

Corso di Microbiologia Generale

a.a. 2021-2022

METODI PER LA MISURAZIONE DELLO SVILUPPO MICROBICO PARTE II

Prof.ssa Annalisa Serio UNITE

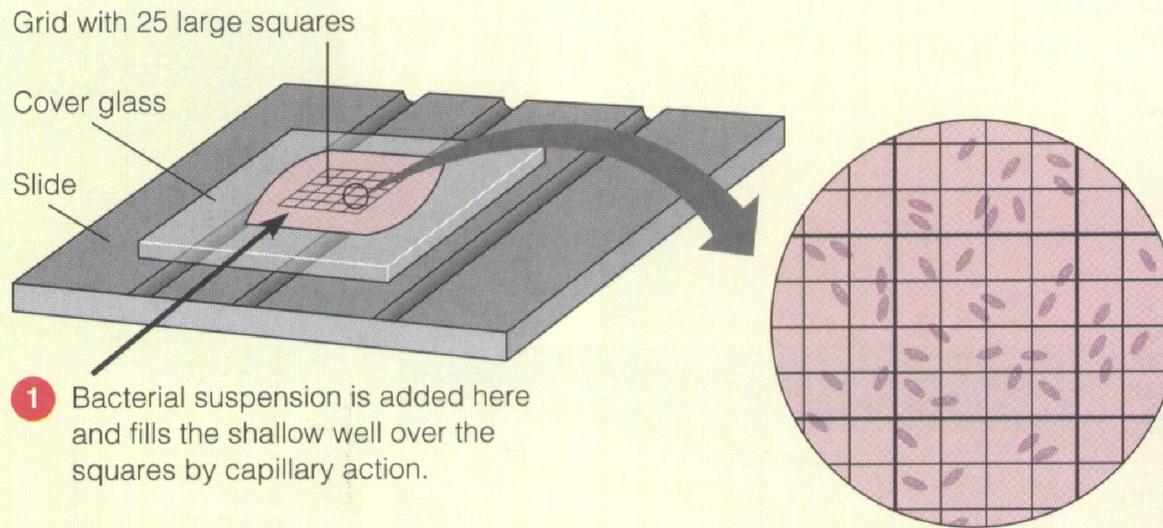
**METODI BASATI SULLA
DETERMINAZIONE DEL
NUMERO DI CELLULE**

**CONTA MICROSCOPICA DIRETTA:
(determinazione del numero di cellule mediante
conteggio)**

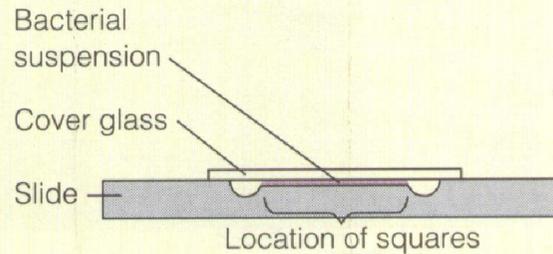
Coulter Counter

Contacellule di Petroff-Hausser

CONTACELLULE DI PETROFF-HAUSSE



- 1 Bacterial suspension is added here and fills the shallow well over the squares by capillary action.



- 2 Cross section of a cell counter. The depth under the cover glass is known, and the area of the squares is known, so the volume of the bacterial suspension over the squares can be calculated (depth \times area).

- 3 Microscopic count: All cells in several large squares are counted, and the numbers are averaged. The large square shown here has 14 bacterial cells.

- 4 The volume of fluid over the large square is $1/1,250,000$ of a milliliter. If it contains 14 cells, as shown here, then there are 14 times 1,250,000 (17,500,000) cells in a milliliter.

MISURAZIONE DELLA CRESCITA MICROBICA: metodi indiretti

- 1. Determinazione della carica microbica su piastra (campionamento)**
- 2. Filtrazione**
- 3. MPN Most Probable Number**

**DETERMINAZIONE DELLA CARICA
MICROBICA SU PIASTRA**
Viabile count = “Conta vitale”

0
Plate count = “Conta su piastra”

Misura il numero di cellule vitali (*viabile*)

**Occorrono generalmente almeno 18-24 h
perché le colonie siano contabili.**

**Generalmente si contano solo le piastre con
30-300 colonie (o 25-250).**

PRINCIPI SUI QUALI SI FONDA LA DETERMINAZIONE DELLA CARICA MICROBICA SU PIASTRA:

- ① Ogni batterio, crescendo, si divide e produce una singola colonia.**
- ② L'inoculo originale è omogeneo.**
- ③ Non sono seminati aggregati cellulari.**

LIMITI DELLA CARICA MICROBICA SU PIASTRA:

- ① Non tutte le cellule seminate crescono con la stessa velocità.**
- ② Colonie di piccola dimensione possono sfuggire al conteggio.**
- ③ Cellule vicine possono dare origine ad una sola colonia.**
- ④ E' difficile prevedere il numero delle cellule vitali (stima del fattore di diluizione necessario).**
- ⑤ Errori nella tecnica di analisi.**

Viable count: fonti di errore nella tecnica di analisi

- ① Campionamento (variabilità del campione e peso)**
- ② Diluizione e pipettatura (evaporazione diluente in autoclave, adesione dei microorg. alla pipetta, calibrazione pipetta, errori di lettura, ecc.)**
- ③ Insufficiente omogeneizzazione**
- ④ Errori nella semina (caratteristiche del terreno – spessore, umidità – sinergia-antagonismo, ecc.)**
- ⑤ Errori di conteggio**

