



**Corso di Microbiologia generale (6 CFU)**  
**Corso di Microbiologia generale (6 CFU)**

**Anno Accademico 2018-2019**

## **Esercitazione n. 3**

### **Valutazione della crescita microbica. Metodi di conta dei microrganismi.**

Indice.

- 1 [Scopo dell'esercitazione.](#)
- 2 [Valutazione della crescita dei microrganismi.](#)
  - 2.1 [Definizione di crescita](#)
  - 2.2 [La curva di crescita. Cinetica di crescita](#)
  - 2.3 [Metodi di valutazione della crescita](#)
    - 2.3.1 [Misurazione della biomassa](#)
    - 2.3.2 [Misurazione di componenti cellulari](#)
    - 2.3.3 [Misurazione del numero di cellule](#)
- 3 [Metodi di conta dei microrganismi](#)
  - 3.1 [Metodi di conta totale](#)
  - 3.2 [Metodi di conta vitale](#)
    - 3.2.1 [Allestimento delle diluizioni](#)
    - 3.2.2 [Metodi di conta in piastra](#)  
[Inoculo per inclusione](#)  
Conta batterica totale (conta batterica standard, SPC)  
Coliformi  
[Inoculo per spandimento](#)  
[Guida all'interpretazione dei risultati della carica mesofila aerobia.](#)
    - 3.2.3 [Metodi di conta in substrato liquido: MPN \(Most Probable Number\).](#)
- 4 [Esercizi](#)

#### **1. Scopo dell'esercitazione.**

Lo scopo di questa esercitazione è familiarizzare gli studenti con i metodi per la valutazione della crescita e del numero dei microrganismi. Oltre ad utilizzare praticamente tutti i metodi descritti, gli studenti dovranno utilizzare i dati ottenuti da curve di crescita di un lievito e di un batterio per costruire i grafici relativi e descriverli in una breve relazione.

#### **2. La crescita dei microrganismi.**

##### **2.1 Definizione di crescita.**

La crescita è l'incremento ordinato di tutti i componenti cellulari. Quando i microrganismi si trovano in un terreno colturale adeguato la crescita è, per periodi più o meno lunghi, bilanciata: un

incremento della biomassa è accompagnato da un incremento proporzionale di tutti i componenti cellulari (RNA, DNA, proteine, etc.) dal momento che le cellule mantengono una composizione chimica costante. Per questa ragione la crescita può essere misurata misurando la biomassa o uno qualsiasi dei componenti cellulari. In microrganismi unicellulari, durante la crescita bilanciata, la valutazione del numero di microrganismi è equivalente alla valutazione della biomassa o di un suo componente.



[Torna all'indice](#)

## 2.2 La curva di crescita. Cinetica di crescita.

In colture batch (cioè quando i microrganismi vengono inoculati in un substrato ed incubati fino al termine della crescita) la crescita segue un andamento sigmoidecaratteristico. Se si riporta sull'asse delle X il tempo e sull'asse delle Y il logaritmo della biomassa (o di qualsiasi altra quantità misurabile, come numero di cellule, RNA, DNA, proteine, etc.), in modo da ottenere un grafico semi-logaritmico si osservano caratteristicamente le seguenti fasi:

1. **fase lag**: non si ha incremento di biomassa ma si hanno spesso importanti modificazioni della composizione cellulare. Durante la fase lag vengono per esempio indotti gli enzimi necessari alla crescita nel nuovo substrato, il numero di ribosomi per cellula raggiunge il livello ottimale, etc.
2. **fase di accelerazione**: la velocità di crescita specifica aumenta fino a raggiungere quella massima possibile nelle condizioni in cui il microrganismo si trova (in funzione di areazione, nutrienti, temperatura, etc.).
3. **fase esponenziale o logaritmica**: la velocità di crescita specifica è costante: il logaritmo della biomassa aumenta in funzione lineare con il tempo. Questa fase ha in genere una durata piuttosto limitata.
4. **fase di decelerazione**: in seguito ad un peggioramento delle condizioni di crescita (esaurimento di nutrienti, accumulo di metaboliti tossici, cambiamento del pH, etc.) la **velocità di crescita specifica** diminuisce;
5. **fase stazionaria**: la crescita netta si interrompe, anche se sono possibili modificazioni importanti della composizione cellulare.
6. **fase di morte e/o di lisi**: oltre un certo intervallo di tempo in fase stazionaria le cellule in genere muoiono. Anche se il numero di cellule vitali può diminuire, la biomassa potrebbe rimanere costante per un periodo più o meno lungo, seguito da una fase di lisi, con rilascio di materiale cellulare nel mezzo.

