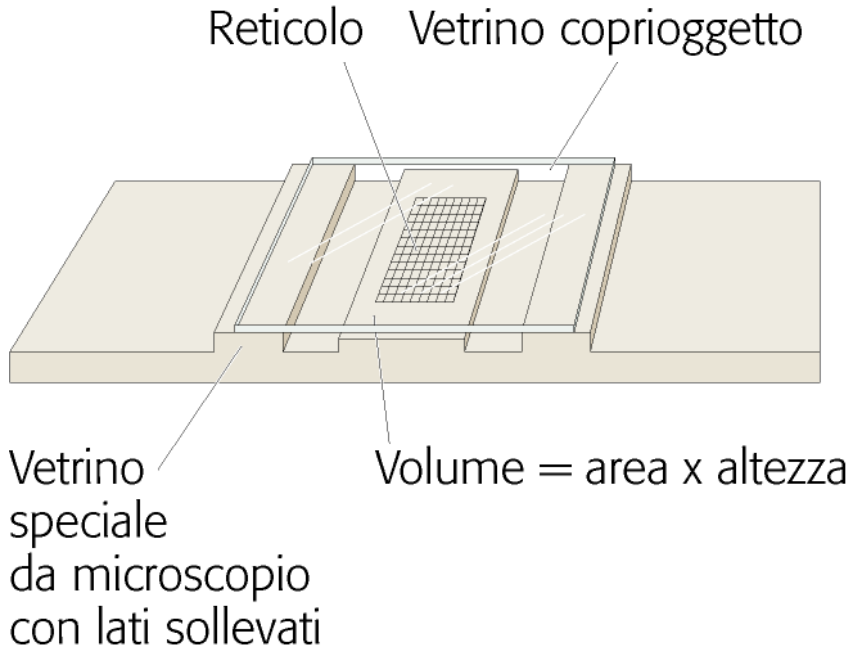


DETERMINAZIONE DIRETTA DELLA CARICA MICROBICA TOTALE

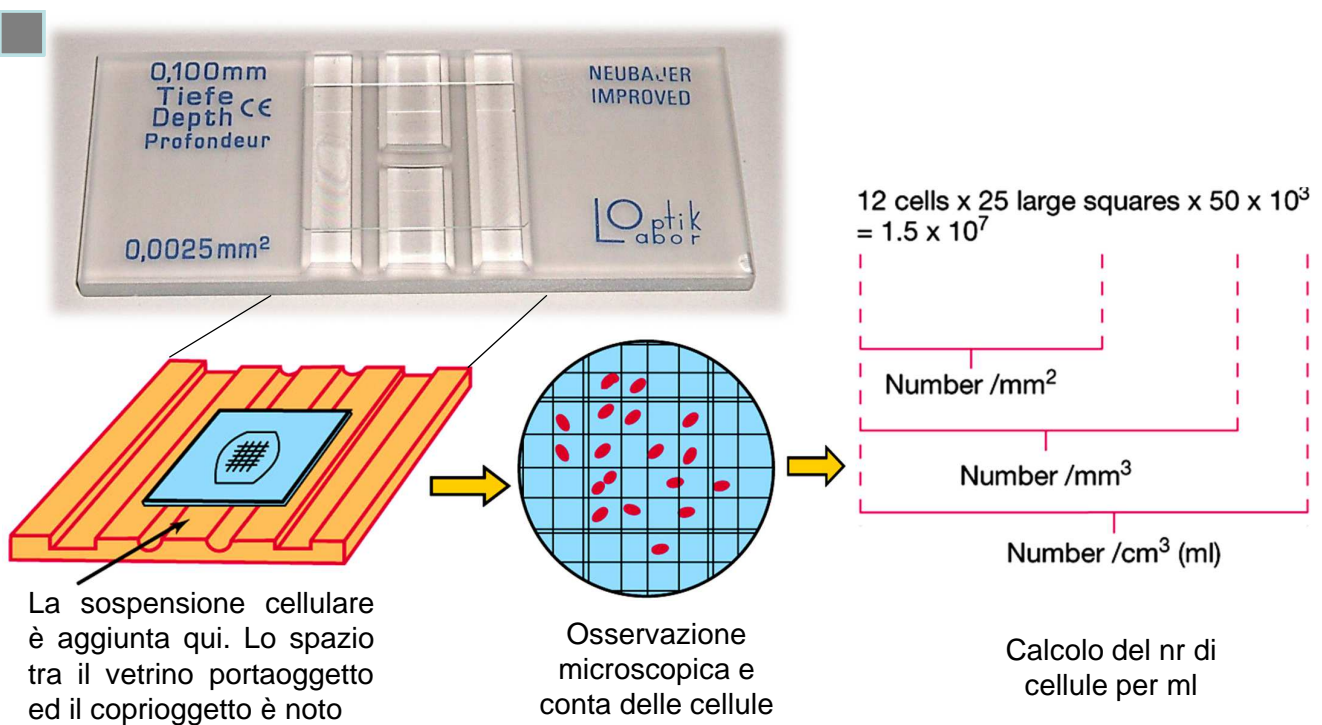
Conta diretta con microscopio delle cellule contenute in un volume noto di campione, attraverso l'impiego di CAMERE DI CONTA (camera di Thoma o di Burkner o Neubauer)

