

METODI COLTURALI

- Metodi ampiamente utilizzati per l'analisi microbiologica degli alimenti.
- Validazione di tecniche moderne (immunogenetiche, genetiche,..) ⇒ concordanza con le tecniche colturali classiche

STEP FONDAMENTALI

1. Miscelamento del campione con substrato liquido o agarizzato;
2. Incubazione della miscela in condizioni adatte
3. Sviluppo del microrganismo
4. Formazione di colonie o di reazioni chimiche

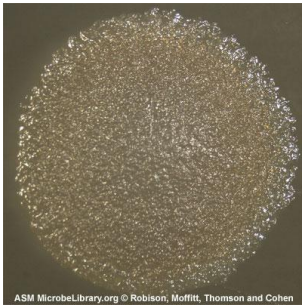
PASSAGGIO CHIAVE:

Coltivazione del microrganismo in analisi

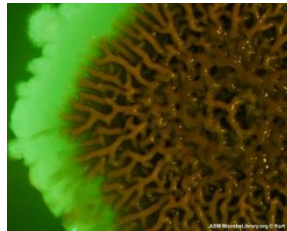
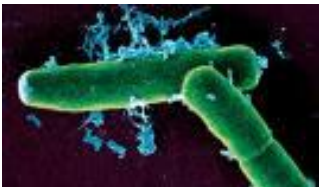
SUBSTRATO AGARIZZATO

Osservazione visiva delle piastre $\Rightarrow$ *morfologia delle colonie*

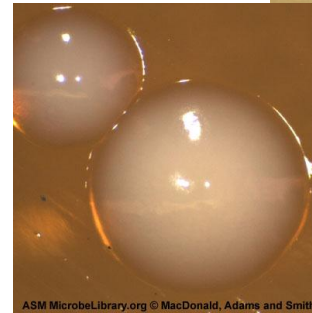
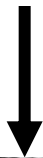
Osservazione microscopica delle colonie $\Rightarrow$ *morfologia delle cellule*



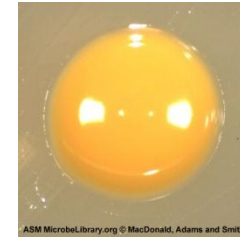
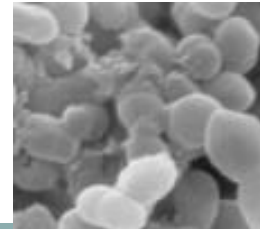
Bacillus anthracis



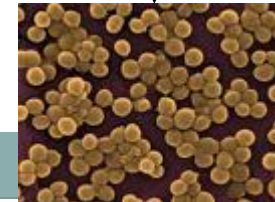
Bacillus subtilis



Lactobacillus plantarum



Staphylococcus aureus



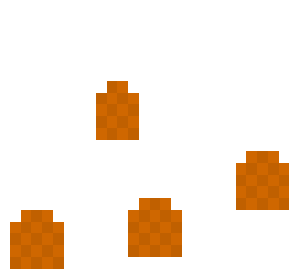
Salmonella



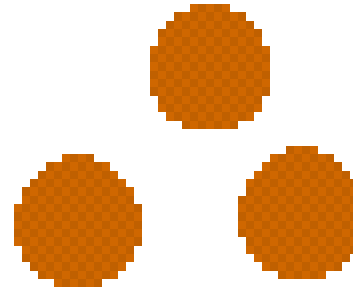
Osservazione delle colonie

a) forma

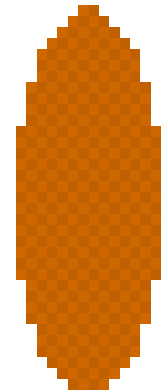
- 1) puntiforme
- 2) rotonda
- 3) lenticolare
- 4) concentrica
- 5) irregolare ed invadente
- 6) rizoide
- 7) filamentosa
- 8) forma L
- 9) filiforme
- 10) complessa



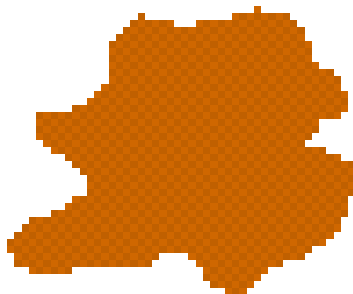
puntiforme



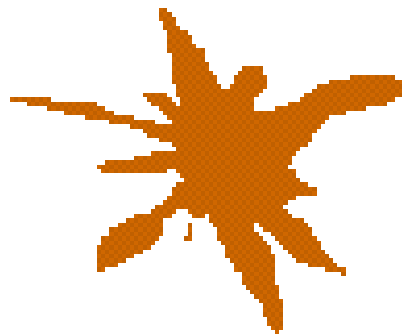
rotonda



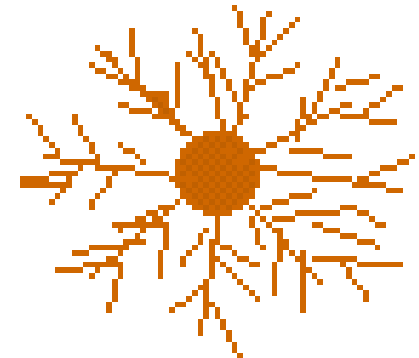
lenticolare



irregolare



rizoide

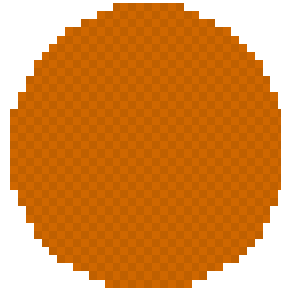


filamentosa

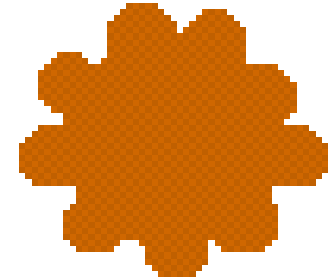
b) dimensione (espressa in mm)

c) margine

- 1) liscio (intero)
- 2) ondulato
- 3) lobato
- 4) irregolare
- 5) cigliato
- 6) con ramificazioni
- 7) lanoso
- 8) filiforme
- 9) a riccioli.



intero



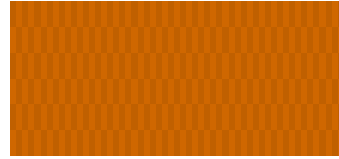
ondulato

d) superficie

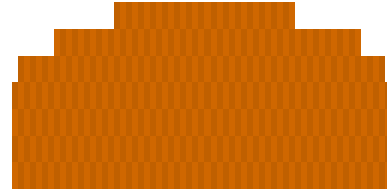
- 1) liscia, lucida
- 2) rugosa
- 3) opaca
- 4) secca, polverosa

e) profilo

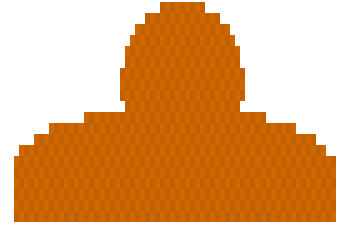
- 1) piatto
- 2) pulvinato
- 3) convesso
- 4) a goccia
- 5) umbonato
- 6) irregolare
- 7) infossato nel mezzo
- 8) crateriforme



piatto



convesso



umbonato

f) colore

- 1) presenza di pigmento solubile nel substrato
- 2) presenza di pigmento insolubile nel substrato.

g) opacità

- 1) trasparente
- 2) traslucida
- 3) opaca

h) consistenza

- 1) butirrosa
- 2) viscida
- 3) granulare

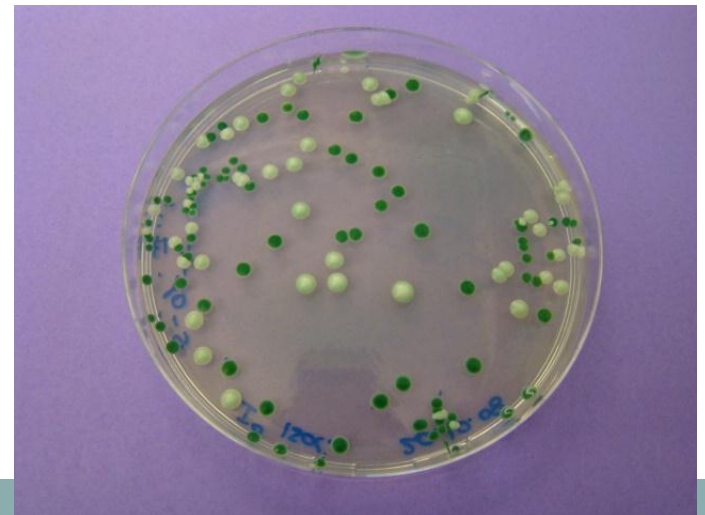
i) emulsificabilità:

facile o difficile in acqua

- 1) forma o no sospensioni uniformemente torbide
- 2) forma sospensioni granulari
- 3) non emulsificabile.

l) Odore

penetrante o assente: identificare se possibile



SUBSTRATO LIQUIDO

Analisi delle reazioni tipiche del microrganismo o della popolazione microbica in studio

Esempio: fermentazione in substrato liquido



Mezzo liquido contenente lo zucchero test e un indicatore di pH (bromo cresol porpora)

No fermentazione

Sì fermentazione. Produzione di acido $\Rightarrow$ diminuzione del pH e viraggio del colore verso il giallo

Produzione di gas visibile nelle campanelle di Durham e sotto forma di bolle

Tecniche colturali usate per:

1. Arricchimento;

2. Conta;

3. Isolamento

Arricchimento

❖ Il microrganismo in esame non può essere rilevato mediante piastramento diretto dell'alimento

❖ Rivitalizzazione nel campione di cellule stressate (cellule danneggiate subletalmente).

