

La determinazione quantitativa in microbiologia

La **determinazione quantitativa** è una tecnica microbiologica che permette di verificare il numero di microrganismi presenti in un campione, per unità di peso o di volume.

Se nel campione sono presenti specie batteriche differenti si parlerà di **carica batterica totale**; se invece si vuole condurre una ricerca quantitativa di una sola specie batterica, bisognerà procedere prima al suo isolamento.

Esistono vari metodi, alcuni dei quali forniscono un'indicazione del numero totale dei batteri, sia quelli vivi che quelli morti.

Conta al microscopio

Vengono utilizzati dei vetrini particolari, che presentano dei reticoli delimitanti un'area di valore noto. La carica batterica si determina contando le cellule presenti in determinate aree. Si fa la media dei batteri contati, si moltiplica per il reciproco dell'area e per il reciproco dell'altezza (cioè lo spessore del velo liquido) e si ottiene il numero dei batteri per millilitro, tenendo presenti anche le eventuali diluizioni.

Contatori coulter counter

Sono strumenti capaci di contare rapidamente le cellule o altri corpi sospesi in un fluido (ad esempio gli eritrociti); la sospensione viene fatta passare attraverso un foro tra due elettrodi capaci di registrare il volume delle cellule e quindi di contare quelle che possiedono il volume per il quale è stato tarato lo strumento.

Calcolo dell'indice MPN

MPN è l'abbreviazione costituita dalle iniziali dell'espressione Most Probable Number. E' un metodo fondato sul calcolo statistico, ha valore generale e si applica alla numerazione di vari microrganismi in un terreno liquido. Parte dal presupposto che vengano utilizzate popolazioni microbiche pure, oppure che il terreno impiegato sia altamente selettivo, permettendo così esclusivamente la crescita dei microrganismi da quantificare.

Diluizioni successive

Si devono effettuare delle diluizioni successive in progressione geometrica: 1/10, 1/100, 1/1000, ecc.

In pratica si preparano alcune provette contenenti 9 ml di acqua distillata sterile o di soluzione fisiologica sterile e le si numerano.

Si preleva, con una pipetta sterile, 1 ml di sospensione batterica campione e la si trasferisce nella provetta 1 (diluizione 10^{-1}), si agita e con un'altra pipetta si preleva 1 ml di sospensione dalla provetta 1 e la si trasferisce nella provetta 2 (diluizione 10^{-2}), e così via. In questo modo il numero delle cellule diminuisce di 1/10 da una provetta alla successiva.

Si semina per spatolamento 1 ml prelevato da ciascuna provetta su altrettante piastre di Petri siglate come le provette, si mette in incubazione e si effettua la conta.(*)

Il numero di batteri/ml si ottiene così:

- moltiplicare il numero di batteri di ciascuna piastra per l'inverso della diluizione,
- fare la media di tutte le piastre scelte, cioè sommare il numero delle colonie di ciascuna piastra e suddividere il risultato ottenuto per il numero delle piastre.

Esempio:

piastra 10^{-4} 290 colonie $\times 10^4 = 29 \times 10^5$

piastra 10^{-5} 50 colonie $\times 10^5 = 50 \times 10^5$

piastra 10^{-6} (non si conta)

Totale = 79×10^5

numero di batteri/ml = $79 \cdot 10^5 / 2 = 395 \cdot 10^4$

(*) Si escludono le piastre che contengono più di 300 colonie e meno di 30.

Metodo delle membrane filtranti

Le membrane filtranti sono costituite da dischi di esteri di cellulosa, che trattengono sulla superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua. Disponendo quindi le membrane o su dischi assorbenti imbevuti di liquido colturale o su terreno di coltura solido, il passaggio per capillarità dei principi nutritivi contenuti nel terreno permette lo sviluppo di colonie batteriche sulla superficie della membrana dopo un idoneo periodo di incubazione.

Tra i vantaggi del metodo il più importante è la velocità di esecuzione e la possibilità di filtrare elevati volumi di acqua, a patto che essa non sia torbida (fango in sospensione, plancton, ecc.). Inoltre la presenza di eventuali sostanze battericide o batteriostatiche nell'acqua in esame non interferisce con questo metodo.

Nel caso di un elevato grado di inquinamento una cura particolare va rivolta nello stabilire il volume di campione e le diluizioni da effettuare prima della filtrazione. In linea di massima i volumi da filtrare si aggirano attorno a 200-300 ml per acque potabilizzate, 50-100 ml e fino a 200 ml per acque originariamente pure destinate ad

uso potabile. Per le acque superficiali più o meno inquinate sono raccomandate quantità variabili tra 10 e 0,1 ml, mentre nel caso delle acque di scarico le quantità sono molto piccole, comprese tra 0,1 e 0,001 ml. Quando il volume da filtrare non raggiunge un minimo di 20 ml, la quantità prelevata dovrà essere portata a tale volume o meglio a 30 ml con l'aggiunta di acqua sterile, prima di procedere alla filtrazione.