In queste camere il vetrino portaoggetto è inciso in superficie con un reticolo quadrettato di cui è nota l'area di ogni riquadro



Dato che lo spessore tra il reticolo ed il vetrino coprioggetto è noto, è possibile determinare il volume di sospensione batterica contenuta in ogni riquadro

1

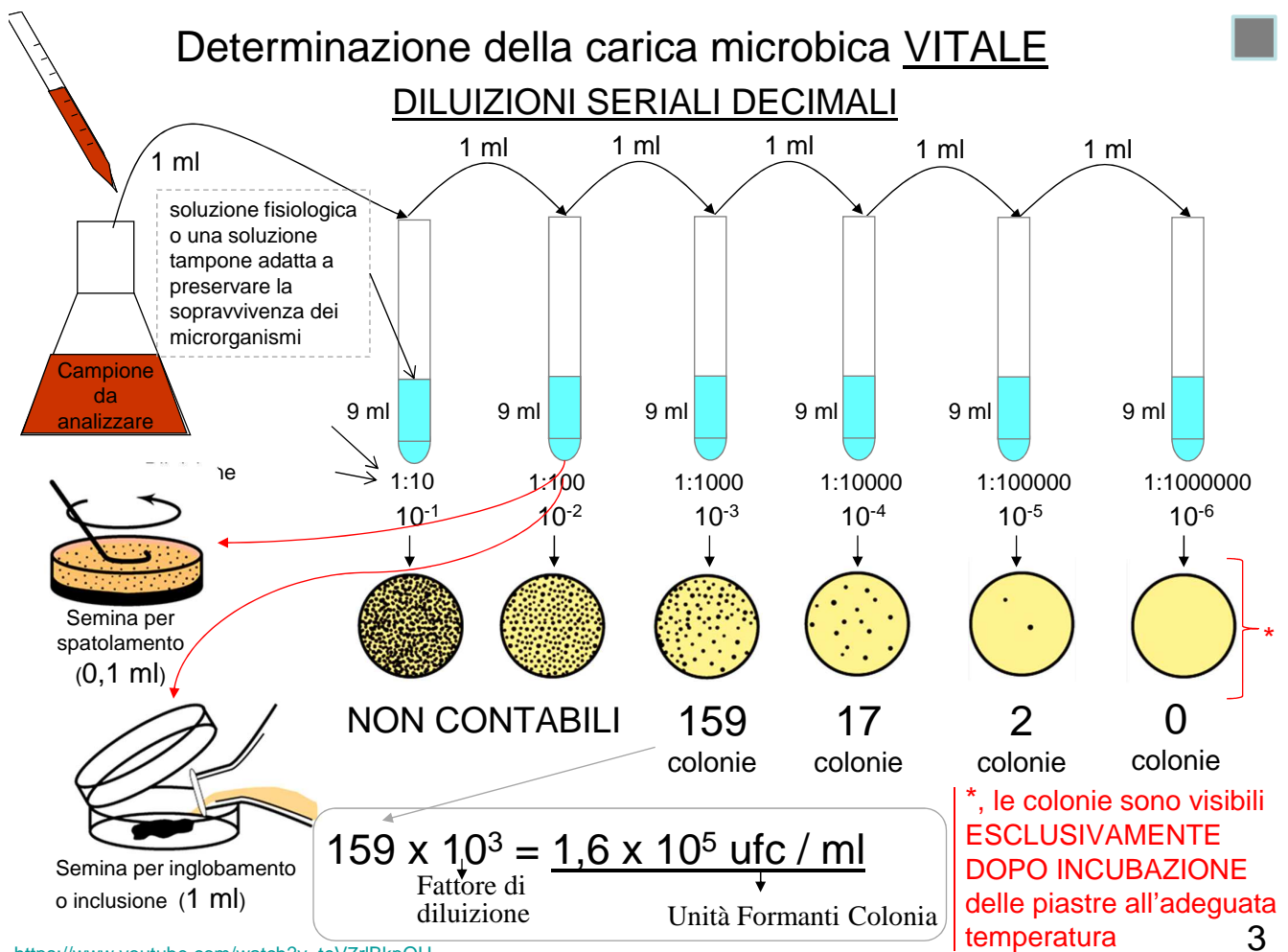


- LIMITI: - impossibile distinguere le cellule morte dalle vive;
 - difficoltà di conta di cellule mobili o molto piccole, come molti batteri;
 - inadeguato per campioni a densità cellulare bassa (circa 10^6) (a meno di concentrare il campione)

2

Determinazione della carica microbica VITALE

DILUZIONI SERIALI DECIMALI



3

Capsule Petri di terreno colturale agarizzato dopo semina delle diluizioni seriali e incubazione



Determinazione della carica microbica VITALE attraverso il piastramento di diluizioni seriali

Permette di ottenere i migliori risultati possibili circa il numero di cellule vitali in un campione ed è perciò ampiamente utilizzata

Permette di contare solo le cellule vive, dove per viva si intende una cellula capace di dividersi e di dare origine a una progenie

È adatta ad individuare anche un numero molto ridotto di cellule in un campione

Con l'uso di opportune condizioni o opportuni terreni selettivi è possibile ottenere la conta vitale di specifici gruppi microbici

Talvolta non è facile trovare condizioni di crescita (terreno, temperatura, tempo di incubazione) adatti a tutti i microrganismi di un campione microbiologicamente complesso. Inoltre, certi microrganismi crescono più rapidamente di altri

