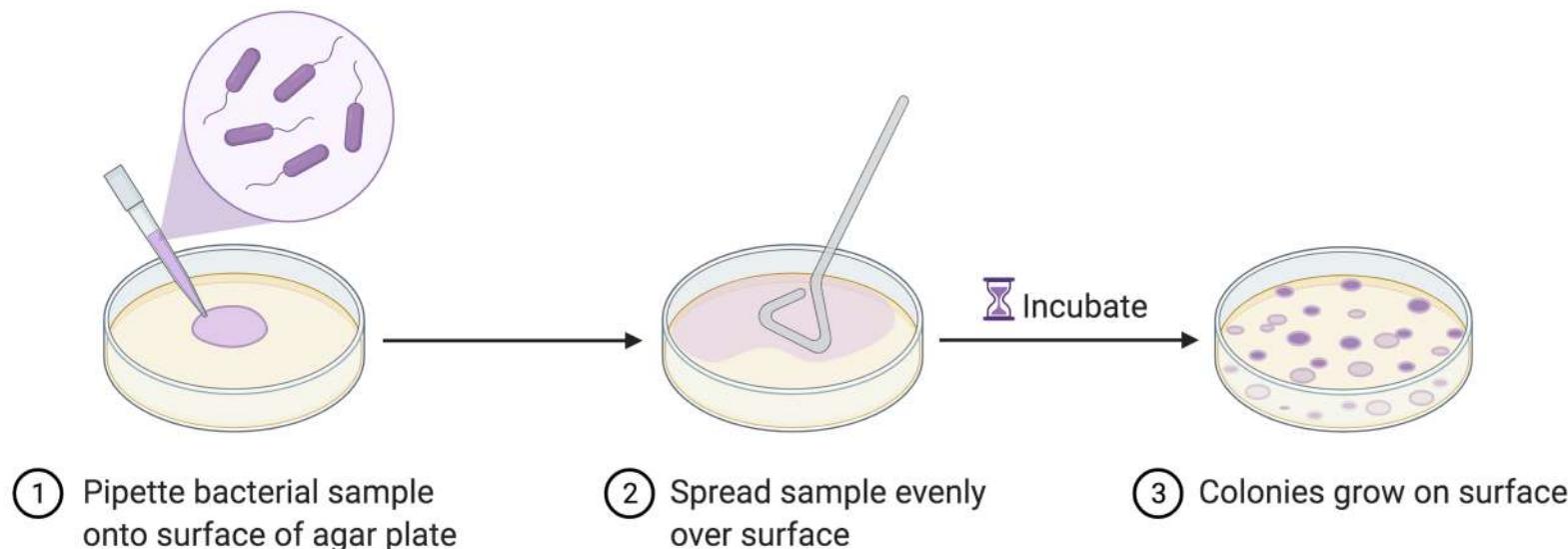


Diluizioni decimali seriali

Il numero di microrganismi presenti in un dato campione alimentare, in genere, è così alto da non poter essere contato se non dopo essere stato sottoposto a diluizioni seriali. Consideriamo i seguenti esempi.

ESEMPIO 1: se noi seminiamo su un adatto terreno nutritivo 1 ml di latte crudo e troviamo, dopo incubazione delle piastre, che si sono sviluppate 15 colonie, siamo in grado di concludere che il campione di latte crudo conteneva 15 UFC/ml. Più realisticamente, la concentrazione di microrganismi in un campione di latte crudo è considerevolmente più elevata, per cui il conteggio delle colonie su una piastra inoculata con 1 ml del campione potrebbe risultare impossibile.



Preparazione delle diluizioni decimali seriali

ESEMPIO 2: supponiamo che il nostro campione di latte crudo presenti una concentrazione di microrganismi pari a 100.000 UFC/ml.



In questo caso ci aspettiamo di avere una piastra con colonie contabili (100 UFC/ml) solo seminando 0,001 ml di latte.



Come appare evidente questa procedura è poco praticabile, soprattutto per la difficoltà, con gli attrezzi disponibili, di trasferire in piastra inoculi così piccoli; inoltre, inoculi così piccoli rendono il campione poco rappresentativo. La stessa procedura è resa praticabile applicando la tecnica delle diluizioni seriali.