La crescita segue l'andamento di una reazione autocatalitica del prim'ordine: la velocità di incremento della biomassa è proporzionale alla biomassa presente in quel dato istante. In termini matematici:

$$dx/dt = \mu x \quad (1)$$

dove  $\mu$  è la costante di velocità specifica di crescita (in  $h^{-1}$ ),  $x$  è la biomassa (in  $g\ l^{-1}$ ) e  $t$  è il tempo (in h); la (1) può essere riarrangiata come segue:

$$dx/x = \mu dt \quad (2)$$

integrando i due membri della (2) rispettivamente fra  $x_1$  e  $x_2$  (biomassa al tempo 1 e al tempo 2) e fra  $t_1$  e  $t_2$  si ottiene:

$$\ln x_2 - \ln x_1 = \mu(t_2 - t_1) \quad (3)$$

che può essere espressa in forma esponenziale come:

$$x_2 - x_1 = e^{\mu(t_2-t_1)} \quad (4)$$

più convenientemente la (3) viene espressa sotto forma di logaritmi decimali come:

$$\log x_2 - \log x_1 = \mu(t_2-t_1)/2,303 \quad (5)$$

Quindi, se vengono usati i logaritmi decimali, la pendenza della retta rappresentante la fase esponenziale di crescita non è  $\mu$  ma  $\mu/2,303$

Una costante importante, facilmente derivabile da  $\mu$  è il tempo medio di divisione o di generazione, cioè il tempo necessario perchè tutti i componenti cellulari raddoppino (g, ore). Quando la biomassa della coltura raddoppia  $x_2 = 2x_1$ , e  $(t_2-t_1) = g$  quindi la (3) diventa:

$$\ln 2 = \mu g \quad (6)$$

$$g = \ln 2 / \mu = 0,693 / \mu \quad (7)$$

In una coltura in continuo, a differenza di una coltura in batch, il substrato viene alimentato in continuo e il brodo di fermentazione viene rimosso nella stessa misura. Per questa ragione si stabilisce un equilibrio fra la crescita e la perdita di biomassa attraverso lo scarico. Colture in continuo possono essere realizzate utilizzando un chemostato o un turbidostato; nel chemostato viene mantenuta costante la velocità di alimentazione e di scarico: in seguito alla crescita e al consumo del substrato si raggiunge un equilibrio nella concentrazione di biomassa e nutrienti che è determinato dalla concentrazione del nutriente più limitante nel substrato di alimentazione. Nel turbidostato un appropriato sistema di controllo mantiene costante al livello desiderato la torbidità della coltura e quindi la biomassa presente; il livello di biomassa presente determina il livello dei nutrienti all'interno del recipiente di coltura. La cinetica delle colture in continuo esula dagli scopi di questo corso di esercitazioni



[Torna all'indice](#)

## 2.3 Metodi di valutazione della crescita.

### 2.3.1 Misura della biomassa.

La biomassa microbica può essere misurata direttamente separando le cellule dal substrato di coltura ed essiccandole. La separazione può essere ottenuta per **centrifugazione** o per **filtrazione**.

Nel **metodo per centrifugazione** (più adatto a microrganismi unicellulari come batteri o lieviti) un volume noto del brodo di coltura viene trasferito in provette tarate (essiccate e prepesate) e centrifugato (p.es. a 6000 rpm per 5-10 min). Il surnatante limpido viene allontanato e il pellet viene risospeso in acqua distillata per allontanare tutti i residui del substrato di coltura. La centrifugazione viene ripetuta e, una volta asportato il surnatante, le provette vengono essiccate (p.es. a 105°C per 24 h). Il metodo non è molto sensibile: dal momento che è spesso poco conveniente centrifugare più di 10 ml di coltura e che una bilancia analitica ha una sensibilità di 0,1 mg, si riesce a misurare con accuratezza soltanto biomasse >0,05 g/l (che possono corrispondere a  $2,5 \times 10^{11}$  batteri).

Nel **metodo per filtrazione** un volume noto del brodo colturale viene filtrato su membrane (da 0,45  $\mu$ , per batteri o lieviti) o filtri di fibra di vetro (da 0,7-2,5  $\mu$ , per i funghi filamentosi e talvolta per i lieviti) pre-essiccate e tarate; dopo lavaggio con acqua distillata i filtri vengono

essiccati e pesati. Il metodo è più sensibile (i filtri pesano meno delle provette ed è possibile filtrare volumi maggiori di brodo) ma i filtri si intasano facilmente quando la concentrazione della biomassa è elevata.

Un metodo alternativo prevede la misurazione della **torbidità** o dell'**assorbanza** della coltura (in genere a lunghezze d'onda comprese fra 600 e 450 nm: la misura è più sensibile alle lunghezze d'onda inferiori). In un intervallo generalmente piuttosto limitato (assorbanze comprese fra 0,02 e 0,6) esiste in genere una relazione lineare fra biomassa e assorbanza e, utilizzando appropriate curve di taratura (p.es. misurando l'assorbanza di colture di cui sia nota la biomassa), è possibile ottenere una stima indiretta della biomassa.