Questa tecnica si basa sul PRESUPPOSTO che ogni colonia sia originata da una singola cellula vitale. Sorgono pertanto problemi per cellule legate fra loro, ad esempio in catenelle come gli streptococchi. Per questo, il risultato di questo analisi di conta microbica non è indicato come numero di cellule, ma come UNITÀ FORMANTI COLONIA (UFC) per unità di peso o di volume

5

Esercizio di calcolo delle unità formanti colonia

Calcolo semplice (basato sulla semina di una sola diluizione; permette una conta approssimativa)

Cinque ml di una coltura batterica sono aggiunti a 45 ml di una soluzione fisiologica (cioè acqua contenente 9 g/l di NaCl) sterile. Dalla sospensione ottenuta sono compiute due diluizioni seriali 1:100. Sono quindi seminati per spatolamento 0,1 ml dell'ultima diluizione. Dopo incubazione della piastra sono state contate 137 colonie. Calcolare la carica vitale del campione di partenza

Risoluzione

La prima cosa che dobbiamo conoscere è il **fattore di diluizione** (il quale di permette di sapere quanto del campione iniziale è stato alla fine seminato)

$$\begin{array}{l} 5 \text{ ml in } 45 \text{ ml} \rightarrow \text{diluizione } 1:10 = 10^{-1} \\ + \text{ due diluizioni } 1:100 = 10^{-2} \times 10^{-2} = 10^{-4} \end{array} \quad \left| \begin{array}{l} \text{il fattore di diluizione è } 10^{-5} \end{array} \right.$$