Coltivazione in un substrato liquido non selettivo
(*pre-arricchimento o arricchimento primario*)



Coltivazione in un substrato liquido selettivo
(*arricchimento selettivo o arricchimento secondario*)

Arricchimento primario $\Rightarrow$ no condizioni che portano ad un rapido sviluppo del microrganismo $\Rightarrow$ No utilizzo di:

- mezzi colturali ricchi;
- condizioni di incubazione che favoriscono un rapido sviluppo.

Incremento di tutta la popolazione microbica

Arricchimento secondario $\Rightarrow$ trasferimento di parte del substrato di pre-arricchimento in substrato selettivo o selettivo-differenziale $\Rightarrow$

- Svilupperanno solo i microrganismi di interesse
- Lo sviluppo di altri microrganismi è inibito.

Conta

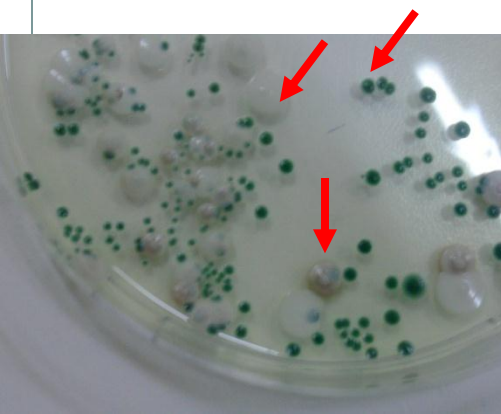
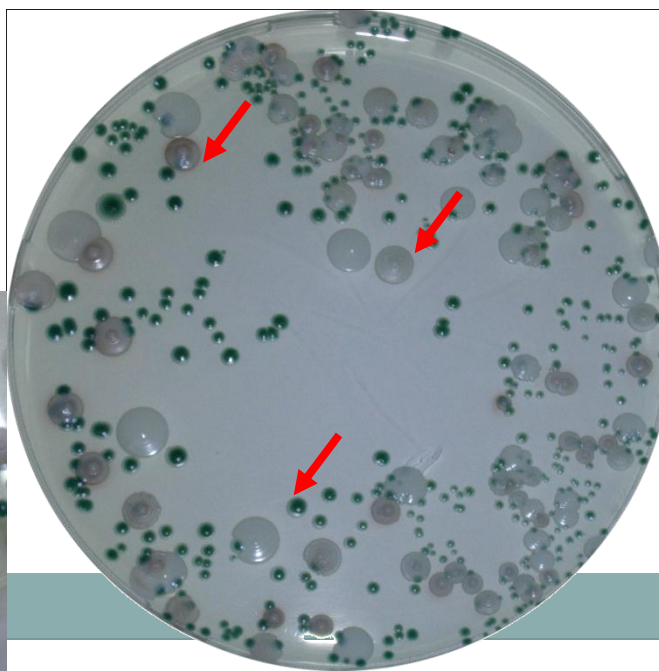
- ❖ Una delle tecniche colturali più utilizzate
- ❖ Utilizzo di substrati:
 - ❖ Selettivi
 - ❖ Non selettivi
- ❖ Osservazione e conta delle colonie

Isolamento

Il campione, con o senza arricchimento, è piastrato su un apposito mezzo selettivo o selettivo-differenziale.

La coltivazione su questi substrati è il metodo più adatto per isolare un microrganismo target

Isolamento



Metodi di conta microbica

- Esistono differenti metodiche per la determinazione quantitativa dei microrganismi:
- tecniche colturali e non colturali
- conta diretta ed indiretta
- il tipo di microrganismo/i ed il tipo di campione possono necessitare di specifiche tecniche

Metodi per la valutazione della crescita microbica

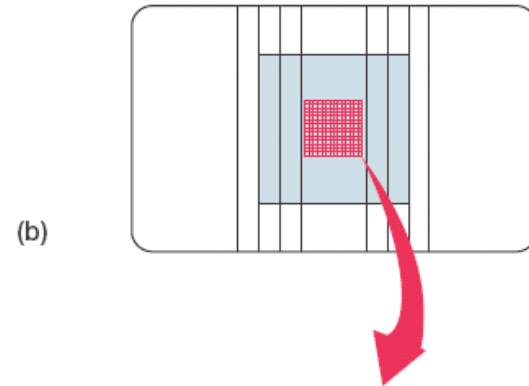
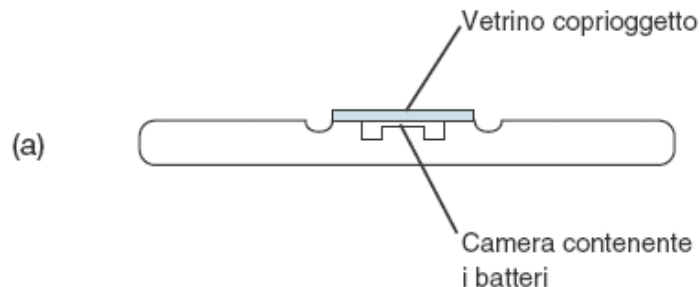
1. **Metodi di conta diretti:** con l'ausilio di microscopi vengono visualizzate e contate direttamente le cellule usando:
 - a. camere di conta o filtri o vetrini speciali;
 - b. con coloranti fluorescenti (fluoresceina) è possibile contare separatamente cellule vive e cellule morte (DEFT)
 - c. con sonde oligonucleotidiche marcate con coloranti fluorescenti (FISH) è possibile contare gruppi diversi di microrganismi
2. **Metodi di conta indiretti:** i microrganismi vitali vengono contati sulla base di una manifestazione visibile della crescita:
 - a. in tubo (metodo MPN): torbidità, viraggio indicatori, etc.
 - b. su agar (formazione di colonie)

Metodi di conta diretti: le camere di conta

zona incavata delimitata da un vetrino a facce perfettamente piane e parallele
2 aree di conta di dimensioni note, suddivise in quadrati

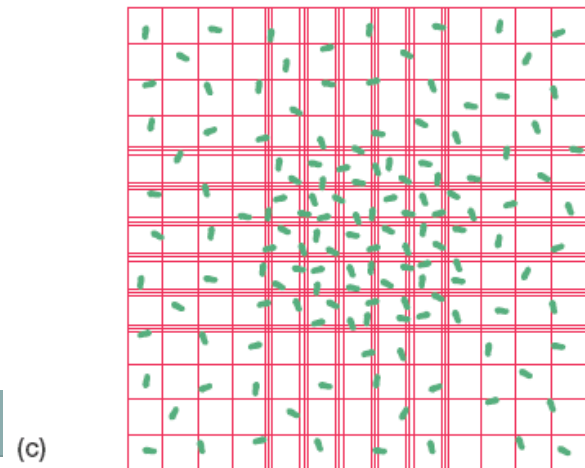
Profondità 0,1 mm = Thoma (lieviti 10-50 μm)

Profondità 0,02 mm = Petroff-Hauser (batteri 1-2 μm)



La camera di Thoma non è adatta a contare batteri perché troppo profonda e le cellule tendono a sovrapporsi.

la camera di Petroff-Hauser è profonda 1/5 della camera di Thoma)

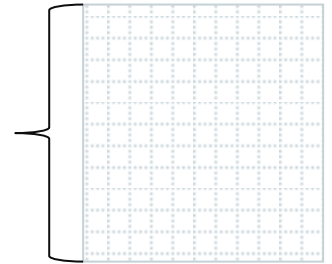


Metodi di conta diretti: le camere di conta

Ogni area di conta presenta

- quadrato di 1 mm di lato
- ogni lato è diviso in 20 quadratini ciascuno di lato 0,05mm
- ogni quadratino ha una superficie di 0.0025 mm^2
- la profondità della camera è pari a 0,1mm
- volume occupato dalla sospensione di cellule che sovrasta un quadratino piccolo è $0,00025 \text{ mm}^3$ che in ml sarebbe $1/4\ 000\ 000$

1mm
20 quadratini



Fattore di conversione necessario per riportare il volume delimitato da 1 quadratino ad 1 ml

