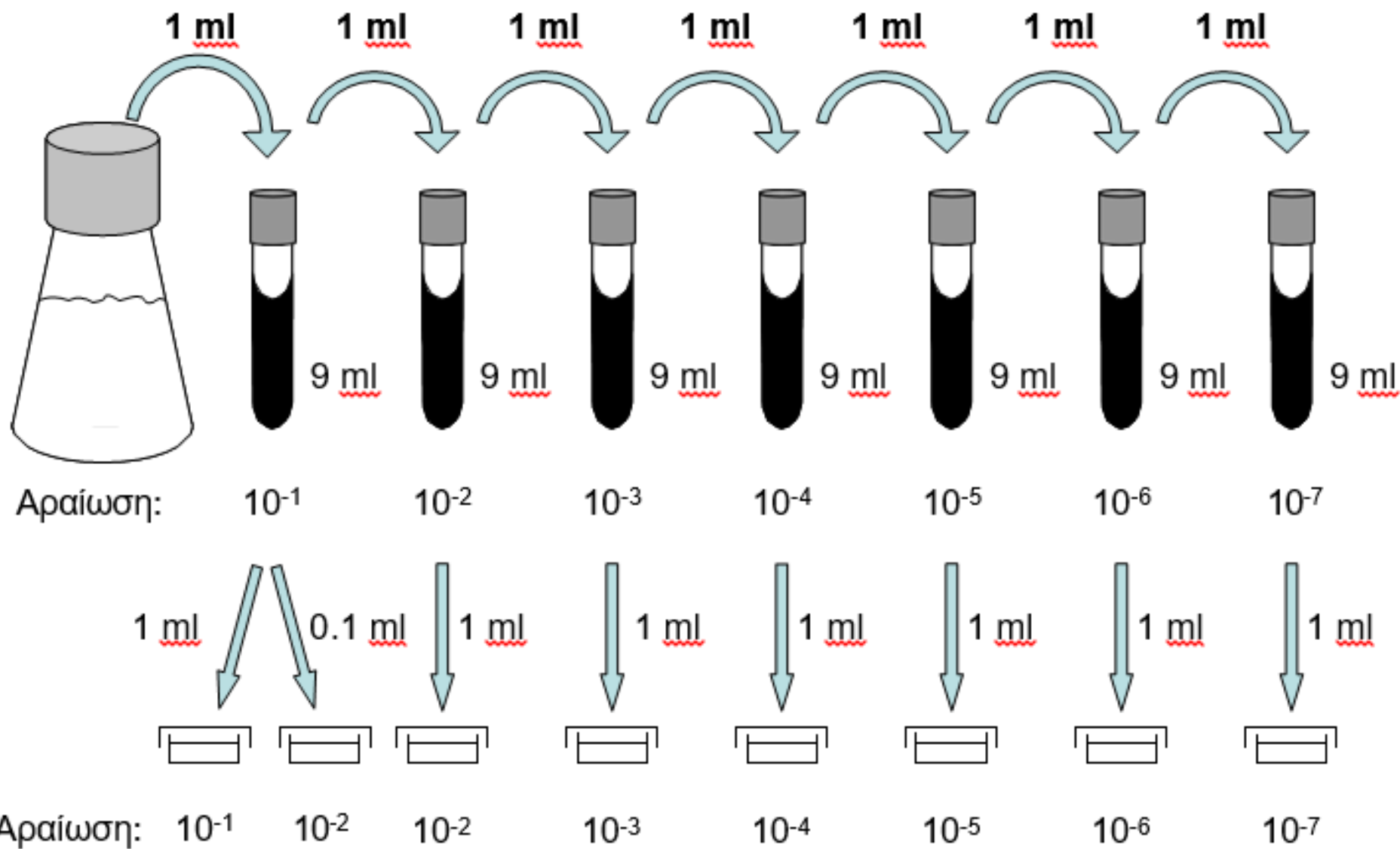
Από την κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονται συνήθως δυο τρυβλία με την τεχνική της ενσωματώσεως ή την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης.



## ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ PETRI

- A. Δειγματοληψία & ομογενοποίηση του δείγματος
- B. Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις
- Γ. Εμβολιασμός σε θρεπτικό υπόστρωμα
- Δ. Επώαση τρυβλίων
- Ε. Καταμέτρηση αποικιών & έκφραση αποτελεσμάτων

# Περιγραφή μεθόδου καταμέτρησης αποικιών σε τρυβλία Petri



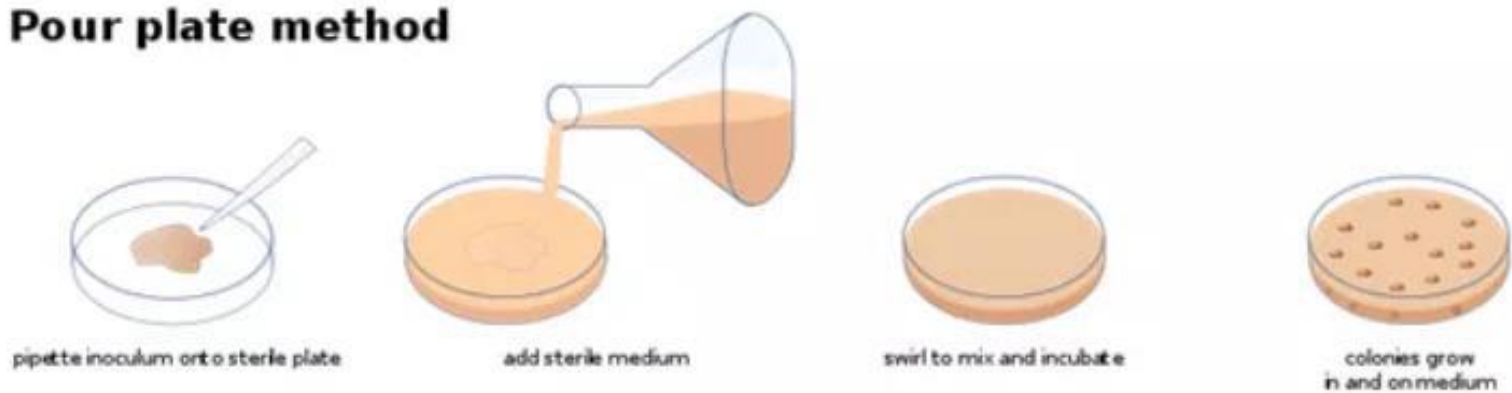
**Διάγραμμα 1:** Διαγραμματική απεικόνιση παρασκευής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.



# Περιγραφή μεθόδου καταμέτρησης αποικιών σε τρυβλία Petri

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ

### Pour plate method



## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗΣ

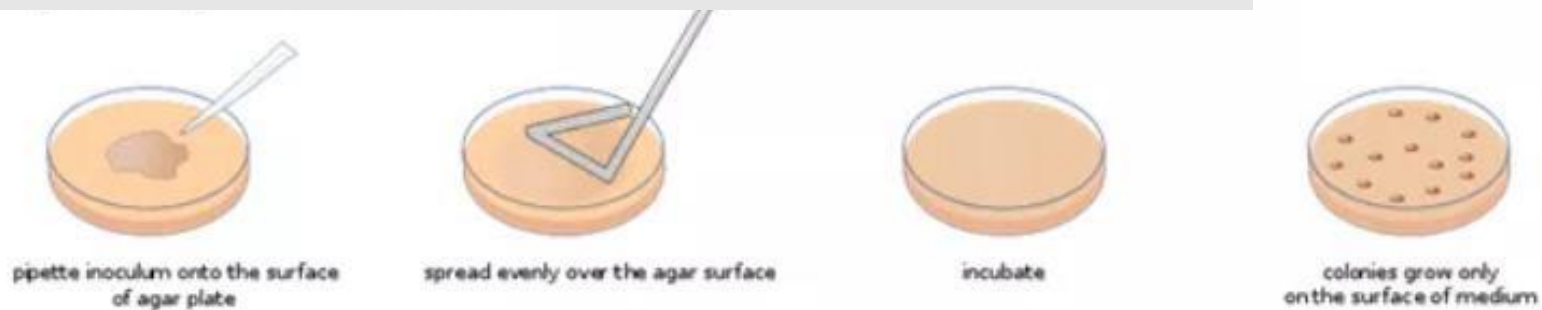


Figure 2. Methods of Bacterial Inoculation. Credit: Macedo, CC BY-SA 4.0



## Μέτρηση των αποικιών και κανόνες αρίθμησης

Για την επιλογή των τρυβλίων και την αρίθμηση των αποικιών ακολουθούνται οι παρακάτω κανόνες