### **2.3.2 Misurazione di componenti cellulari.**

Durante la crescita bilanciata tutti i componenti cellulari aumentano in modo bilanciato e quindi ciascuno di essi può essere usato per stimare la crescita. I metodi di misura dell'azoto cellulare, delle proteine, degli acidi nucleici sono in genere più sensibili dei metodi per la misurazione della biomassa. La loro descrizione, tuttavia, esula dagli scopi di questo corso. Essi in ogni caso non sono utilizzabili quando la crescita non è bilanciata: p.es. quando E. coli cresce in un substrato povero di azoto ma ricco di carbonio, tende ad accumulare sostanze di riserva: ciò determina un incremento della biomassa senza determinare p.es. un proporzionale incremento delle proteine cellulari.

### **2.3.3 Misurazione del numero di cellule.**

Anche la misurazione del numero di cellule, pur essendo un metodo relativamente sensibile, ha lo svantaggio di essere applicabile come misura indiretta della biomassa soltanto durante la crescita bilanciata. Infatti, la dimensione media delle cellule varia molto quando le condizioni di crescita sono lontane da quelle ottimali. Tuttavia il numero di cellule ha spesso un significato importante dal punto di vista microbiologico, sia come indicatore del grado di crescita che di contaminazione con microrganismi. I metodi di conta totale (che si basano sulla visualizzazione e/o sulla conta diretta delle cellule, siano esse vive o morte) e i metodi di conta vitale (che permettono una stima del numero di cellule vitali presenti in seguito alla crescita delle cellule presenti nel materiale che si intende analizzare in substrato liquido o solido) saranno descritti nelle sezioni successive.



[Torna all'indice](#)

## **3. Metodi di conta dei microrganismi**

### **3.1 Metodi di conta totale**

Viene stimato il numero totale di microorganismi perchè è generalmente impossibile distinguere fra cellule vive e cellule morte. Vengono anche definiti metodi di conta diretti, perchè viene valutato direttamente il numero di cellule.

### Conta microscopica diretta.

Prevede lo spandimento su un vetrino e la conta delle cellule opportunamente colorate su un'area nota o l'uso di vetrini appositi (camere di conta) in cui un volume noto è delimitato da un'incavatura tarata sul vetrino divisa in volumi più piccoli da incisioni verticali o orizzontali.

Un metodo di conta utilizzato in passato per gli alimenti era il Food film. 0,01 ml dell'alimento da esaminare (o di una sua diluizione) venivano distribuiti su un'area di 1 cm<sup>2</sup> su un vetrino speciale. Il vetrino veniva asciugato a 45°C per 5 min. su una superficie perfettamente piana. Il vetrino veniva sgrassato per immersione in xilolo, colorato (cristal violetto per 1 min; altre colorazioni che utilizzabili per questo scopo sono la colorazione di Gram, che permette di distinguere Gram positivi e Gram negativi, o il Gray's double stain, che colora in modo diverso lo sfondo, costituito da residui dell'alimento o del brodo di coltura, e i microrganismi), lavato e asciugato. Il preparato veniva osservato con obiettivo ad immersione e il numero di aggregati di microorganismi veniva contato in 10-100 campi (in funzione del numero di microorganismi per campo) partendo da un campo scelto a caso e selezionando gli altri a partire dal margine di quest'ultimo.

Il numero di microorganismi in questo caso è dato da:

$$N \times M \times D = \text{conta diretta per ml o g.}$$

dove N è uguale al numero medio di microorganismi per campo, M al fattore microscopico e D al fattore di diluizione. Per determinare M, con un micrometro oggettivo e un micrometro oculare si calcola per l'obiettivo che si intende usare il diametro del campo microscopico approssimato al millesimo di millimetro. Da questo si ricava l'area del campo microscopico in mm<sup>2</sup> e, tenendo conto del fatto che 0,01 ml di campione sono stati distribuiti su 1 cm<sup>2</sup> (100 mm<sup>2</sup>) di vetrino, si ottiene la relazione:

$$M = 10000 / (3,1416r^2)$$

dove 10000 è un fattore di conversione per passare da 0,01 ml (distribuiti su 1 cm<sup>2</sup>) a 1 ml, cui si fa riferimento nella (1); infatti: 0,01ml/cm<sup>2</sup>=1 ml/10000 mm<sup>2</sup>. (3,1416r<sup>2</sup>)= area del campo in mm<sup>2</sup>. Per cui, M è uguale al numero di campi per cui va moltiplicato il numero medio di microorganismi contato, per avere il contenuto totale di microorganismi riferito ad 1 ml.