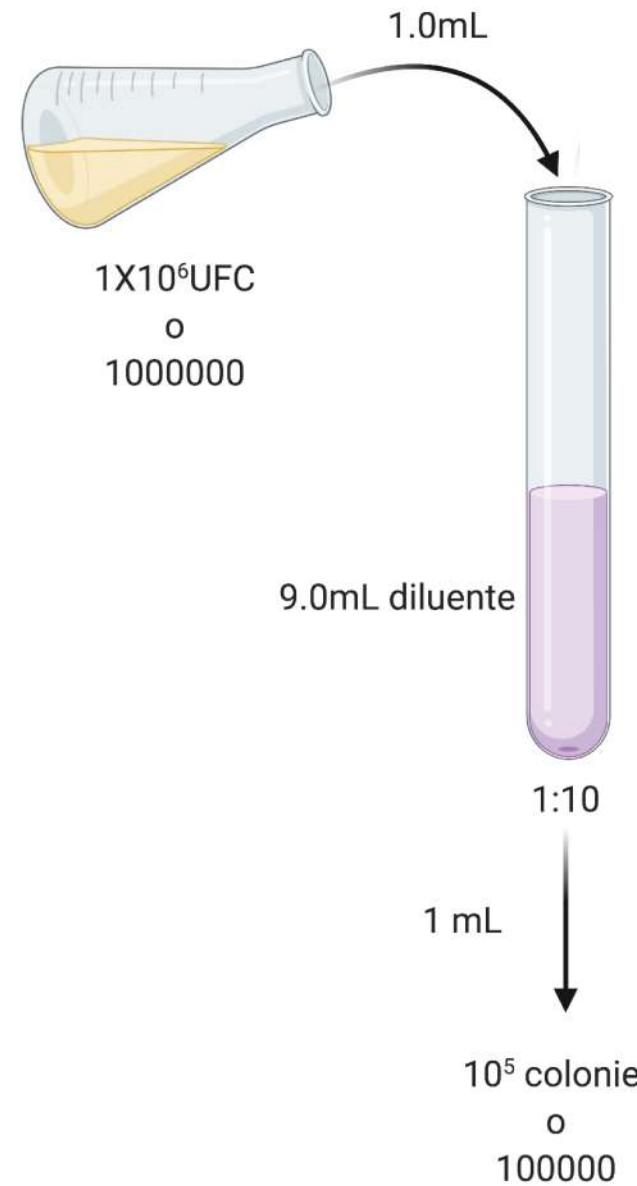
Perchè diluire?

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

- se il campione è liquido è necessario diluire fino a quando l'aliquota che si intende piastrare non contiene il numero di colonie desiderato
- 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