LE FASI DELL'ESAME BATTERIOLOGICO

① Campionamento

② Preparazione dell'inoculo

③ Semina

④ Incubazione

⑤ Conteggio - Isolamento ed identificazione

ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE

- ① Isolamento in coltura pura**
- ② Identificazione fenotipica**
- ③ Identificazione mediante prove biochimiche**
- ④ Sierotipizzazione (se necessario)**
- ⑤ Identificazione genotipica (biologia molecolare)**

es. 10 g campione + 90 ml diluente =
100 ml totali

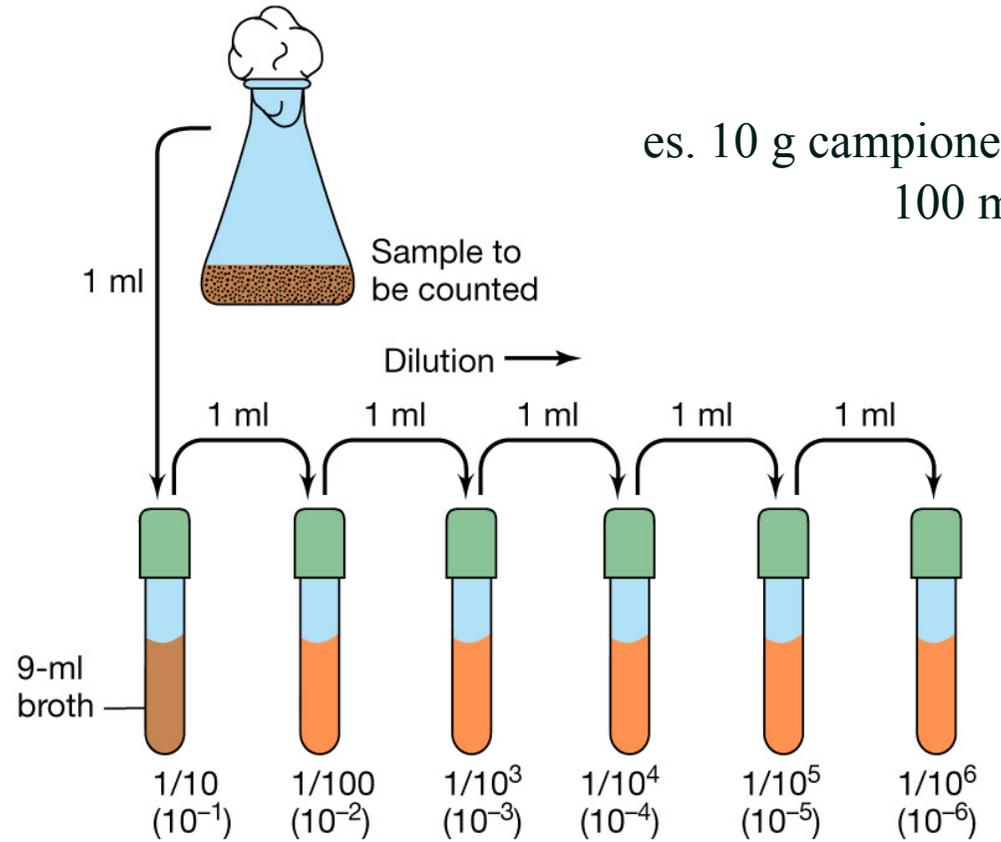
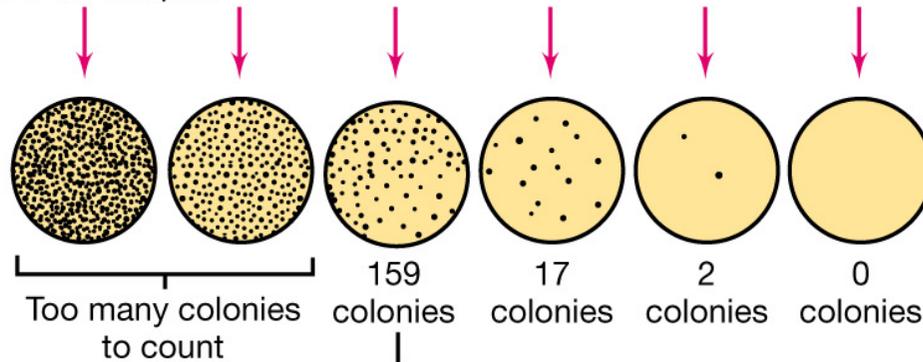