Le **camere di conta** sono utilizzate soprattutto per la determinazione del numero di cellule di lieviti. La **camera di Thoma** è un vetrino che ha un'incavo della superficie di 1 mm<sup>2</sup> e della profondità di 0,1 mm (quindi un volume di 0,1 mm<sup>3</sup> o 0,0001 ml), delimitato da un vetrino coprioggetto a facce perfettamente piane e parallele. L'area dell'incavo è a sua volta divisa in 400 quadratini, ciascuno di 0,05 mm di lato (e quindi di 0,00025 mm<sup>3</sup> o 1/4.000.000 ml di volume). Per la conta un'appropriata diluizione del campione da analizzare viene deposta sul vetrino e coperta con il vetrino coprioggetto. La camera viene posta sotto un microscopio ed osservata con un ingrandimento di 400x. Per ottenere una valutazione accurata del numero di cellule si conta il numero di cellule o aggregati di cellule in un numero di quadratini che è approssimativamente inversamente proporzionale al numero di cellule per quadratino. P.es., con un numero medio di cellule per quadratino inferiore a 1 è opportuno contare le cellule in almeno 50 quadratini; con un numero di cellule maggiore è possibile contare soltanto 25 o 10 quadratini. Il numero di cellule per ml può essere determinato con la seguente formula:

$$\text{numero di cellule per ml} = 4 \times 10^6 \times D \times N / Q$$

dove 4x10<sup>6</sup> è il fattore di conversione necessario per riportare il volume delimitato da un quadratino a 1 ml (1 quadratino delimita infatti un volume di 4x10<sup>-6</sup> ml), D è il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione effettuata (per esempio se il campione è stato diluito 10 volte il

risultato va moltiplicato per 10), N è il numero totale di cellule contate, Q è il numero di quadratini in cui è stata eseguita la conta.

Le camere di conta utilizzate per i lieviti sono inadatte alla conta dei batteri, che hanno dimensioni notevolmente minori: infatti, mentre è improbabile che più cellule di lievito (di 10-20  $\mu$  di diametro) siano impilate nella profondità di una camera di Thoma (0,1 mm), più cellule di batteri (1-2  $\mu$  di diametro) potrebbero essere impilate nella stessa altezza. La camera di Petroff-Hauser ha una profondità di soli 0,02 mm e risulta più adatta alla conta diretta dei batteri. Il fattore di moltiplicazione corrispondente è  $20 \times 10^6$ .

I **vantaggi** dei metodi di conta diretti sono:

- ✓ rapidità
- ✓ nei metodi che prevedono essiccamento e colorazione, come il food-film i vetrini possono essere conservati e i risultati letti in seguito
- ✓ costo relativamente contenuto e impiego di attrezzatura minimo
- ✓ usando colorazioni differenziali si possono effettuare conte differenziali.

Gli **svantaggi** sono:

- ✓ difficoltà nell'ottenere campioni rappresentativi
- ✓ imprecisioni nella misurazione del campione
- ✓ possibilità di errori nella preparazione dei vetrini, nella conta e nel calcolo
- ✓ difficoltà o impossibilità nel distinguere cellule vive da cellule morte (usando microscopi a fluorescenza è possibile usare coloranti fluorescenti che colorano in modo differenziale le cellule vive e le cellule morte)
- ✓ possibilità di errori dovuti all'affaticamento dell'analista.



[Torna all'indice](#)

### 3.2 Metodi di conta vitale.

Appropriate diluizioni del campione vengono inoculate in substrati liquidi o solidi. La crescita dei microorganismi (formazione di colonie su substrati solidi o torbidità o formazione di prodotti metabolici in substrati liquidi) permette, unita alla diluizione dalla quale si è ottenuta la crescita, di ottenere una stima del numero di microorganismi vitali presenti nel campione analizzato. La valutazione del numero di cellule è quindi **indiretta**, perché si basa su una manifestazione della crescita.

I **vantaggi** dei metodi di conta indiretti sono:

- ✓ sono (relativamente) precisi
- ✓ permettono la stima del numero di microorganismi vitali
- ✓ possono permettere la conta differenziale di particolari gruppi di microorganismi
- ✓ sono generalmente più sensibili dei metodi di conta diretti

Gli **svantaggi** dei metodi di conta indiretti sono:

- ✓ sono generalmente più lenti dei metodi diretti (risultati in >24h)
- ✓ sono (relativamente) costosi in termini di attrezzature e lavoro

- ✓ esistono problemi legati alla selettività e al recupero di "tutti" i microorganismi vitali.