Preparazione delle diluizioni decimali seriali

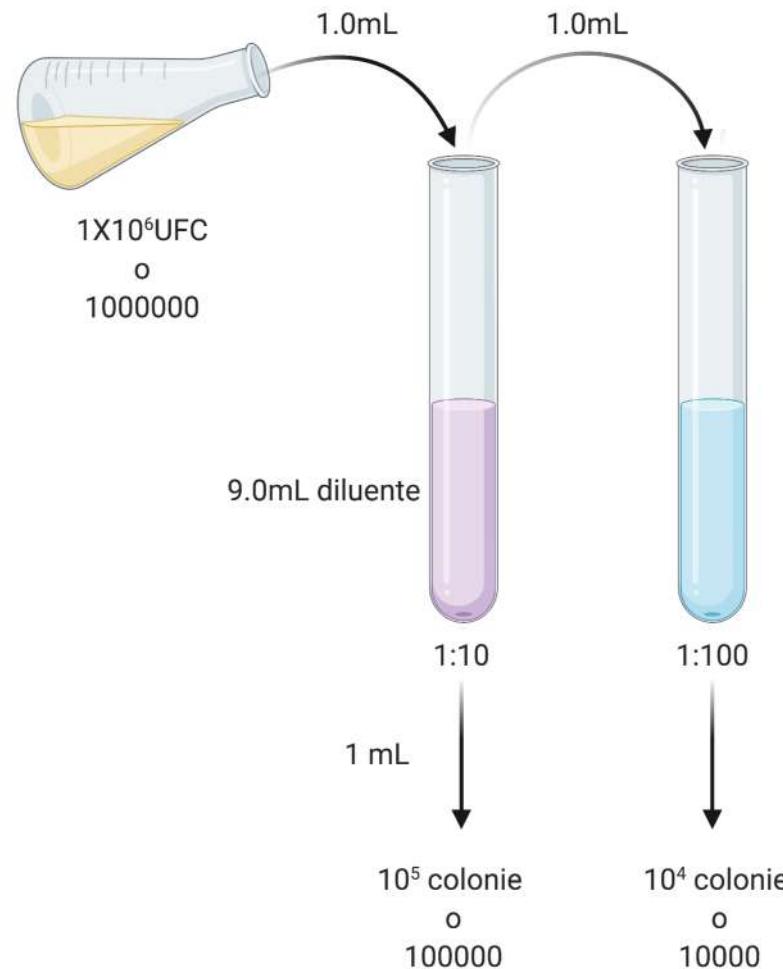
Diluizione 1:10 (10^{-1}): ottenuta trasferendo 1 ml del campione iniziale in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,1 ml di campione e 10^5 microrganismi;



Preparazione delle diluizioni decimali seriali

Diluizione 1:10 (10^{-1}): ottenuta trasferendo 1 ml del campione iniziale in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,1 ml di campione e 10^5 microrganismi;

Diluizione 1:100 (10^{-2}): ottenuta trasferendo 1 ml della diluizione precedente in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,01 ml di campione e 10^4 microrganismi;