4×10^6 Thoma

20×10^6 Petroff-Hauser

Metodi di conta diretti: le camere di conta

PROCEDURA

1. un appropriata diluizione del campione viene posta sulla camera e coperta con apposito vetrino coprioggetto;
2. La camera viene osservata al microscopio;
3. Si comincia a contare dal primo quadratino in alto a sinistra e si contano in maniera alternata 25 o 10 quadratini
4. Le gemme si contano come se fossero già cellule singole solo se sono più grandi della metà della cellula madre;
5. Il risultato si esprime come n di cellule contate/ml con la seguente formula:

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

4×10^6 = Fattore di conversione Thoma

D= fattore di diluizione (considera la diluizione effettuata sul campione es. campione diluito 10 volte $D=10$)

N= numero di cellule contate

Q= numero di quadratini contati

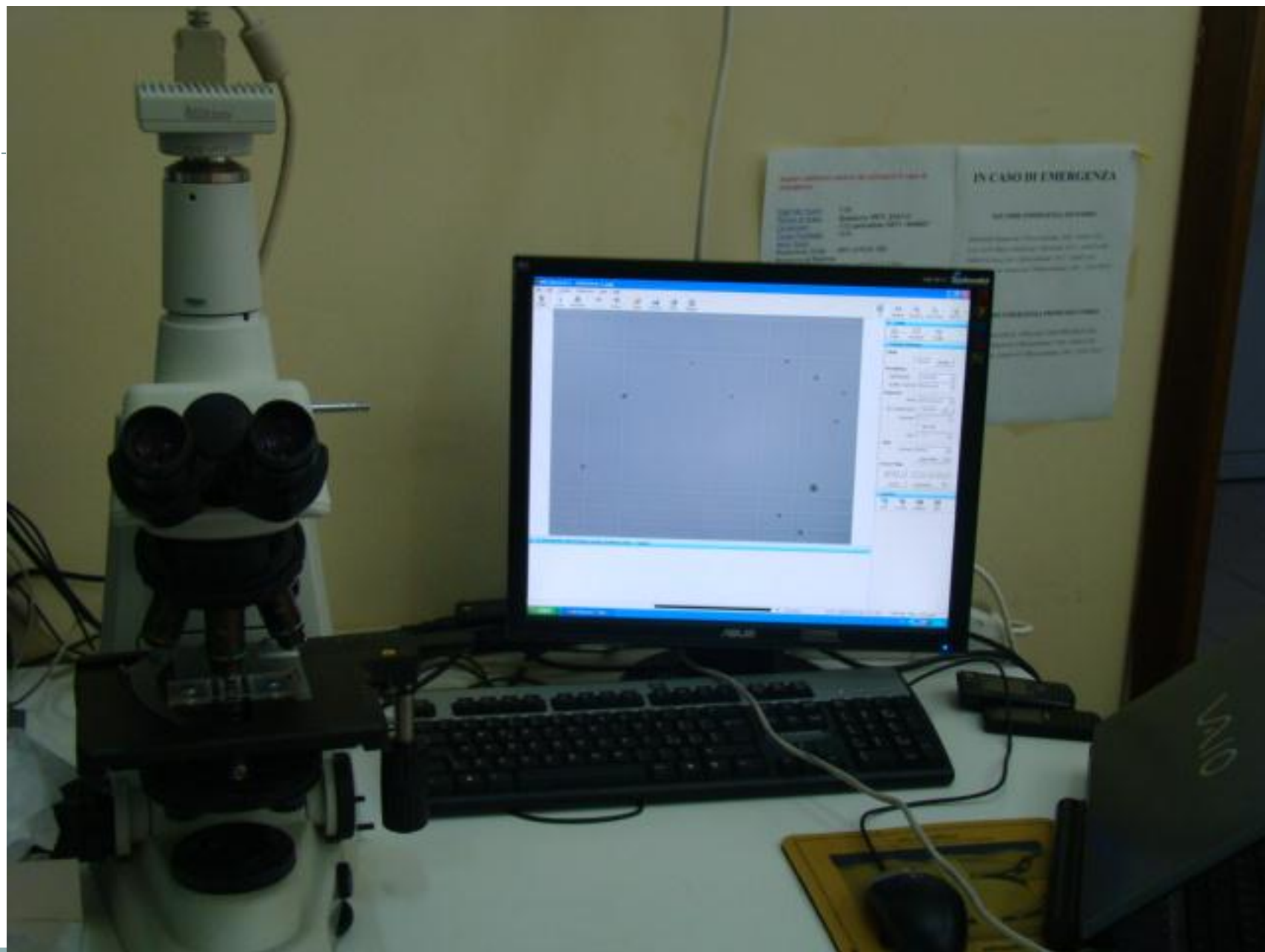
Vantaggi e svantaggi delle camere di conta

Vantaggi

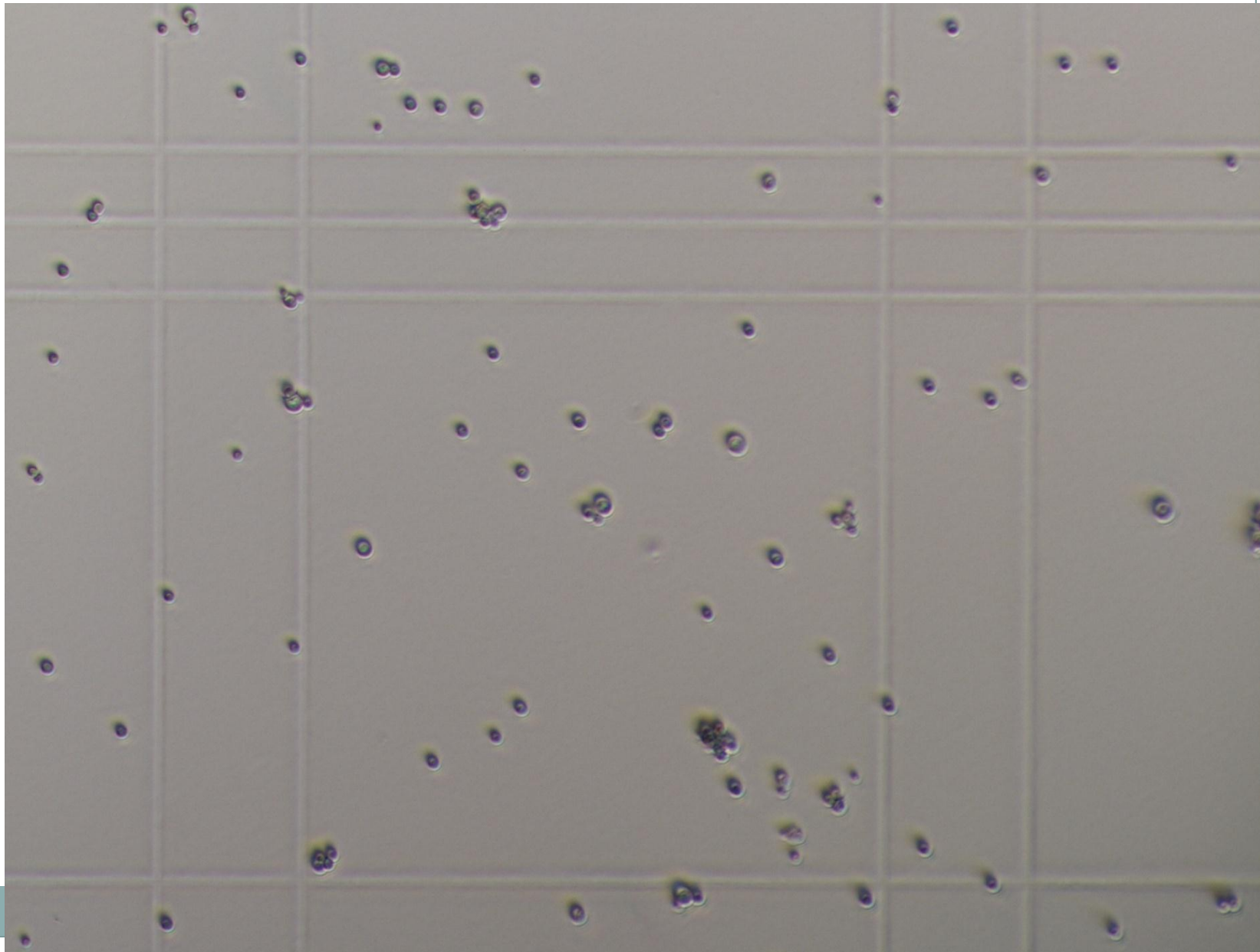
- è un metodo rapido e poco costoso

Svantaggi

- è un metodo poco sensibile (già con 1×10^6 cellule/ml solo poche cellule sono visibili in ogni campo)
- non è possibile distinguere cellule vive da cellule morte
- l'affaticamento degli operatori può causare errori
- è difficile da automatizzare
- è praticamente impossibile contare selettivamente determinati gruppi di microrganismi