### **3.2.1 Allestimento delle diluizioni.**

Il campione da esaminare viene opportunamente omogeneizzato (semplicemente agitando o con omogeneizzatore a lame rotanti o di tipo peristaltico nel caso di prodotti solidi) in diluente sterile (generalmente pari a 9 volte il peso o il volume del campione, in caso si tratti rispettivamente di campioni solidi o liquidi). Da questa prima diluizione vengono realizzate, usando tutte le cautele per ottenere una buona omogeneizzazione ed evitare contaminazioni le diluizioni successive: è necessario agitare il recipiente per 25 volte lungo un arco di 30 cm in 7 secondi o agitare su agitatore meccanico (tipo Vortex) per 15 sec. La scelta del diluente è essenziale sia per ottenere una buona dispersione del campione, sia per ottenere un recupero ottimale dei microorganismi. I diluenti più usati sono 0,1% peptone o soluzione di Ringer.

Aliquote delle diluizioni vengono poi usate per inoculare piastre o tubi (rispettivamente per la conta in piastra e per i metodi MPN).

### **3.2.2 Metodi di conta in piastra.**

#### **Inoculo per inclusione.**

1 ml di diluizione-sospensione viene inoculato in una piastra sterile (in genere si utilizzano almeno 2 piastre per diluizione e si inoculano prima le piastre corrispondenti alla diluizione più spinta). Nelle piastre così inoculate viene versato il substrato agarizzato fuso e raffreddato a 46°C, che viene accuratamente omogeneizzato con l'inoculo (per esempio ruotando dolcemente la piastra prima in senso orario e poi in senso antiorario). Dopo che il substrato si è solidificato, le piastre vengono generalmente capovolte (per evitare che la condensa che si forma sul coperchio della piastra cada sulla sua superficie) ed incubate alla temperatura opportuna (in anaerobiosi, se necessario). I microorganismi o gli aggregati di microorganismi così distribuiti nell'agar formeranno colonie visibili a occhio nudo.

#### **Inoculo per spandimento.**

0,1 ml di sospensione diluizione (in genere vengono usate due piastre per diluizione, che vengono inoculate partendo dalla diluizione più spinta) vengono inoculati sulla superficie di un substrato agarizzato distribuito in piastra e distribuiti mediante un etaleur (bacchetta di vetro o plastica piegata a forma di bastone da hockey) sterile o sterilizzato per immersione in alcool e flambatura. Dopo circa 15 min. le piastre vengono capovolte ed incubate alla temperatura opportuna. I microorganismi o gli aggregati di microorganismi così distribuiti sull'agar formeranno colonie visibili a occhio nudo.

**Guida all'interpretazione dei risultati nella determinazione della carica mesofila aerobia (tenore in germi, numero totale delle colonie, SPC = standard plate count, CMS = carica mesofila standard).**

I metodi di conta in piastra possono fornire risultati estremamente riproducibili purchè gli operatori seguano alcune regole nel leggere i risultati e calcolare il numero di microrganismi per g o ml di campione.

**Regola 1.** Una sola piastra con 25-250 colonie.

Nel caso si sia usata una sola piastra per diluizione, scegliere fra le piastre corrispondenti alle varie diluizioni una piastra con 25-250 colonie e contare tutte le colonie, comprese quelle con diametro inferiore a 1 mm, a meno che la piastra in questione non sia esclusa a causa della regola 8. Per ottenere la carica mesofila aerobia moltiplicare il numero di colonie per il fattore di diluizione.

**Esempio:** 35 colonie sulla piastra corrispondente alla diluizione  $10^{-3}$ : carica mesofila aerobia =  $3,5 \times 10^4$  ufc (unità formanti colonie)/ml o g. Vedi anche esempi 1001, 1004, 1011, 1012 nella tabella allegata.

**Regola 2.** 2 piastre per diluizione.

- 2.1 se una sola diluizione presenta entrambe le piastre con un numero di colonie compreso fra 25 e 250, fare la media aritmetica del numero di colonie nelle due piastre e procedere come nella regola 1 (moltiplicare la media per il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione prescelta per ottenere la carica mesofila aerobia). Vedi esempio 1112.
- 2.2 se soltanto una piastra per diluizione ha fra 25 e 250 colonie si calcola comunque la media aritmetica fra il numero di colonie delle due piastre. Differenze marcate fra il numero di colonie in due piastre di una stessa diluizione devono comunque far sospettare errori sperimentali. Vedi esempi 1113, 1115.
- 2.3 se i casi precedenti si verificano in più diluizioni procedere in base alla regola 3.

**Regola 3.** Diluizioni successive (25-250 colonie).

Se piastre in più diluizioni successive hanno fra 25 e 250 colonie calcolare la conta per ogni diluizione come descritto dalla regola 2 e fare il rapporto fra la conta più alta e la più bassa; se tale rapporto è minore di 2 fare la media aritmetica fra le conte (es. 1111); se è maggiore di 2 considerare solo la conta più bassa (es. 1116). La stessa regola vale per analogia se si è usata una sola piastra per diluizione (rispettivamente esempi 1002 e 1003).