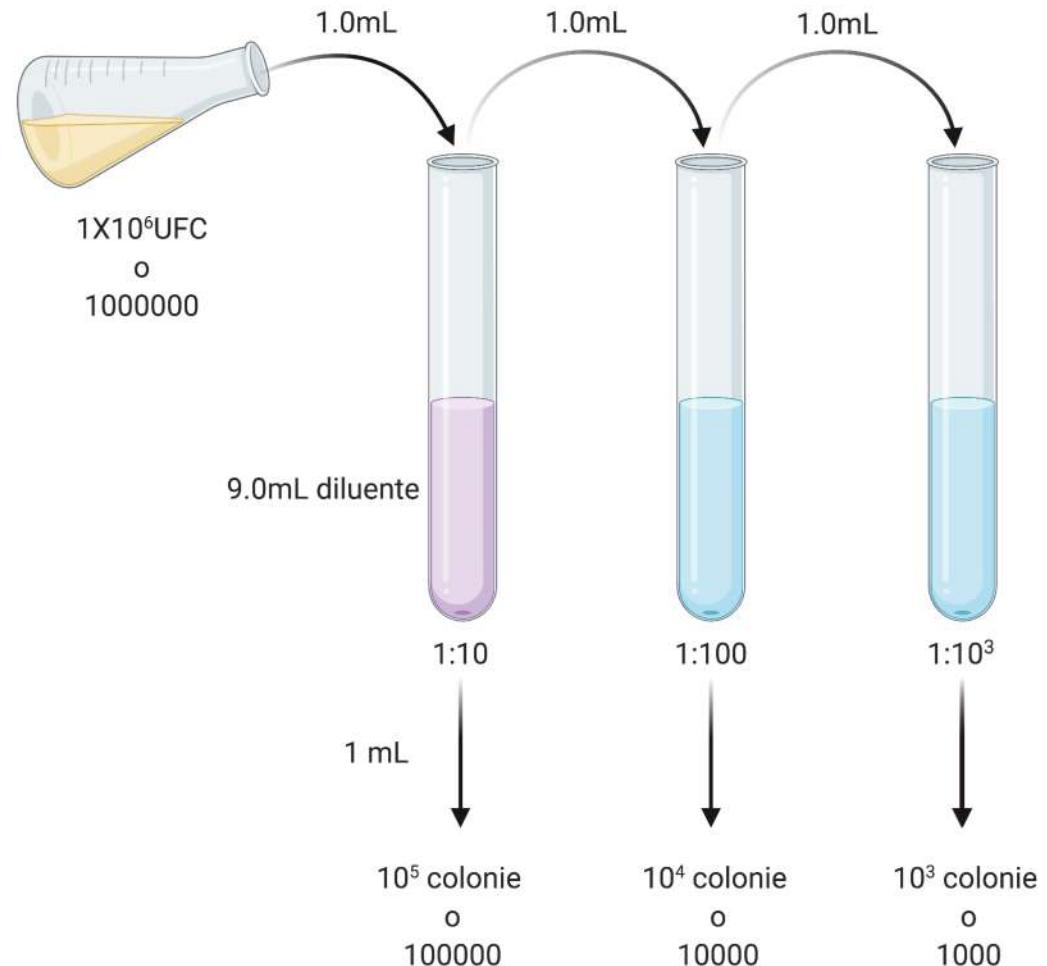


Preparazione delle diluizioni decimali seriali

Diluizione 1:10 (10^{-1}): ottenuta trasferendo 1 ml del campione iniziale in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,1 ml di campione e 10^5 microrganismi;

Diluizione 1:100 (10^{-2}): ottenuta trasferendo 1 ml della diluizione precedente