Camera di Thoma: campione troppo concentrato 10^{-1}

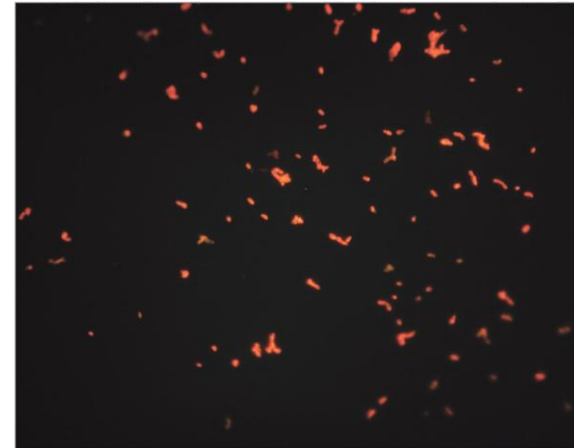
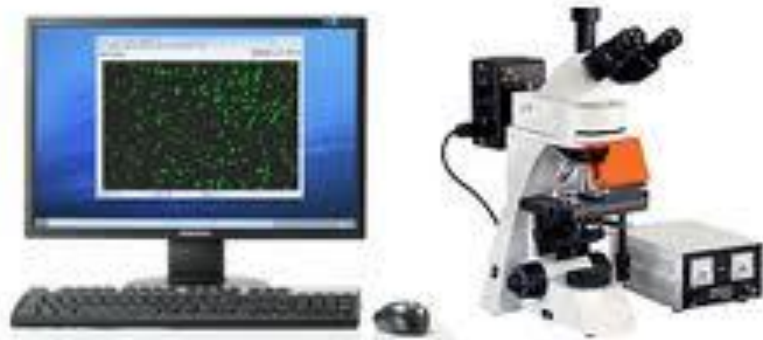


Metodi di conta diretti alternativi

DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique)

- il liquido contenente i microrganismi viene filtrato su una membrana, che trattiene le cellule (concentrazione microrganismi e aumento della sensibilità).
- Aggiunta sul filtro di un substrato fluorescente il diacetato di fluoresceina: idrolisi ad opera delle esterasi intracellulari delle cellule vive $\Rightarrow$ fluoresceina o arancio di acridina $\Rightarrow$ fluorescenza
- osservando in epifluorescenza è possibile distinguere **cellule vive e morte**, che assumono colori diversi:
 - Cellule vitali colorate di arancio/rosse (RNA)
 - Cellule morte colorate di verdi (DNA)

- **Vantaggi:**
 - Rapidità di esecuzione
 - Buona sensibilità (1- 10.000 UFC/ml)
 - Buona x conte totali e lieviti e muffe
- **Svantaggi:**
 - aspecificità conte, ci sono limitate possibilità di eseguire conte selettive

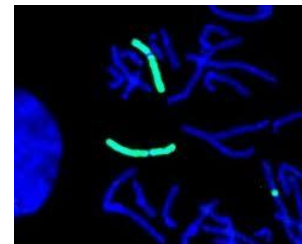


**Batteri colorati con
arancio di acridrina**

Metodi di conta diretti alternativi

FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization).

- Ibridazione in situ, senza estrazione, di acidi nucleici con sonde marcate con fluorofori.
- Osservazione al microscopio a fluorescenza dell'avvenuta ibridazione.
- Target molecolare: RNA ribosomale.
- rRNA presente in molte copie in cellule vive, degradazione con la morte cellulare: tecnica usata per evidenziare cellule vive.
- Usando coloranti fluorescenti legati a sonde oligonucleotidiche specifiche è possibile eseguire conte selettive
- È possibile contare anche microrganismi non coltivabili (VBNC)



Metodi di conta indiretti

CONTA VITALE: valuta il numero di cellule batteriche VITALI cioè in grado di dividersi e dare origine a due cellule figlie e, successivamente, a colonie batteriche.

- Risultato di una conta microbica espresso per unità di volume (ml) o di peso (g) a seconda che la matrice sia liquida o solida.
- La conta viene effettuata sempre su un campione liquido, poiché anche il campione solido prima dell'analisi viene sospeso in un diluente.
- Sia per solidi che per liquidi la prima operazione è la diluizione della matrice, realizzata con un diluente.

Perché diluire?

Conta in piastra: è possibile contare in modo riproducibile solo piastre contenenti fra 25 e 250 colonie.

- se il campione è solido deve essere omogeneizzato in diluente e diluito fino a quando l'aliquota che si intende piastrare non contiene il numero di colonie desiderato.
- se il campione è liquido è necessario diluire fino a quando l'aliquota che si intende piastrare non contiene il numero di colonie desiderato.

SCELTA DEL DILUENTE

Diversi diluenti sono stati proposti per la preparazione della diluizione madre di un campione alimentare.

La scelta del diluente è una fase molto importante dell'analisi, in quanto diluenti non adatti, come ad esempio l'acqua, possono causare danneggiamenti delle cellule microbiche, con conseguente sottostima del numero di microrganismi.

Il diluente più utilizzato è la soluzione sale-peptone (0,85% NaCl + 0,1% peptone).

Speciali diluenti possono essere necessari per particolari analisi (soluzioni con basso potenziale redox per la numerazione di germi anaerobi o con concentrazioni del 15-20% di NaCl o saccarosio per l'analisi di alimenti con bassa aw).

METODO DI OMOGENEIZZAZIONE DEL CAMPIONE

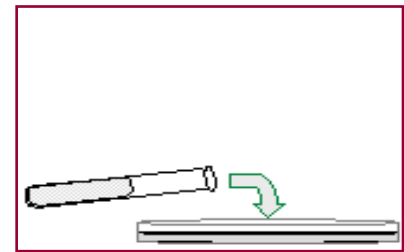
- 1- Per la preparazione dell'omogenato, la sospensione dell'alimento deve essere **omogeneizzata per favorire il passaggio dei microrganismi nel diluente.**
- 2- L'omogeneizzazione deve avvenire in maniera tale da **evitare il danneggiamento delle cellule microbiche.** A tale scopo si utilizza un omogeneizzatore peristaltico a pale (Stomacher) che “massaggia” il campione facilitando la liberazione dei microrganismi dall'alimento.
- 3- **Il tempo di omogeneizzazione** va standardizzato in funzione della natura del campione alimentare. In genere tempi di 1-2 minuti sono ritenuti sufficienti per liberare i microrganismi dalla matrice alimentare senza un loro danneggiamento.

PROCEDURA DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ANALISI

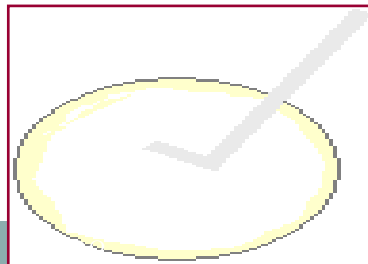
- Il diluente deve avere una temperatura prossima a quella del campione, per evitare danni termici ai microrganismi
- Per campioni alimentari processati (trattamenti termici, congelamento, acidificazione, essiccazione ecc.) preferire un diluente contenente peptone e sale in modo da favorire il recupero di eventuali cellule danneggiate sub-letalmente
- Per facilitare l'omogeneizzazione di campioni alimentari con alto contenuto in grassi (>20%) aggiungere l'1% di una soluzione sterile di un tensioattivo non tossico (es. soluz. 10% Tween 80).
- I campioni congelati vanno fatti scongelare nel loro contenitore di origine mantenendoli per circa 18 ore in frigorifero alla temperatura di +2/+5°C.
- Conservare in condizioni refrigerate la parte in eccesso del campione avanzata dall'analisi per eventuali ulteriori indagini.

Esistono due tecniche **principali** di piastramento (semina delle piastre con aliquote delle diluizioni del campione):

*a) Tecnica per inclusione (o diffusione) dell'inoculo in substrato solidificabile (**Tecnica “Pour Plate”**)*



*b) Tecnica di semina per distribuzione (spatolamento) superficiale dell'inoculo su substrato solido (**Tecnica “Spread plate”**).*



A)

Tecnica per inclusione o diffusione (“Pour Plate”)

Procedura

- il campione viene diluito
- un'aliquota (1ml) viene pipettata in una piastra vuota, alla quale di aggiunge substrato agarizzato fuso e raffreddato (circa 45°C)
- substrato e inoculo vengono accuratamente omogeneizzati e si lascia solidificare su una superficie piana, in modo che i microrganismi rimangano intrappolati nell'agar.
- incubazione alla temperatura opportuna.