**Regola 4.** Tutte le piastre hanno più di 250 colonie.

Scegliere la diluizione con il numero di colonie più vicino a 250 e contare come descritto nelle regole 3 e 7 (1006, 1009, 1120). Riportare il risultato come conta stimata (ufc est/g o ml).

**Regola 5.** Tutte le piastre hanno meno di 25 colonie.

Contare le colonie sulla piastra/e della diluizione meno spinta (a meno che non sia esclusa dalla regola 8) e esprimere il risultato come conta stimata (ufc est/g o ml). Esempi 1007 e 1121.

**Regola 6.** Piastre con nessuna colonia.

Se nessuna piastra presenta colonie e non è stata accertata la presenza di inibitori riportare il risultato come minore (<) di una volta la diluizione meno spinta ed esprimere la conta come conta stimata (es. 1005 e 1122).

**Regola 7.** Piastre con più di 250 colonie.

Scegliere nella piastra della diluizione più spinta aree rappresentative della distribuzione delle colonie, servendosi della quadrettatura presente sul contacolonia:

- a.  $<10$  colonie/cm<sup>2</sup>: contare le colonie in 12 quadratini, scegliendone 6 verticali e 6 orizzontali), fare la media aritmetica e moltiplicare per l'area della piastra in cm<sup>2</sup> (57 cm<sup>2</sup> per una piastra standard in plastica, di diametro 90 mm); esprimere la conta come conta stimata come segue:  $\text{cfu/ml} = N \times A \times D$  dove  $N$ =numero medio di colonie per cm<sup>2</sup>,  $D$ =fattore di diluizione,  $A$ =area della piastra..
- b.  $>10$  e  $<100$  colonie per cm<sup>2</sup>: contare le colonie in 4 quadratini rappresentativi e procedere come in 7a.
- c.  $>100$  colonie/cm<sup>2</sup>: esprimere il risultato come  $>100 \times D \times A$  ufc est/g o ml ( $D$ =fattore di diluizione e  $A$  area della piastra in cm<sup>2</sup>).

**Regola 8.** Spreaders (esempi 1004, 1008, 1010).

Sono chiamati spreaders i microorganismi che formano colonie invadenti o sciamanti. I tipi di spreaders sono:

- a. catene di colonie che si formano per disintegrazione di un aggregato di microorganismi durante l'omogeneizzazione dell'inoculo o la sua distribuzione sul substrato. L'intero gruppo di colonie va contato come un'unica colonia.
- b. colonie invadenti che occupano un'area considerevole della piastra perchè formate da microorganismi mobili o che crescono sul velo liquido che si forma sulla superficie del substrato o ai margini della piastra. Se gli spreaders e l'eventuale area di inibizione occupano più di metà della piastra la piastra non è contabile: indicare spreaders nelle tabelle di conta. Altrimenti contare le colonie nell'area libera da spreaders come descritto dalla regola 7. Indicare il risultato come ufc spr/g o ml.

Una variazione dei metodi di conta in piastra è costituita dai metodi di conta su membrana. Infatti, il limite principale dei metodi di conta in piastra è la scarsa sensibilità (è molto difficile ottenere stime affidabili del numero di microrganismi se esso è inferiore a 10-100 ufc/g o ml di campione. Per liquidi non torbidi (p.es. acqua potabile o acqua di corpi d'acqua superficiali) per i quali è necessario stimare il numero di microrganismi per 100 ml, una quantità appropriata di campione viene filtrata attraverso una membrana sterile da 0,45 micron da 47 mm di diametro, recante una quadrettatura (che faciliterà la conta delle colonie dopo l'incubazione). La membrana viene poi posta sulla superficie del substrato (agarizzato o imbevuto in un tampone di cartone) ed incubata nelle condizioni opportune.

Inoltre, sono state sviluppate diverse procedure per facilitare o rendere più rapido il processo di diluizione ed inoculo (Spiral Plating, Petri Film, etc.).



[Torna all'indice](#)

### 3.2.3 Metodi di conta in substrato liquido: MPN (Most Probable Number).

La tecnica MPN è basata sulla frequenza dell'occorrenza di una serie di risultati positivi (crescita) in tubi inoculati con diluizioni successive del campione quando un determinato numero di microorganismi è presente nel campione.