in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,01 ml di campione e 10^4 microrganismi;

Diluizione 1:1.000 (10^{-3}): ottenuta trasferendo 1 ml della diluizione precedente in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,001 ml di campione e 10^3 microrganismi;



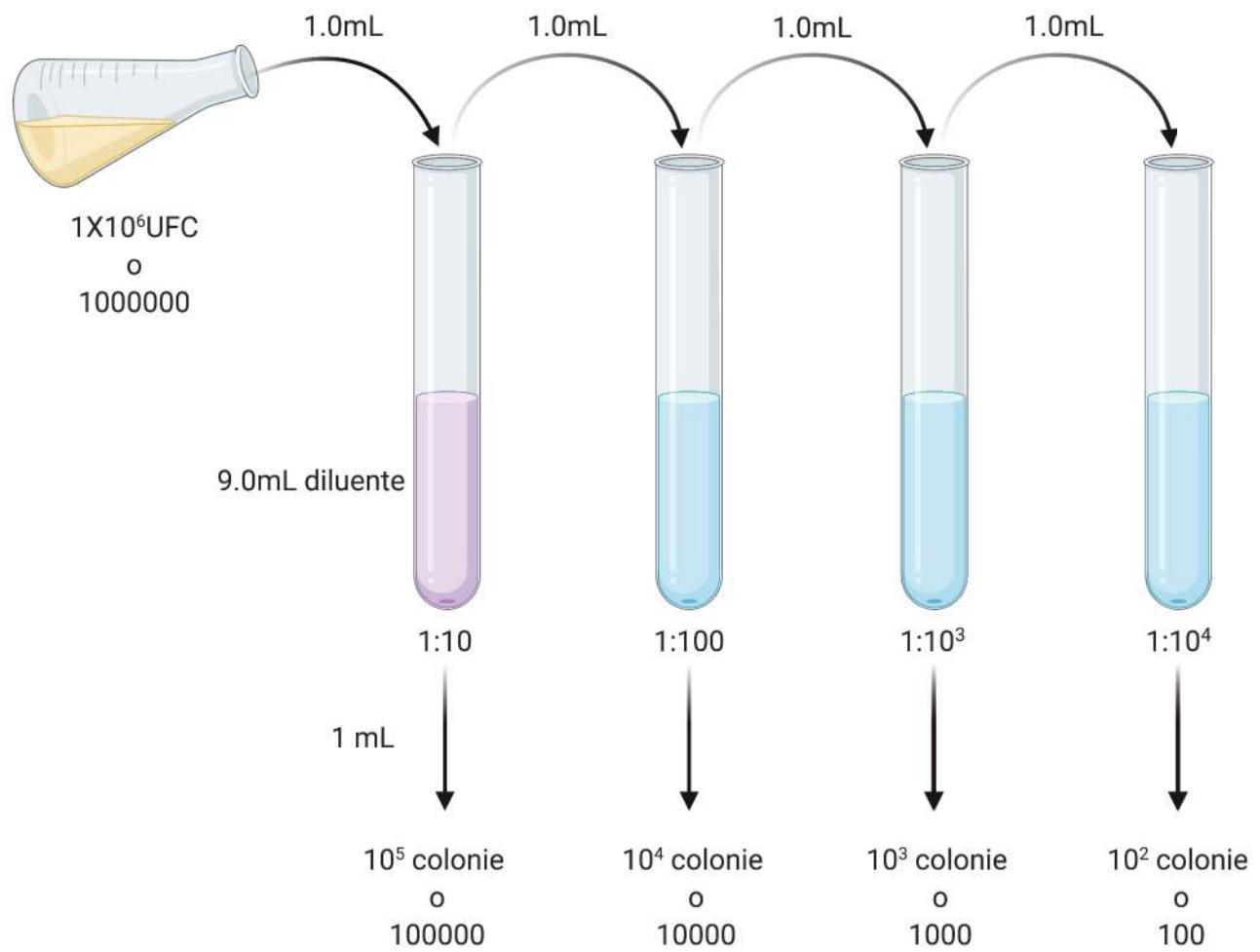
Preparazione delle diluizioni decimali seriali