Svantaggi

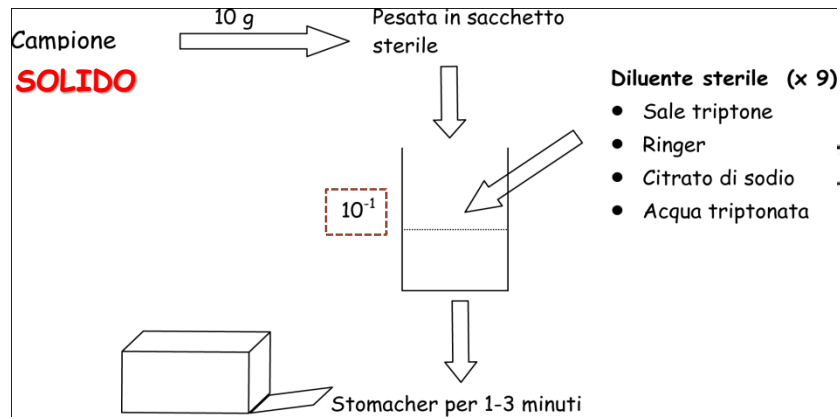
- L'uso di agar a temperatura di 45°C potrebbe danneggiare le cellule di alcuni microrganismi;
- la crescita delle colonie avviene sia in superficie che in profondità e le colonie inglobate nel substrato potrebbero essere difficili da numerare, soprattutto alle diluizioni più basse, dove si possono confondere con le particelle del campione alimentare.

B)

Tecnica per spatolamento superficiale (“Spread Plate”)

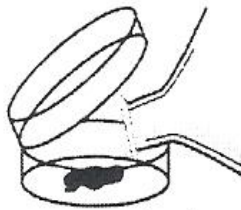
Procedura

- il campione viene diluito
- un'aliquota (0,1ml) viene pipettata sulla superficie del substrato agarizzato precedentemente versato in piastra e solidificato;
- l'inoculo viene distribuito uniformemente sul substrato;
- incubazione alla temperatura opportuna;
- la crescita delle colonie avviene in superficie.
- Tecnica suggerita per i microrganismi aerobi stretti oppure quando si vuole evidenziare la morfologia delle colonie.
- Differenze tra questa tecnica rispetto a quella per inclusione:
 - uso di piastre contenenti il substrato già pronto
 - inoculo con volumi di 0,1 ml di ciascuna diluizione (inoculo in ogni piastra con 1/10 del numero di microrganismi presenti in 1 ml di inoculo) $\Rightarrow$ moltiplicare il n° di UFC/g o ml per un fattore 10.

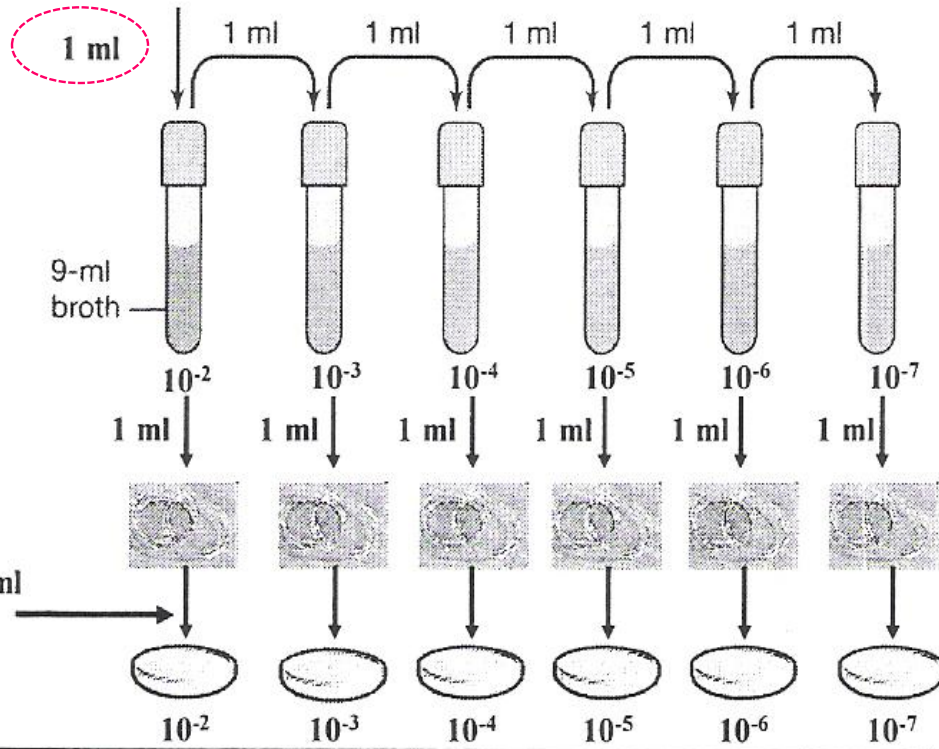


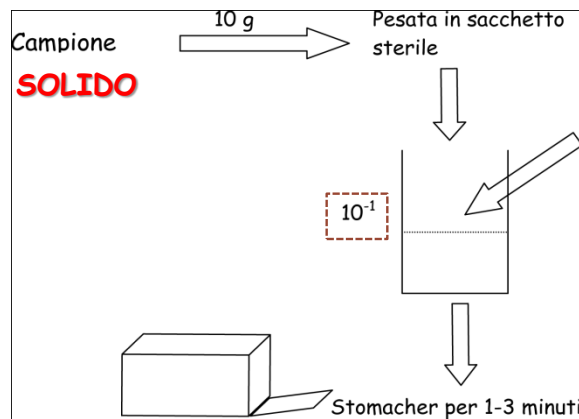
INCLUSIONE

Campione (Tal quale) **LIQUIDO**



Aggiunta di circa 20 ml di substrato liquido





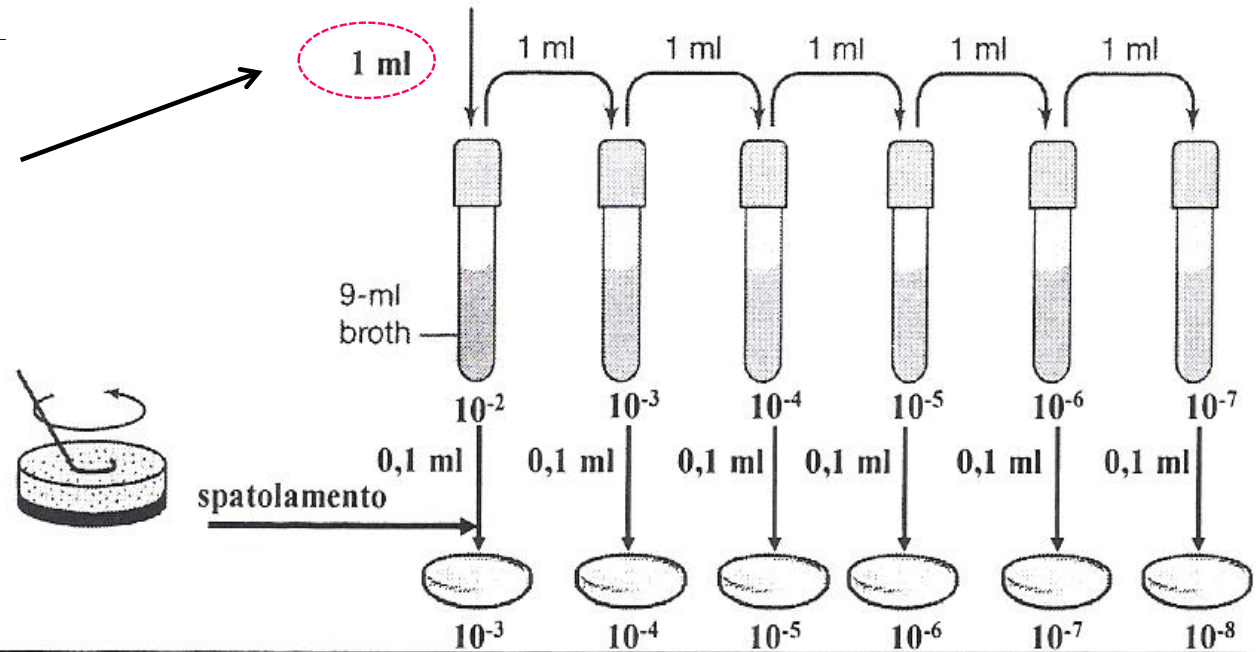
Diluyente sterile (x 9)

- Sale triptone
- Ringer
- Citrato di sodio
- Acqua triptonata

SPATOLAMENTO

Campione (Tal quale)

LIQUIDO



Condizioni di incubazione delle piastre

Le piastre una volta inoculate devono essere incubate capovolte a temperature, tempi e atmosfera gassosa che dipendono dal tipo di popolazione microbica che si vuole numerare.

Temperatura: funzione delle caratteristiche del microrganismo (psicrotrofi, mesofili e termofili)

Tempo : varia in funzione del tipo di microrganismo.

Mesofili: 48-72 ore per dare origine a colonie visibili, psicrotrofici: da 10 a 20 giorni.