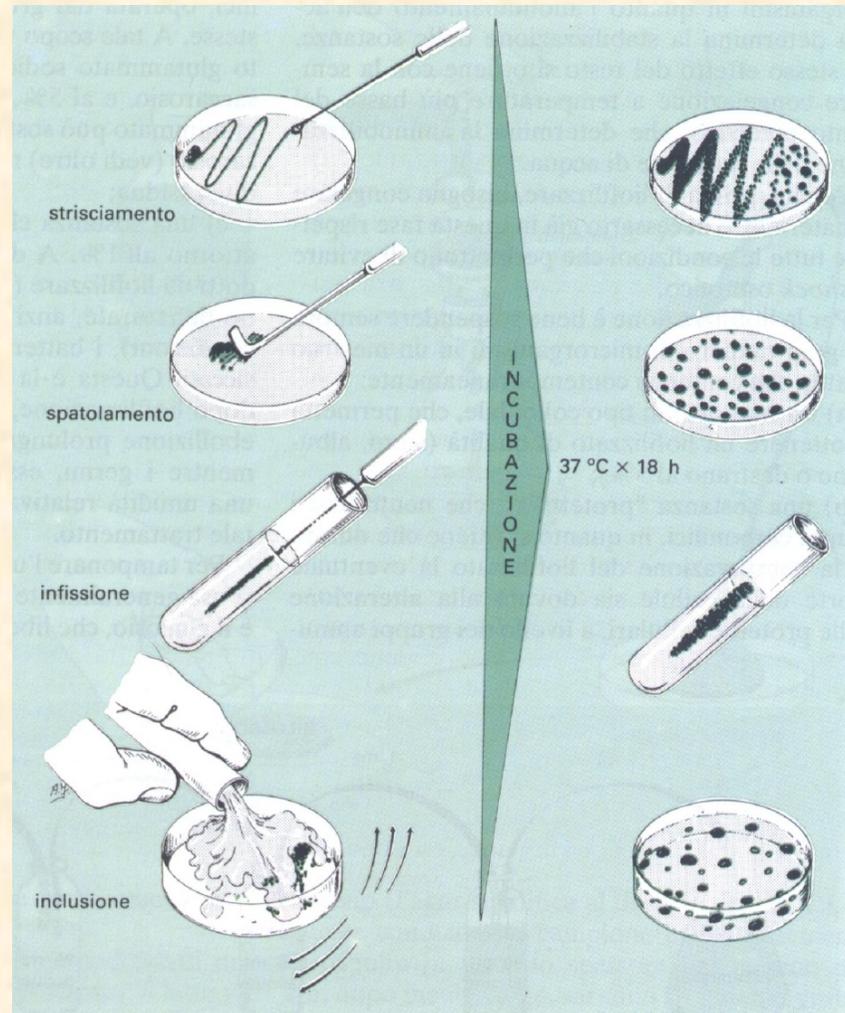
Plate 1-ml samples



$$159 \times 10^3 = 1.59 \times 10^5$$

Plate count Dilution factor Cells (colony-forming units) per milliliter of original sample

LE TECNICHE DI SEMINA



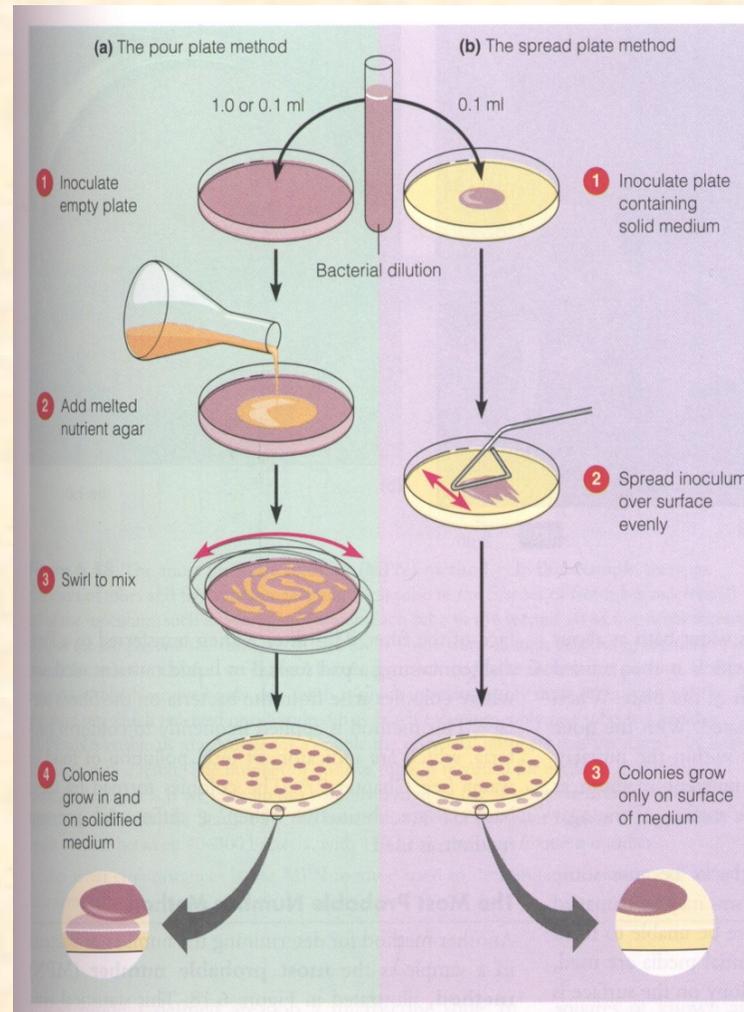
Le due tecniche di semina comunemente utilizzate per le operazioni di conteggio della “carica microbica” sono:

- **Spatolamento (o “semina superficiale”)**
- **Inclusione (o incorporamento o “agar germi”)**

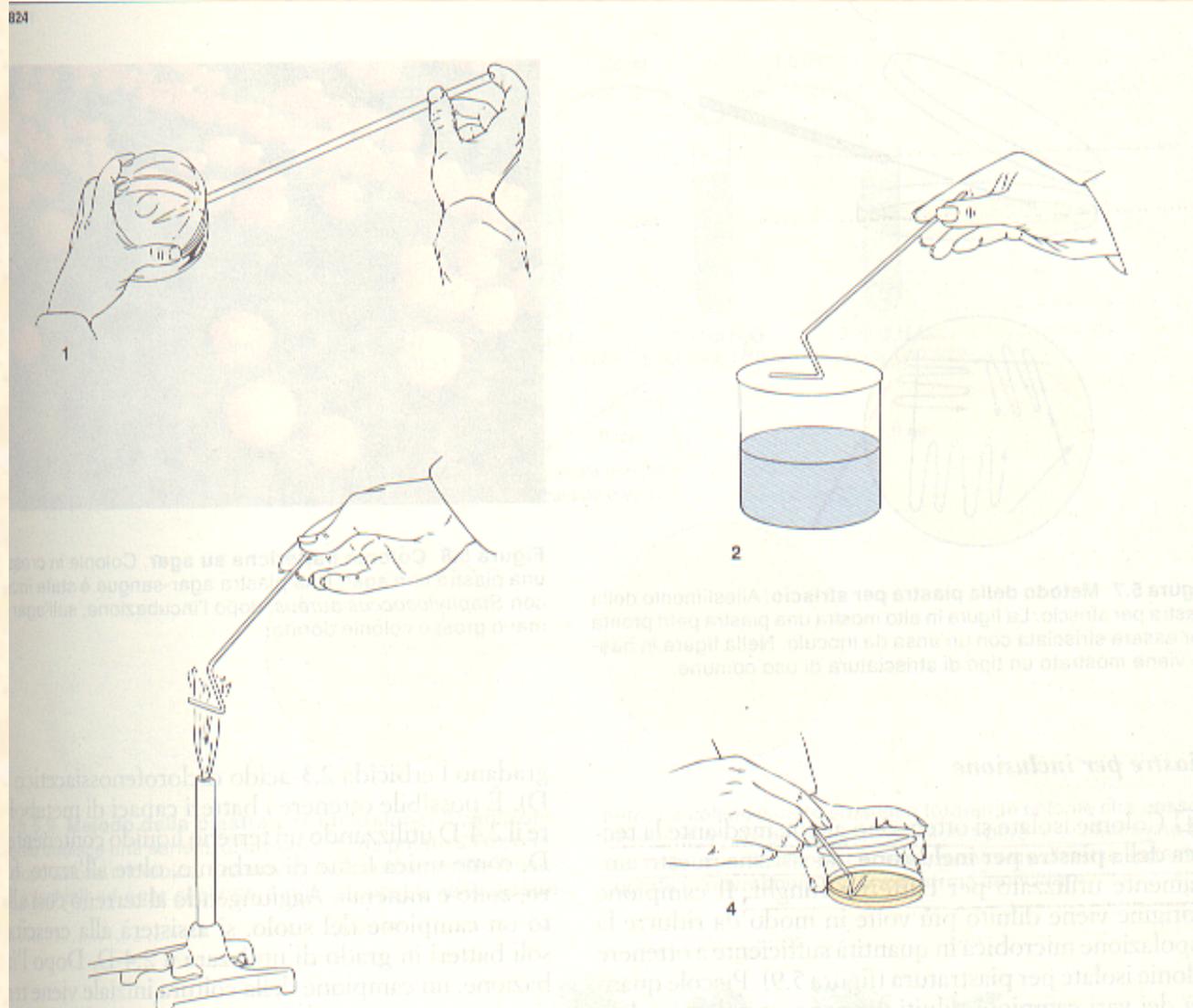
L’infissione (con ago) è utilizzata per saggiare particolari proprietà dell’inoculo