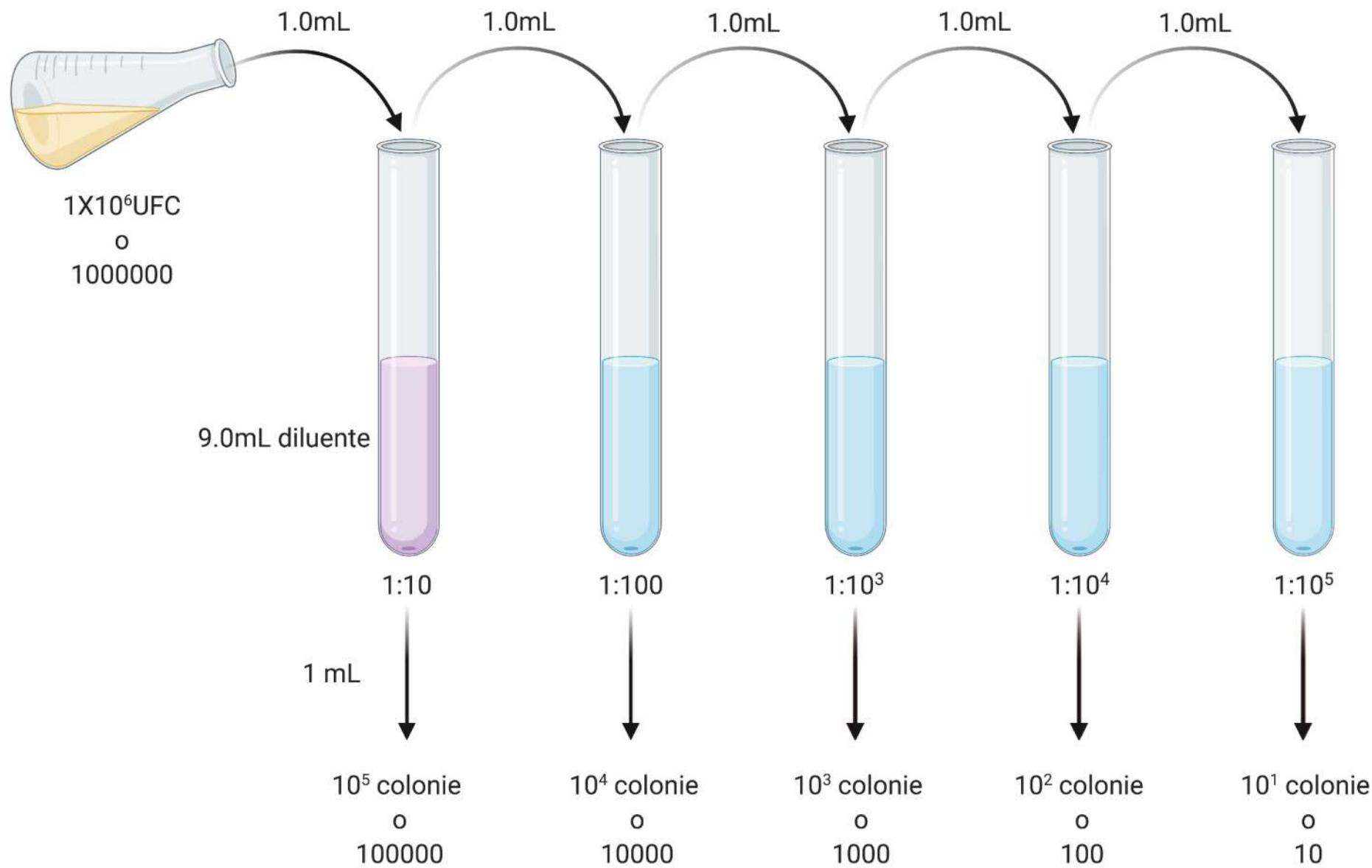
Diluizione 1:10 (10^{-1}): ottenuta trasferendo 1 ml del campione iniziale in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,1 ml di campione e 10^5 microrganismi;