- i. Αριθμούνται όλες οι αποικίες, οποιουδήποτε μεγέθους. Απαιτείται προσοχή, ώστε να αποφεύγεται σύγχυση των αποικιών με σωματίδια του δείγματος ή ιζήματα του θρεπτικού υλικού. Αν υπάρχει αμφιβολία, η εξέταση γίνεται με τη βοήθεια φακού ή στερεοσκοπίου.
- ii. Επιλέγονται τα τρυβλία που μετά την αρίθμηση των αποικιών διαπιστώνεται ότι περιέχουν 30-300 αποικίες.
- iii. Ο αριθμός των αποικιών υπολογίζεται αν ο αριθμός αποικιών των επιλεγμένων τρυβλίων πολλαπλασιαστεί με το αντίστροφο της αντίστοιχης αραιώσης.

$$\text{CFU/g or ml} = \text{CFU/τρυβλίο} \times (\text{αραιώση})^{-1}$$



## Μέτρηση των αποικιών και κανόνες αρίθμησης



?

Number of **Colony-Forming-Units (CFU)** per ml of original stock?

[www.biologyexams4u.com](http://www.biologyexams4u.com)

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{No. of colonies} \times \text{Total dilution factor}}{\text{Volume of culture plated in ml}}$$



## Μέτρηση των αποικιών και κανόνες αρίθμησης

- iv. Αν από μια αραίωση έχουν ενοφθαλμιστεί δυο τρυβλία (30 - 300 αποικίες) τότε υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών και πολλαπλασιάζετε με το αντίστροφο της αραίωσης. Σε περίπτωση που μόνο ένα τρυβλίο έχει αποικίες μεταξύ 30-300, υπολογίζεται ξανά ο μέσος όρος των τρυβλίων.
- v. Εάν δυο τρυβλία από δυο διαδοχικές αραιώσεις έχουν 30-300 αποικίες, τότε για κάθε αραίωση υπολογίζεται ο αριθμός των αποικιών στο τρόφιμο (CFU/g ή ml) και εξάγεται ο μέσος όρος αυτών. Σε περίπτωση που ο λόγος του μεγαλύτερου αριθμού (CFU/g ή ml) προς τον μικρότερο αριθμού είναι μεγαλύτερος από 2, τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται μόνο με τον μικρότερο αριθμό (CFU/g ή ml).
- vi. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν λιγότερες από 30 αποικίες, το αποτέλεσμα εκφράζεται κατ' εκτίμηση με βάση των αριθμό των αποικιών του ή των τρυβλίων της μικρότερης αραίωσης.



## Μέτρηση των αποικιών και κανόνες αρίθμησης

vii. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν περισσότερες από 300 αποικίες, επιλέγεται το τρυβλίο της μεγαλύτερης αραιώσης και αριθμούνται οι αποικίες με την βοήθεια τετραγωνισμένου πλέγματος. (πλέγμα στο οποίο το κάθε τετράγωνο έχει εμβαδό  $1 \text{ cm}^2$  όταν υπάρχουν λιγότερες από 10 αποικίες ανά  $\text{cm}^2$ , τότε αριθμούνται 12 τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος /  $\text{cm}^2$ . εάν υπάρχουν περισσότερα από 10 αποικίες /  $\text{cm}^2$ , τότε μετρούνται οι αποικίες σε 4 τετράγωνα και εξάγεται ο μέσος όρος ανά  $\text{cm}^2$ . Κατόπιν ο μέσος όρος /  $\text{cm}^2$  πολλαπλασιάζεται με το συνολικό εμβαδό των τρυβλίων (συνήθως 56 ή 65  $\text{cm}^2$ ).

viii. Εάν κανένα τρυβλίο δεν έχει αποικίες τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν  $< 1$  επί τον συντελεστή της μικρότερης αραιώσης.



## Μέτρηση των αποικιών και κανόνες αρίθμησης

ix. Εάν στα τρυβλία υπάρχουν αποικίες που παρουσιάζουν εξάπλωση στην επιφάνεια (spreaders), όπως του γένους *Proteus*, αριθμούνται οι αποικίες σε αντιπροσωπευτικά τμήματα μόνο. Σε περίπτωση που η εξάπλωση καλύπτει περισσότερο από το 50% της επιφάνειας του τρυβλίου, το αποτέλεσμα εκφράζεται ως εξάπλωση.

x. Το τελικό αποτέλεσμα του αριθμού των αποικιών στρογγυλοποιείται στα 2 πρώτα ψηφία. Αν το τρίτο είναι 5 στρογγυλοποιείται στον αμέσως επόμενο αριθμό όταν το δεύτερο ψηφίο είναι περιττός και στον αμέσως μικρότερο αριθμό όταν είναι άρτιος, π.χ. ο αριθμός 185 γίνεται 180 ενώ το 135 γίνεται 140.