Atmosfera gassosa di incubazione, presenza (**aerobiosi**) che assenza di ossigeno (**anaerobiosi**).

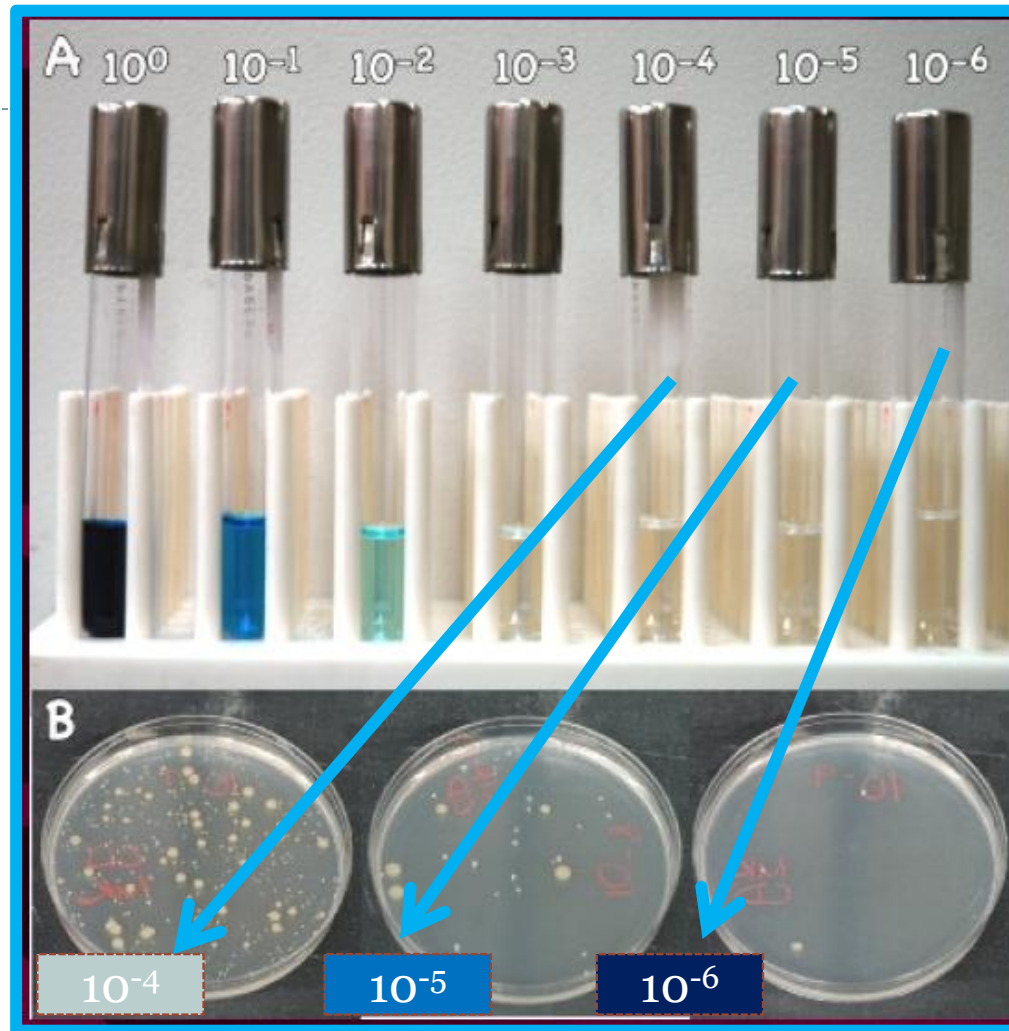
Per l'anaerobiosi: incubare le piastre in una giara dotata di chiusura ermetica, in cui si creano condizioni di anaerobiosi con kit chimici commerciali che sono in grado di creare, nel dato volume della giara e in presenza di un catalizzatore al palladio, un'atmosfera priva di ossigeno, composta da una miscela di idrogeno e anidride carbonica.

Risultati

- si contano le colonie: ogni colonia è derivata da una cellula o da un aggregato di cellule immobilizzato nell'agar
- il numero di colonie viene moltiplicato per il fattore di diluizione

I problemi della conta in piastra

- non tutti i microrganismi vitali sono coltivabili
- in genere è necessario avere fra 25 e 250 colonie per ottenere risultati affidabili
- sono necessarie incubazioni prolungate e, in genere, diverse diluizioni per campione
- una colonia può originarsi da un microrganismo o da un aggregato
- la sensibilità è scarsa (>20 ufc/g o ml per inclusione, >200 ufc/g o ml per spandimento)



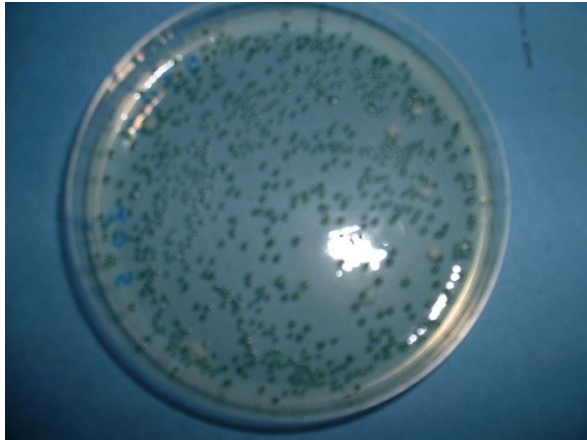
N.B.

**Inoculo per
inclusione :
1ml di
sospensione in
piastra**

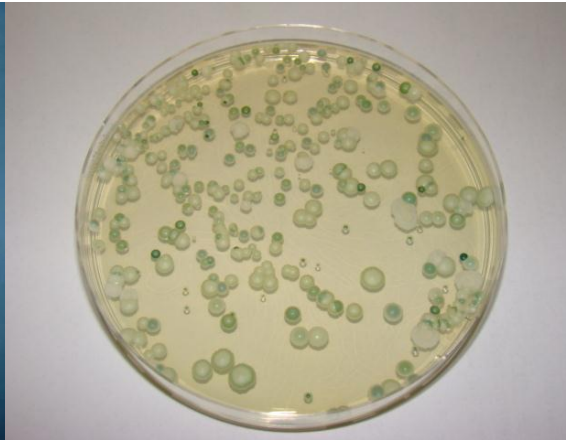


Diluizione di
tubo e piastra
corrispondono

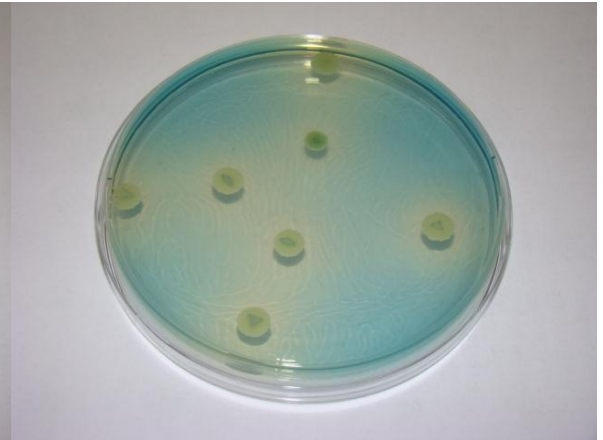
Crescita delle colonie alle diverse diluizioni