Diluizione 1:100 (10^{-2}): ottenuta trasferendo 1 ml della diluizione precedente in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,01 ml di campione e 10^4 microrganismi;

Diluizione 1:1.000 (10^{-3}): ottenuta trasferendo 1 ml della diluizione precedente in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,001 ml di campione e 10^3 microrganismi;

Diluizione 1:10.000 (10^{-4}): ottenuta trasferendo 1 ml della diluizione precedente in 9 ml di diluente sterile. 1 ml di tale diluizione conterrà 0,0001 ml di campione e 10^2 microrganismi;





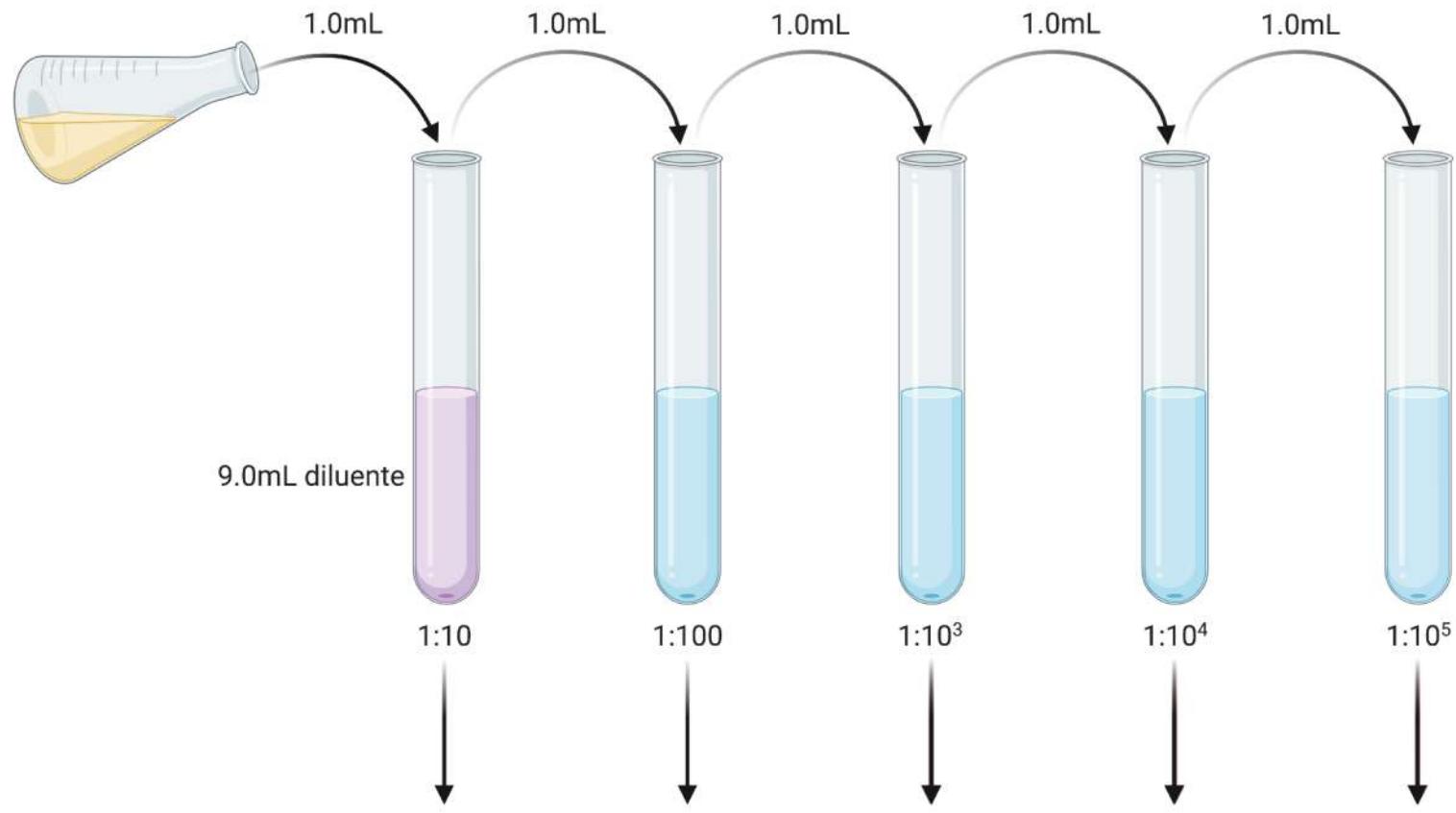
Tecnica di stima del numero più probabile di microrganismi (MPN, Most Probable Number)