Lo striscio è utilizzato per ottenere una coltura pura (cellule appartenenti alla stessa specie microbica)

LE TECNICHE DI SEMINA: CONFRONTO TRA INCLUSIONE E SPATOLAMENTO

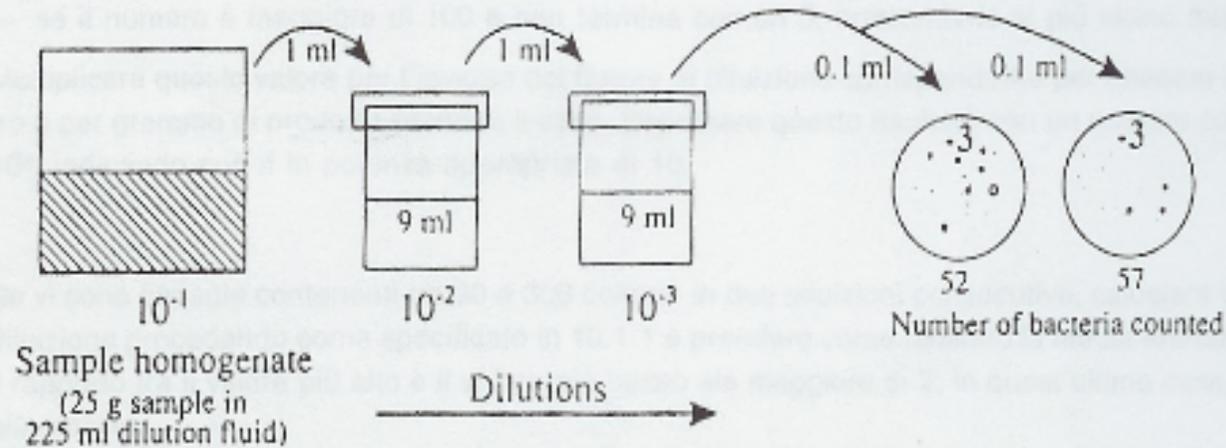


SEMINA PER SPATOLAMENTO



Weight

A 25 g sample was homogenized in 225 ml of dilution fluid (i.e. a 1:10 dilution (w/v)).



Formula for weight:

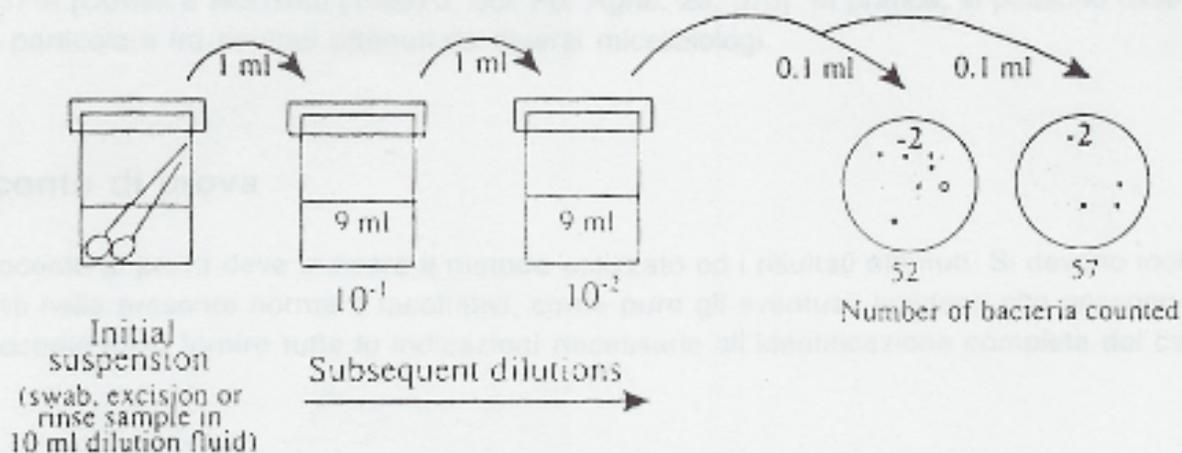
$$\frac{C_1 + C_2}{2} \times \frac{1}{\text{Dilution}} \times \frac{1}{\text{Volume plated (ml) onto each plate}} = \text{CFU / g}$$

Worked example:

$$\frac{52 + 57}{2} \times \frac{1}{10^{-3}} \times \frac{1}{0.1 \text{ ml}} = 5.5 \times 10^5 \text{ CFU / g}$$

Area

An area of 5 cm^2 was sampled. The initial suspension volume was 10 ml.