Questa stima è ottenuta preparando diluizioni decimali del campione e insemenzando 3 o 5 tubi (o un numero maggiore) di substrato per diluizione. Dal numero di tubi positivi in 3 diluizioni successive, servendosi di apposite tabelle (tabb. 18 e 19) è possibile ottenere una stima indiretta del numero più probabile di microorganismi presenti nel campione. E' da sottolineare che, a differenza della conta in piastra, il numero che si ottiene è derivato da elaborazioni statistiche e non da, per esempio, il numero di colonie effettivamente contate. Questo rende il metodo MPN meno preciso dei metodi di conta in piastra (accuratezza oltre 8 volte inferiore nel metodo MPN con 5 tubi per diluizione rispetto alla conta in piastra con 2 piastre per diluizione). La precisione aumenta con il numero di tubi inoculati per diluizione. Uno dei vantaggi del metodo MPN è tuttavia la possibilità di impiegare volumi di inoculo notevolmente superiori a quelli utilizzati nelle conte in piastra (fino a 10 ml; raramente di più) permettendo di ottenere una stima del numero di microorganismi anche se questo è estremamente basso. Per ottenere risultati più attendibili è preferibile che in almeno una diluizione tutti i tubi siano positivi e che in una o più di una tutti i tubi siano negativi.

Il calcolo del numero più probabile di microorganismi viene ottenuto con la procedura esemplificata di seguito:

Diluizioni				
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	
+++	+++	+--	---	numero dei tubi positivi e negativi per ciascuna diluizione

1. riportare il **numero di tubi positivi per ogni diluizione** come descritto dall'esempio.
2. individuare la **diluizione limite**: è l'ultima diluizione, se esiste, con tutti i tubi positivi. Nell'esempio indicato è la diluizione 10<sup>-2</sup>. Se nessuna diluizione ha tutti i tubi positivi, scegliere la diluizione meno spinta.
3. calcolare il **numero caratteristico**: è un numero a tre cifre: la prima cifra è data dal numero di tubi positivi nella diluizione limite (nel nostro esempio 3), la seconda cifra dal numero di tubi positivi nella diluizione immediatamente successiva (1), la terza cifra dal numero di tubi positivi nella diluizione ancora successiva (0). Nel nostro caso il numero caratteristico è 310.
4. usare il numero caratteristico calcolato per ottenere dalle tabelle corrispondenti al numero di tubi per diluizione usato nella conta (nel nostro caso 3 tubi per diluizione, tabella 18) e leggere, in corrispondenza del numero caratteristico l'MPN, la categoria e, se desiderati, i limiti fiduciarî al 95% o al 99%. Nel nostro caso l'MPN è 4, la categoria A e i limiti fiduciarî al 95% 2 e 29.
5. calcolare l'MPN per g o ml moltiplicando il dato ricavato dalla tabella per il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione limite: nel nostro esempio la diluizione limite è 10<sup>-2</sup>, il fattore di diluizione è 100, quindi l'MPN per g o ml è 400.



[Torna all'indice](#)

#### 4 Esercizi.

##### 4.1 Calcolo del fattore di diluizione.

Calcolare il fattore di diluizione per i seguenti piani di diluizione:

- 1 g di campione in 99 ml; 1 ml della diluizione ottenuta in 99 ml; 1 ml inoculato in piastra per inclusione. (risposta:  $D=10^4$ )
- 10 g di campione in 90 ml, 1 ml della diluizione ottenuta in 9 ml; 0,1 ml inoculati in piastra in superficie.  $D=.....$
- 5 ml di campione in 45 ml di diluente; 1 ml della diluizione ottenuta in 99 ml di diluente; 1 ml della diluizione ottenuta in 99 ml; 0,1 ml inoculati in piastra in superficie.  $D=.....$
- 0,1 ml di campione in 100 ml di diluente; 0,1 ml della diluizione ottenuta in 10 ml di diluente; 0,01 ml inoculati in piastra in superficie.  $D=.....$

4.2 Per le seguenti conte in piastra indicare le u.f.c./ml (si tratta di un campione liquido) seguendo strettamente le regole per il calcolo della carica mesofila aerobia

Diluizione				u.f.c./ml
$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	
-/	200/210	20/21	2/3	$2.0 \times 10^5$
-/	300/315	36/40	3/5	.....
20/18	2/1	0/0	-/	.....
240/220	52/50	3/6	-/	.....
-/	-/	800/900	260/280	.....
-/	-/	180/160	15/spr.	.....
-/	210/270	26/23	-/	.....
-/	-/	650/600	-/	.....
24/28	3/5	-/	-/	.....
-/	-/	320/280	40/50	.....

4.3 Per i seguenti risultati, determinare diluizione limite, numero caratteristico, categoria, MPN e limiti fiduciarci al 95%.