10^{-1}



10^{-2}



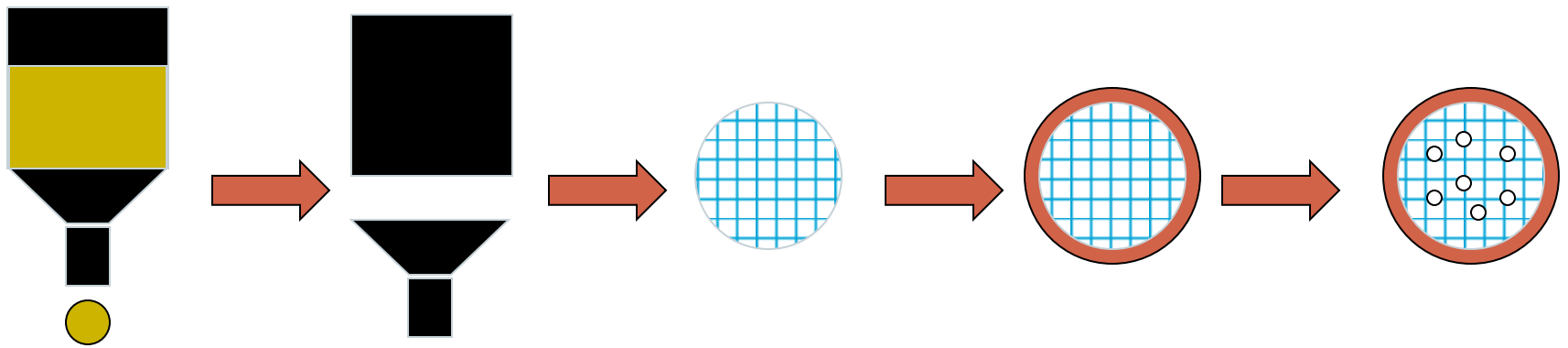
10^{-3}

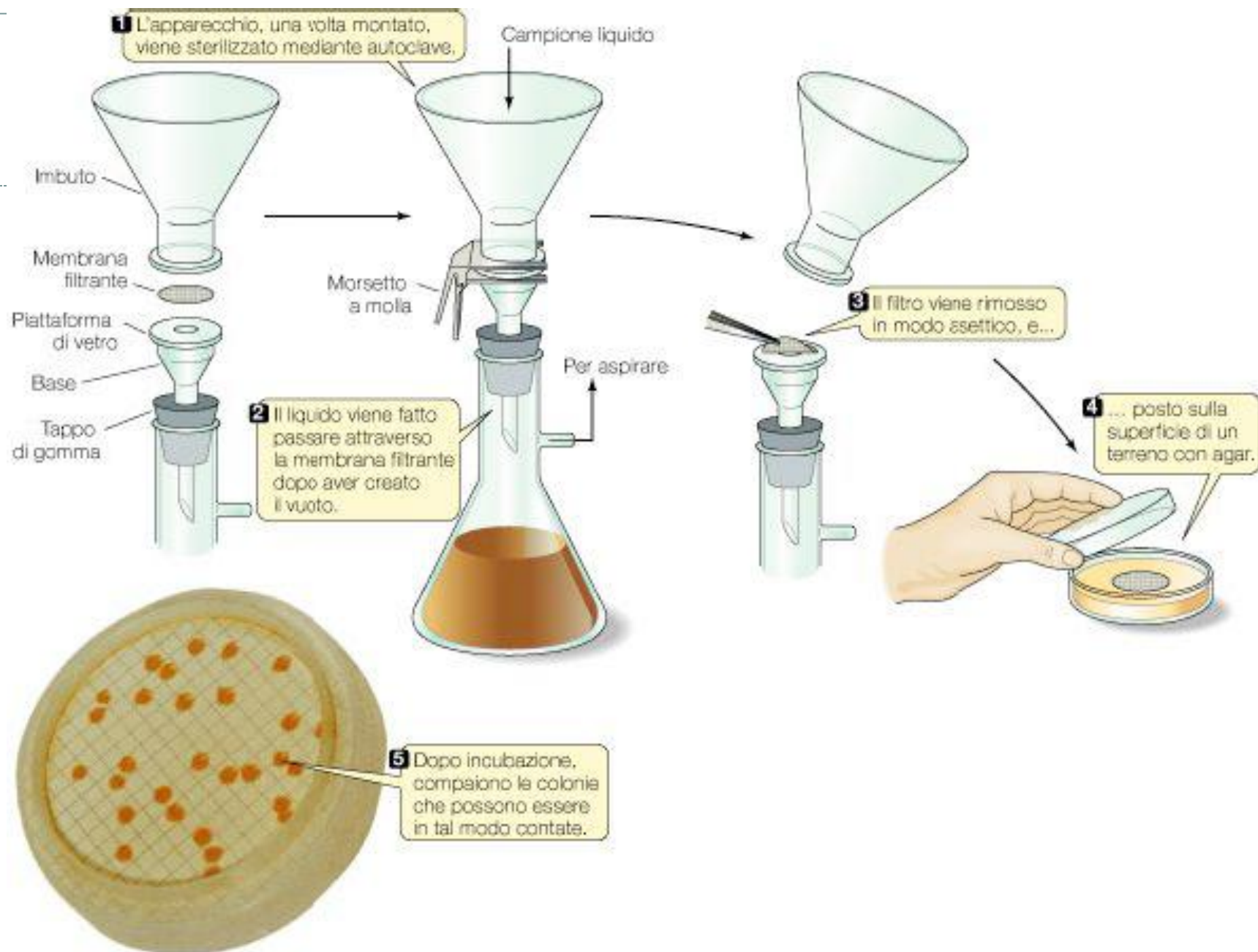
Membrane filtranti

- Metodica utilizzata per l'analisi di campioni liquidi contenenti un basso numero di microrganismi: acque potabili
- Utile per campioni aventi una carica microbica molto bassa: quindi necessario volume elevato del campione
- campioni limpidi (poco concentrati)
- Uso di membrane sterili a porosità inferiore al diametro delle cellule batteriche

Conte su membrana

1. Per la determinazione del numero di microrganismi in acqua è necessario eseguire la conta su volumi elevati (100 ml) di campione.
2. Il campione viene filtrato su una membrana che viene posta su un substrato .
3. Dopo l'incubazione si svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, la cui quadrettatura semplifica la conta.

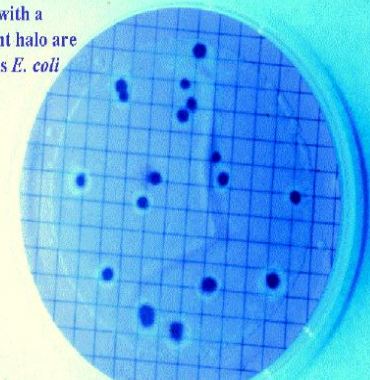






Glass microanalysis holder - 47 mm

Colonies with a
fluorescent halo are
counted as *E. coli*



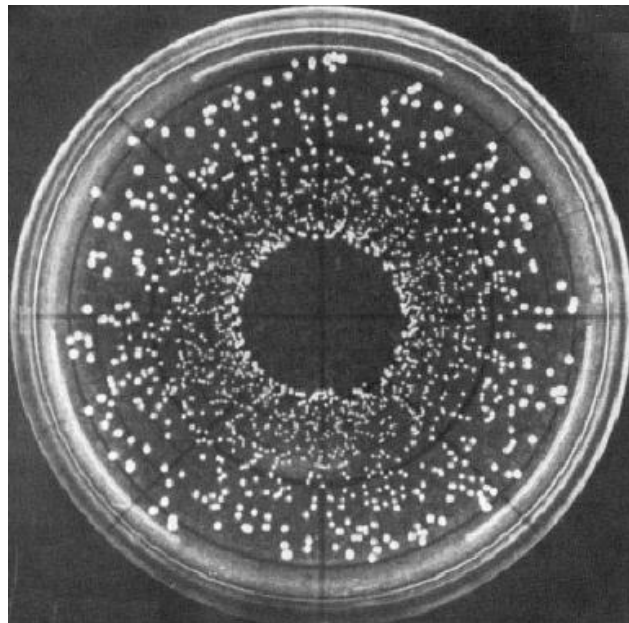
E. coli by NA-MUG following incubation for
total coliforms with mENDO

“Spiral plating method”: Sistema di conta rapida in piastra

Spiral DSPLUS: dispenser controllato da un microprocessore che deposita un campione liquido secondo uno schema a spirale sulla superficie di una piastra agarizzata rotante, muovendosi dal centro della piastra verso l'esterno



Piastra dopo 18-24 h di incubazione



Griglia per il conteggio



le colonie vengono
contate con un
contacolonia laser

Metodo ufficiale dell' APHA (American Public Health Association) e dell'AOAC (Association of Official Analytical Chemists)

$$\text{Carica microbica} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonie presenti su un'area della piastra contabile}}{\text{Volume di campione presente in quell'area}}$$

Possibilità di determinare fino a 4×10^6 cfu/ml, utilizzando piastre Petri di 150 mm.

Ampio utilizzo:

controllo igienico degli alimenti,

analisi di acqua e latte,

analisi mediche, cosmetiche, farmaceutiche

Vantaggi:

Conta batterica rapida: un operatore, con un minimo di manualità, è in grado di inoculare 50 piastre/h senza necessità di effettuare diluizioni preliminari;

Sistema economico, si risparmiano: piastre Petri, agar, pipette

Metodi di conta indiretti: MPN

Metodi di conta in substrato liquido: conta MPN (Most Probable Number: numero più probabile)

- il campione viene diluito
- un'aliquota nota di ciascuna diluizione viene pipettata in tubi contenenti il substrato (dai 3 ai 7 tubi per diluizione)
- il substrato viene incubato (in genere per non meno di 24 h) alla temperatura opportuna
- si individuano i tubi positivi per ogni diluizione (presenza di torbidità, di gas, etc.)
- utilizzando delle tabelle statistiche si determina, dalla combinazione di tubi positivi per le 3 ultime diluizioni, il numero più probabile di microrganismi.

Metodi di conta indiretti: MPN

Metodi di conta in substrato liquido: conta MPN (Most Probable Number: numero più probabile)

La tecnica di conteggio MPN o tecnica di conteggio con tubi multipli, è una procedura di numerazione utilizzata per stimare la densità di una popolazione di microrganismi vitali in un dato campione.