Formula for area:

$$\frac{C_1 + C_2}{2} \times \frac{\text{Vol. of initial suspension (ml)}}{\text{Area sampled (cm}^2)} \times \frac{1}{\text{Subsequent dilution}} \times \frac{1}{\text{Vol. plated (ml) onto each plate}} = \text{CFU / cm}^2$$

Worked example:

$$\frac{52 + 57}{2} \times \frac{10 \text{ ml}}{5 \text{ cm}^2} \times \frac{1}{10^{-2}} \times \frac{1}{0.1 \text{ ml}} = 1.1 \times 10^5 \text{ CFU / cm}^2$$

Espressione dei risultati

1. Il numero delle colonie va espresso con due sole cifre significative, in particolare:
 - Se il numero è inferiore a 100, arrotondarlo al più vicino multiplo di 5
 - se il numero è maggiore di 100 e termina con un 5, arrotondarlo al più vicino multiplo di 20
 - se il numero è maggiore di 100 e non termina con un 5, arrotondarlo al più vicino multiplo di 10.
2. Esprimere il risultato con un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per 10^n indicando con n la potenza appropriata di 10
3. Se ci sono piastre contenenti tra 30 e 300 colonie in due diluizioni consecutive, calcolare il numero di microrganismi per ogni diluizione e prendere come risultato la media aritmetica dei due valori, salvo nel caso in cui il rapporto tra il più grande e il più piccolo sia maggiore di ; in questo caso caso considerare come risultato il valore più piccolo
4. Se le piastre con il campione liquido o con la sospensione madre, contengono meno di 30 colonie, esprimere il risultato nel seguente modo:
 - Meno di 30 microrganismi per millilitro oppure
 - Meno di $30 \times s$ microrganismi per grammo, essendo s il fattore di diluizione della sospensione madre
5. Se non vi è alcuna colonia nelle piastre con il campione o la sospensione madre esprimere il risultato nel modo seguente
 - Meno di 1 microrganismo per millilitro oppure
 - Meno di $1 \times s$ microrganismi per grammo, essendo s il fattore di diluizione della sospensione madre

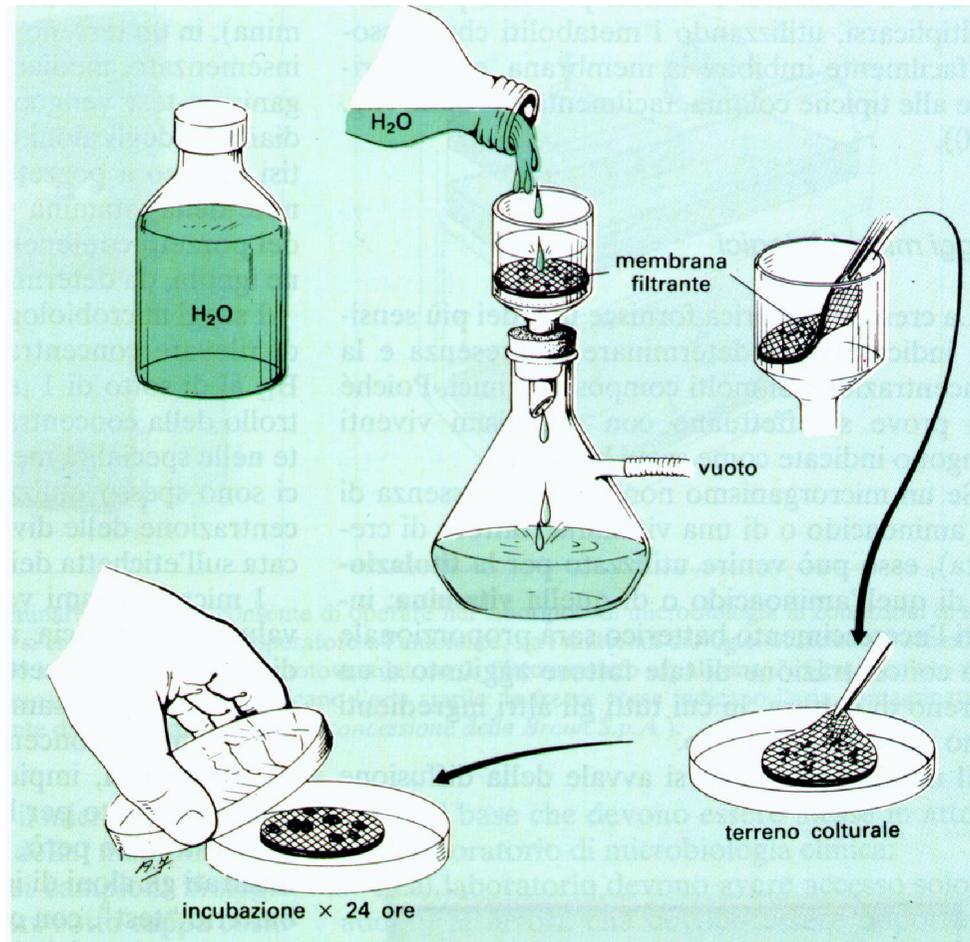
FILTRAZIONE

Utilizzabile quando si presume sia presente un numero limitato di cellule batteriche (acque potabili o comunque poco contaminate).