Devo inoltre considerare che ho seminato 0,1 ml

Quindi, 137 colonie erano presenti in 0,1 ml di una sospensione che proviene da 5 diluizioni decimali:

$$\frac{137 \text{ u.f.c.}}{10^{-5} \times 0,1 \text{ ml}} = \frac{137 \text{ u.f.c.} \times 10^5}{0,1 \text{ ml}} = 137 \text{ u.f.c.} \times 10^6 = 137000000 = \mathbf{1,37 \times 10^8 \text{ u.f.c./ml}}$$

6

N.B.: al fine di stabilire nel modo più corretto possibile la carica microbica vitale di un campione, non si considerano solo le colonie di una singola piastra ad una singola diluizione, ma si considerano congiuntamente tutte le piastre aventi un numero di colonie accettabile (cioè compreso tra circa 10/20 a circa 200/300). Ciò deve essere ad esempio fatto nelle analisi di conta microbica vitale per i controlli sanitari (o per una qualsiasi analisi che deve avere valore legale). Vediamo, ad esempio, cosa vi è scritto nel documento ISTISAN 08/36 dell'Istituto Superiore di Sanità («Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano»).

Numerazione delle colonie prima dell'identificazione

Procedere al calcolo del numero (N) di microrganismi presenti nell'aliquota analizzata, calcolando la media ponderata tra le due diluizioni successive prese in considerazione, in base alla seguente formula:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

Dove:

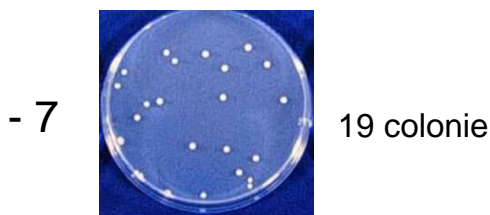
ΣC è la somma delle colonie ottenute dalla conta delle piastre relative alle due diluizioni successive prese in considerazione, e di cui almeno una contiene 10 colonie;

V è il volume, espresso in millilitri, dell'inoculo seminato in ogni piastra;

d è la diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata.

7

Esempio: Diluizione



$$N(ufc) = \frac{197+19}{1 \times 1,1 \times 10^{-6}} = 237,6 \times 10^6 =$$

$$2,4 \times 10^8 \text{ ufc/ml}$$

Esempio:

Prima diluizione considerata: 10^{-2} ,
numero di colonie contate alla diluizione $10^{-2} = 116$

Volume dell'inoculo: 0,1mL

Seconda diluizione considerata: 10^{-3}
Numero di colonie contate alla diluizione $10^{-3} = 24$

Prima diluizione considerata: 10^{-2}

Calcolo:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{116 + 24}{0,1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{140}{0,0011} = 127272,7$$

Arrotondando il risultato, il numero di microrganismi sarà 130000 o $1,3 \times 10^5$ per grammo o millilitro di prodotto.

8

■ Conta vitale per diluzioni seriali e semina in pastra → **RICAPITOLANDO:**
(DEVE ESSERE COMPRESO E IMPARATO MOLTO BENE!)

- permette di contare solo le cellule vive, dove per viva si intende una cellula capace di dividersi e di dare origine a progenie.

Il PRESUPPOSTO è che OGNI colonia sia originata da una singola cellula vitale. Problema per cellule legate fra loro in catenelle (vedi streptococchi). Per questo non si parla di cellule per unità di peso o di volume, ma di **UNITA' FORMANTI COLONIA!!!**

Non è talvolta facile trovare condizioni di crescita (terreno, temperatura, tempo di incubazione) adatti a tutti i microrganismi di un campione microbiologicamente complesso. Inoltre certi microrganismi crescono più rapidamente di altri.

Per ovviare a questi problemi e anche ad altri, è importante preparare diverse repliche!

Questa metodica permette di ottenere i migliori risultati possibili circa il numero di cellule vitali in un campione ed è perciò ampiamente utilizzata!!!

È adatta a trovare anche un numero molto piccolo di cellule!!!

Con l'uso di opportune condizioni o terreni selettivi è possibile ottenere la conta vitale di specifici gruppi microbici.