	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1.	+++	---	---	---
2.	+++	+++	--+	---
3.	+++	+++	+-	---
4.	+++	+-	---	---
5.	+++	---	+--	---
6.	+-	---	---	---
7.	+++	+++	+++	---
8.	+--	+--	---	---
9.	+++	+--	+--	---
10.	+-	+-	---	---
11.	+++++	++++-	+----	-----
12.	+++++	++++-	-----	-----
13.	++++-	---++	-----	-----
14.	+++++	+++++	+----	-----
15.	+++++	++++-	+++--	-----

	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
16.	+++++	+++++	++---	+----
17.	++++-	+----	+----	-----
18.	+++++	+++++	+++++	++---
19.	+++++	+++--	++---	-----
20.	+----	-----	-----	-----

	dil. lim.	n. car	cat.	MPN/g	limiti fiduciari 95%
1.	$10^{-1}$	300	A	$2,3 \times 10^1$	$0,7-12,9 \times 10^1$
2.	.....				
3.	.....				
4.	.....				
5.	.....				
6.	.....				
7.	.....				
8.	.....				
9.	.....				
10.	.....				
11.	.....				
12.	.....				
13.	.....				
14.	.....				
15.	.....				
16.	.....				
17.	.....				
18.	.....				
19.	.....				
20.	.....				

## **Allegato 1**

### **Procedimento per l'esercitazione 3.**

Lavorare in gruppi di 4.

1. **Addestramento alla conta con camera di conta.**

Verranno fornite delle sospensioni di cellule di lievito. Servendosi della camera di Thoma determinare il numero totale di cellule (N.B. contare le cellule gemmanti come 1 cellula)

2. **Uso di diversi metodi per la valutazione della crescita.**

Sarà allestita una curva di crescita di *Saccharomyces cerevisiae* e una di *Escherichia coli*. Sulla prima dovrà essere determinata l'assorbanza a 600 nm e il numero di cellule totali con camera di Thoma. Sulla seconda dovrà essere determinato il numero di cellule mediante conta per inclusione e (solo per alcuni campioni) per MPN, oltre all'assorbanza. Gli studenti devono ricostruire graficamente le curve di crescita e commentarle brevemente. Quando possibile deve essere determinata la velocità specifica di crescita e il tempo di generazione medio in fase esponenziale.

**Allegato 2.****Risposte per gli esercizi 4.1-4.3****4.1**1.  $10^4$ ; 2.  $10^3$ ; 3.  $10^6$ ; 4. 10110100**4.2**

	Diluizione			u.f.c./ml
$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	
-/	200/210	20/21	2/3	$2,0 \times 10^5$
-/	300/315	36/40	3/5	$3,8 \times 10^5$
20/18	2/1	0/0	-/	$1,9 \times 10^3$ est.
240/220	52/50	3/6	-/	$2,3 \times 10^4$
-/	-/	800/900	260/280	$2,7 \times 10^7$ est.
-/	-/	180/160	15/spr.	$1,7 \times 10^6$
-/	210/270	26/23	-/	$2,4 \times 10^5$
-/	-/	650/600	-/	$6,3 \times 10^6$ est.
24/28	3/5	-/	-/	$2,6 \times 10^3$
-/	-/	320/280	40/50	$4,5 \times 10^6$

**4.3**

	dil. lim.	n. car	cat.	MPN/g	limiti fiduciarci 95%
1.	$10^{-1}$	300	A	$2,3 \times 10^1$	$0,7-12,9 \times 10^1$
2.	$10^{-2}$	310	A	$4,0 \times 10^2$	$2-21 \times 10^2$
3.	$10^{-2}$	320	A	$9,0 \times 10^2$	$3-39 \times 10^2$
4.	$10^{-1}$	320	A	$9,0 \times 10^1$	$3-39 \times 10^1$
5.	$10^{-1}$	301	A	$4,0 \times 10^1$	$1-18 \times 10^1$
6.	$10^{-1}$	200	A	9,0	$0,2-3,8 \times 10^1$
7.	$10^{-2}$	330	A	$2,0 \times 10^3$	$1-14 \times 10^3$
8.	$10^{-1}$	110	A	7,0	$0,2-2,8 \times 10^1$
9.	$10^{-1}$	311	A	70	$2-28 \times 10^1$
10.	$10^{-1}$	220	A	21	$0,8-6,3 \times 10^1$
11.	$10^{-1}$	531	A	110	$4-30 \times 10^1$
12.	$10^{-1}$	540	A	130	$5-39 \times 10^1$
13.	$10^{-1}$	320	A	14	$0,6-3,5 \times 10^1$
14.	$10^{-2}$	510	A	300	$1-12 \times 10^2$
15.	$10^{-1}$	543	B	280	$13-70 \times 10^1$
16.	$10^{-2}$	521	A	700	$3-21 \times 10^2$
17.	$10^{-1}$	411	A	21	6-55
18.	$10^{-2}$	552	A	$5 \times 10^3$	$2-20 \times 10^3$
19.	$10^{-1}$	532	A	140	60-360
20.	$10^{-1}$	100	A	2	<1-11