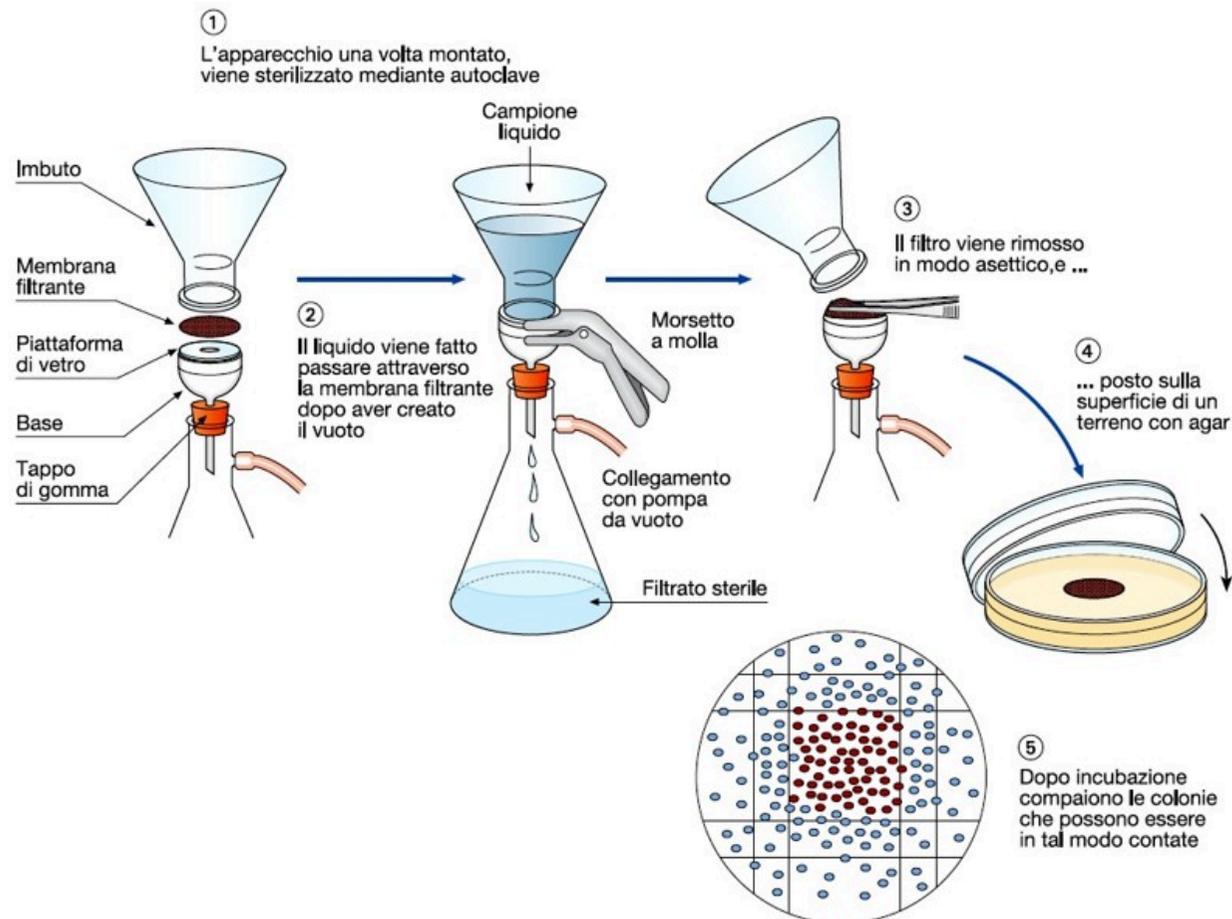
Applicazione: colimetria, classificazione acque marine per molluschicoltura.

E' possibile riconoscere colonie con caratteri distintivi se viene utilizzato un terreno differenziale.

FILTRAZIONE



- L'unità di misura del risultato è UFC/ml o UFC/100 ml.
- E' possibile ricercare microrganismi diversi, utilizzando più aliquote di campione e un filtro per ogni aliquota. Il filtro andrà poi posizionato su piastre contenenti terreni adatti al parametro microbiologico che sto ricercando.



MPN Most Probable Number

Quando si usa:

- ① Batteri nitrificanti chemioautotrofi
- ② Colimetria (identificazione in terreno differenziale liquido)
- ③ Limiti di legge per batteri patogeni (basso numero di cellule)

N.B.: Il numero MPN afferma soltanto che esiste il 95% di probabilità che la popolazione batterica rientri in un determinato intervallo e che quel numero sia il numero più probabile.

Principio del metodo MPN

Realizzando diluizioni successive di un campione, esisterà almeno una diluizione in cui solo alcune aliquote della diluizione contengono microrganismi.

Quindi, inoculando serie di tubi a diluizione seriale progressiva, solo alcune diluizioni daranno luogo a crescita, mentre per le diluizioni precedenti tutti i tubi di substrato inoculati con un'aliquota della diluizione daranno luogo a crescita, e per le successive tutti i tubi saranno sterili.