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

E' 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 intorbidimento della coltura oppure valutando particolari attività metaboliche del microrganismo (produzione di gas, di acidi ecc.).

La tecnica è utilizzata in associazione con una tavola statistica che fornisce il valore del numero più probabile di microrganismi per varie combinazioni di tubi positivi.

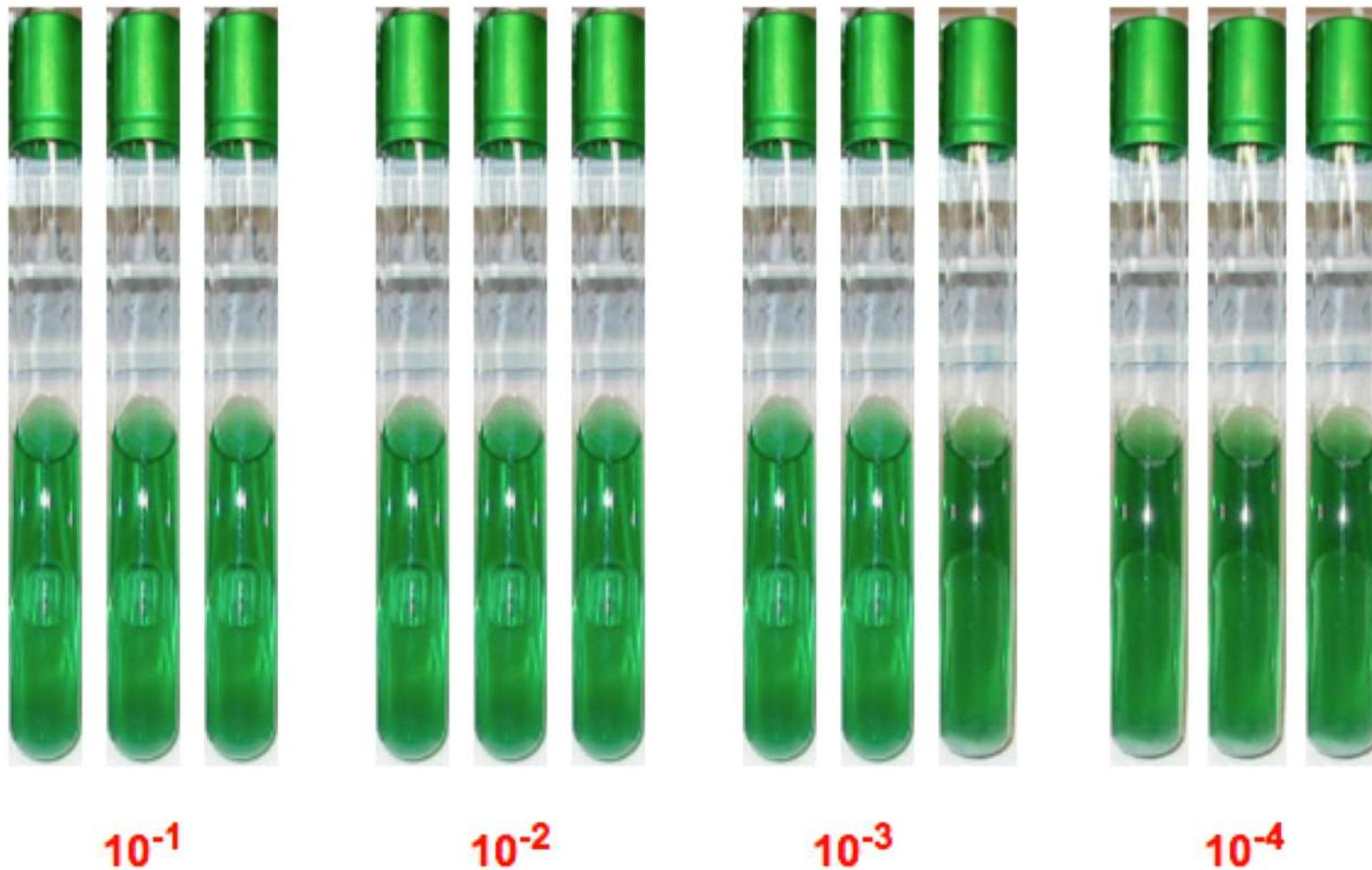


Per aumentare
l'accuratezza statistica
dell'MPN è necessario
inoculare con ciascuna
diluizione del campione
più tubi di brodo nutritivo.



3 TUBI per
ogni
DILUIZIONE

MPN (MOST PROBABLE NUMBER)



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.

MPN (MOST PROBABLE NUMBER)

Per la lettura del MPN con le tavole di Mc Crady si procede come segue:

Si annota per ciascuna diluizione il numero di provette positive (turbidità o produzione di un particolare metabolita che indica l'avvenuta crescita microbica), quindi si calcola il numero caratteristico che è costituito da 3 cifre, la prima delle quali è data dal numero di tubi positivi alla diluizione più spinta (detta anche diluizione limite) tra quelli che presentano la più elevata positività, la seconda e la terza cifra rappresentano, rispettivamente, il numero di tubi positivi nelle due successive diluizioni. Sulle tavole, in corrispondenza del numero caratteristico determinato, si legge il MPN che moltiplicato per il reciproco della prima diluizione considerata (diluizione limite) indicherà il numero più probabile di microrganismi per g o ml di campione.

MPN (MOST PROBABLE NUMBER)

Tavola di Mc Crady per la determinazione del MPN (3 tubi per diluizione)

Numero caratteristico	MPN/g o ml	Numero caratteristico	MPN/g o ml
000	0.0	222	3.5
001	0.3	223	4.0
010	0.3	230	3.0
011	0.6	231	3.5
020	0.6	232	4.0
100	0.4	300	2.5
101	0.7	301	4.0
102	1.1	302	6.5
110	0.7	310	4.5
111	1.1	311	7.5
120	1.1	312	11.5
121	1.5	313	16.0
130	1.6	320	9.5
200	0.9	321	15.0
201	1.4	322	20.0
202	2.0	323	30.0
210	1.5	330	25.0
211	2.0	331	45.0
212	3.0	332	110.0
220	2.0	333	>110.0
221	3.0		

Riportare 1 sola
cifra decimale
nel risultato

combinazione di tubi positivi: 320

fattore di diluizione: 10^2

$$\text{MPN/ml o g} = 9,5 \times 10^2$$