Si tratta di un metodo statistico basato sulla probabilità di rilevare sviluppo microbico dopo coltura in tubi multipli di substrato liquido di diluizioni seriali del campione.

Lo **sviluppo microbico** dopo incubazione dei brodi inoculati può essere valutato osservando eventuale:

- intorbidamento della coltura
- valutando particolari attività metaboliche del microrganismo o della popolazione microbica da numerare (produzione di gas, di acidi ecc.).

Il campione dovrebbe essere diluito in maniera tale che le diluizioni più spinte non presentino microrganismi (**“diluizione all'estinzione”**).

I migliori risultati si hanno quando tutti i tubi inoculati con le diluizioni più basse risultano positivi e tutti i tubi inoculati con le diluizioni più alte risultano negativi.

Per aumentare l'accuratezza statistica dell'MPN è necessario inoculare con ciascuna diluizione del campione più tubi di brodo nutritivo.

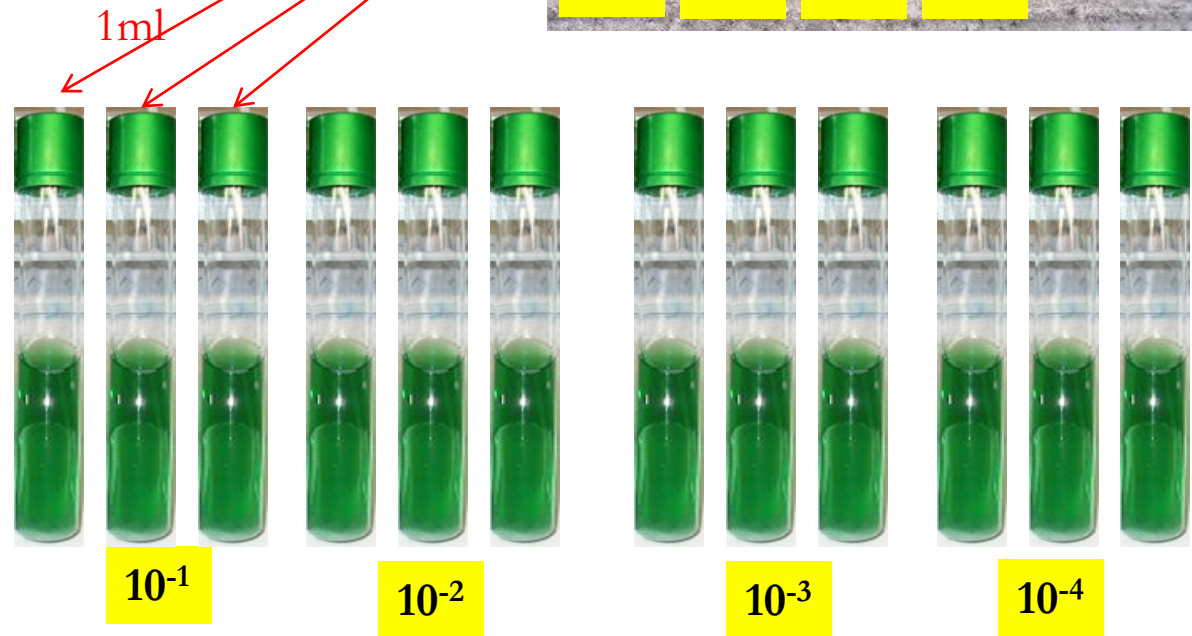
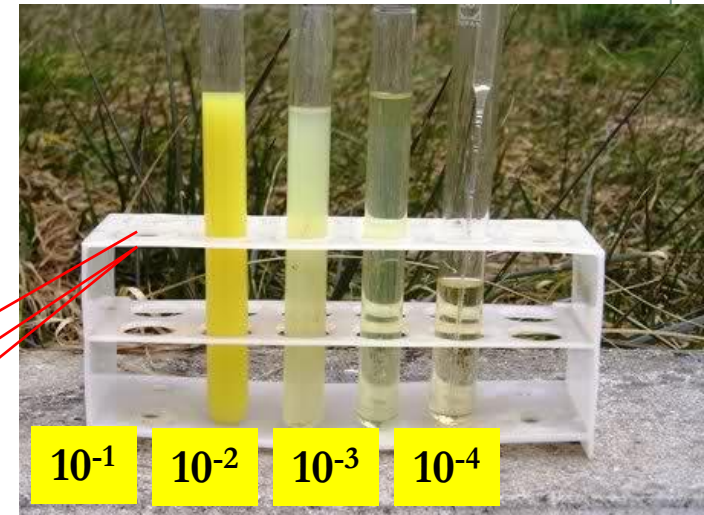
Le procedure standard per la determinazione dell'MPN usano un minimo di 3 diluizioni e 3, 5 o 10 tubi di brodo inoculati con ciascuna diluizione.

La stima del MPN/ml o g di campione é letta su apposite tavole MPN in base al numero di tubi positivi per ciascuna serie inoculata con una data diluizione.

Esistono tavole MPN per inoculi di 3, 5 e 10 tubi.

1. Allestire le diluizioni seriali decimali del campione da analizzare

2. Seminare 1 ml di ciascuna diluizione in 3 tubi contenenti 10 ml di substrato nutritivo e la campanella di Durham



3. Incubare le provette ad una temperatura e tempo idonei a permettere lo sviluppo del microrganismo che si vuole ricercare

4. si annota per ciascuna diluizione il numero di provette positive (torbidità o produzione di un particolare metabolita che indica l'avvenuta crescita microbica)

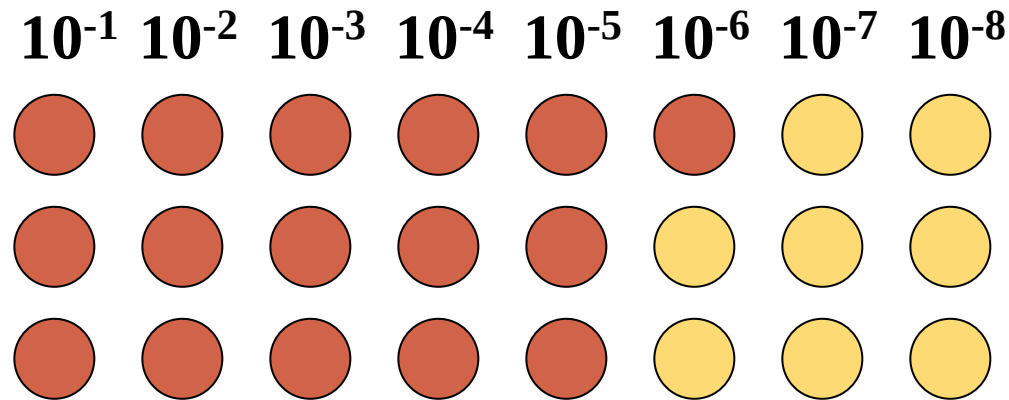


tubi negativi:
limpidi, senza
gas



tubi positivi:
torbidi, gas nella
campanella

5. Calcolare MPN: numero più probabile di microrganismi



1. individuare la **diluizione limite** che è l'ultima diluizione con tutti i tubi positivi nell'esempio è 10^{-5}
2. individuare il **numero caratteristico**: è un numero a 3 cifre costituito dal numero di tubi positivi nella diluizione limite, dal numero di tubi positivi in quella successiva e poi ancora nella successiva: nell'esempio è **310**
3. ricavare dalle tabelle MPN il numero più probabile corrispondente al numero caratteristico: nell'esempio **4**
4. moltiplicare per il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione limite:
 4×10^5 ml o g di campione

Le tabelle MPN: 3 tubi per diluizione (1, 0,1, 0,01 ml)

NC	MPN	cat.	li95	ls95	NC	MPN	cat	li95	ls95
010	0,3	2	<0,1	1,7	300	2,3	1	0,7	12,9
100	0,4	1	0,1	2,1	301	4,0	1	1,0	18,0
101	0,7	2	0,2	2,7	310	4,0	1	2,0	21,0
110	0,7	1	0,2	2,8	311	7,0	1	2,0	28,0
120	1,1	2	0,4	3,5	320	9,0	1	3,0	39,0
200	0,9	1	0,2	3,8	321	15,0	1	5,0	51,0
201	1,4	2	0,5	4,8	322	21,0	2	8,0	64,0
210	1,5	1	0,5	5,0	330	20,0	1	10,0	140
211	2,0	2	0,8	6,1	331	50,0	1	20, 0	240
220	2,1	1	0,8	6,3	332	110	1	30, 0	480

Vantaggi e svantaggi dei metodi MPN

50

Vantaggi:

- a. è un metodo sensibile (si possono usare anche 50 ml di inoculo);
- b. è facile da usare con substrati selettivi;
- c. con particolari accorgimenti (substrati fluorogenici) è possibile ottenere risultati in 4 ore

Svantaggi:

- a. è molto meno preciso delle conte in piastra
- b. è laborioso e può essere costoso