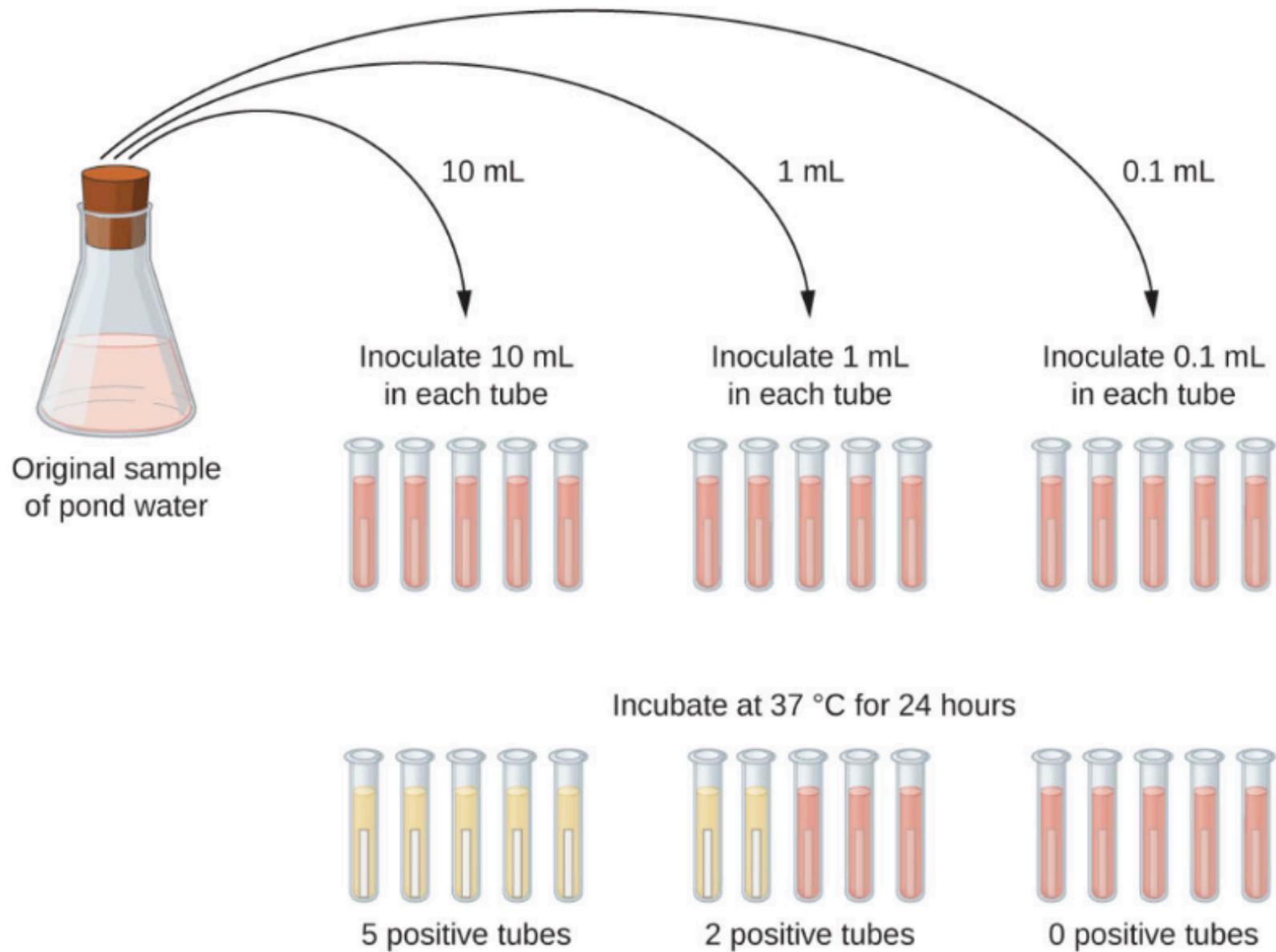


Figura 6 - Metodo del Most Probable Number

MPN 3 serie – 5 tubi

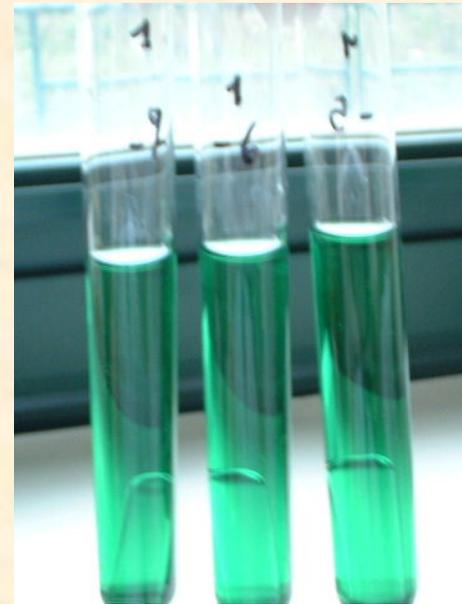
Calcolo del risultato (in MPN/g o ml)

Utilizzando il numero di tubi positivi in tre diluizioni successive (di solito si usano 3 serie da 5 tubi l'una) è possibile risalire, mediante tabelle statistiche, al numero più probabile di microrganismi per ml o g di campione.

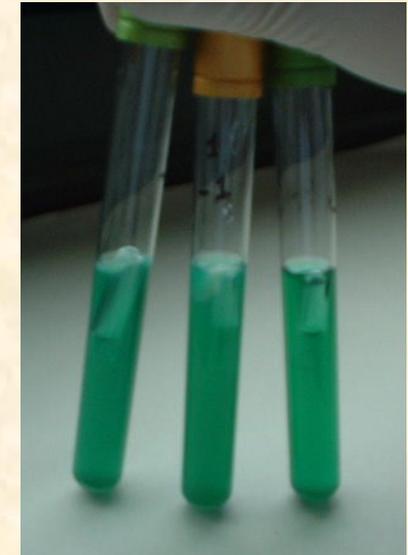
Risultati di una conta MPN



una serie di tubi inoculati e pronti per l'incubazione (3 tubi per diluizione)



**tubi negativi:
limpidi, senza
gas**



**tubi positivi:
torbidi, gas
nella
campanella**

MPN: Most Probable Number

Volume of Inoculum for Each Set of Five Tubes	Tubes of Nutrient Medium (Sets of Five Tubes)	Number of Positive Tubes in Set	Combination of Positives	MPN Index/ 100 ml	95% Confidence Limits	
					Lower	Upper
10 ml		5	4-2-0	22	9	56
		4	4-2-1	26	12	65
		3	4-3-0	27	12	67
		2	4-3-1	33	15	77
		1	4-4-0	34	16	80
1 ml		5	5-0-0	23	9	86
		4	5-0-1	30	10	110
		3	5-0-2	40	20	140
		2	5-1-0	30	10	120
		1	5-1-1	50	20	150
0.1 ml		4	5-1-2	60	30	180
		3	5-2-0	50	20	170
		2	5-2-1	70	30	210
		1	5-2-2	90	40	250
		0	5-3-0	80	30	250
		4	5-3-1	110	40	300
		3	5-3-2	140	60	360

Vantaggi e svantaggi dei metodi MPN

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:

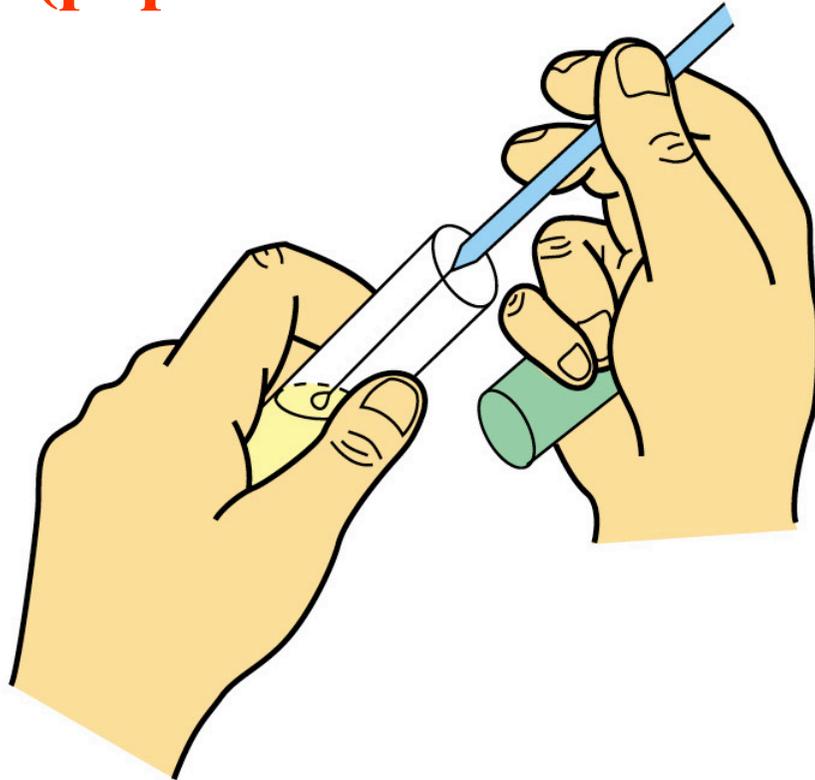
- a. è molto meno preciso delle conte in piastra**
- b. è laborioso e può essere costoso**

COLTURA PURA

OTTENIMENTO DI UNA COLTURA PURA

Striscio in piastra e isolamento in **coltura pura**

(popolazione di cellule che deriva da una singola cellula)

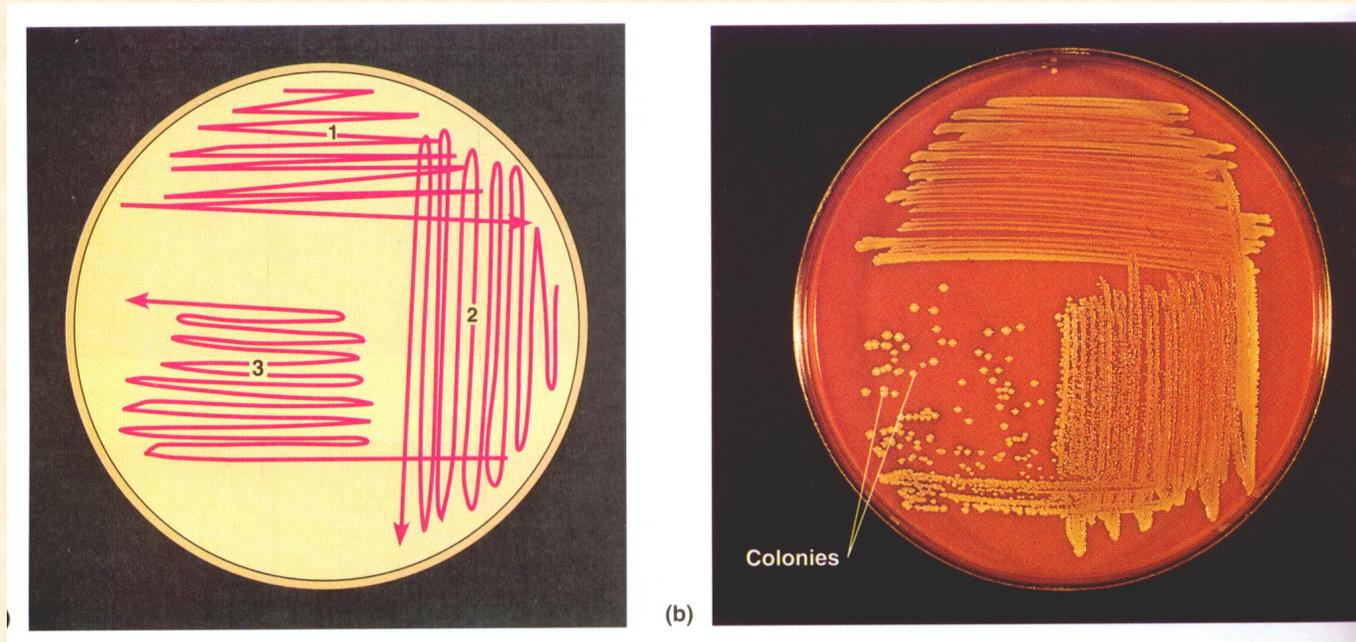


(a)



(b)

LE TECNICHE DI SEMINA: STRISCIO



E' la tecnica più utilizzata per ottenere COLTURE PURE.
E' efficace se i batteri da isolare in purezza sono presenti in carica relativamente elevata, altrimenti è necessario aumentarne il numero attraverso un arricchimento selettivo.

DIAGNOSTICA BATTERIOLOGICA

~ prove biochimiche ~

Catalasi: converte H_2O_2 in $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

es. per differenziare *Streptococcus* (-) da *Staphylococcus* (+),
Bacillus (+) da *Clostridium* (-)

Ossidasi (citocromo c ossidasi): riduce O_2

es. per differenziare enterobatteri (-) da *Pseudomonas* (+)

Fermentazione zuccheri: produzione di acido e/o gas

es. per differenziare gli enterobatteri tra loro

DIAGNOSTICA BATTERIOLOGICA

~ prove biochimiche ~

Coagulasi: coagulazione del sangue

es. per differenziare *Staphylococcus aureus* (+) da *Staphylococcus epidermidis* (-)

Riduzione nitrati: identificare batteri che possono usare nitrati come accettori di elettroni

es. enterobatteri sono solitamente (+)