

DIVISIONE DELLA CELLULA BATTERICA

Crescita batterica → aumento del numero di cellule di una popolazione

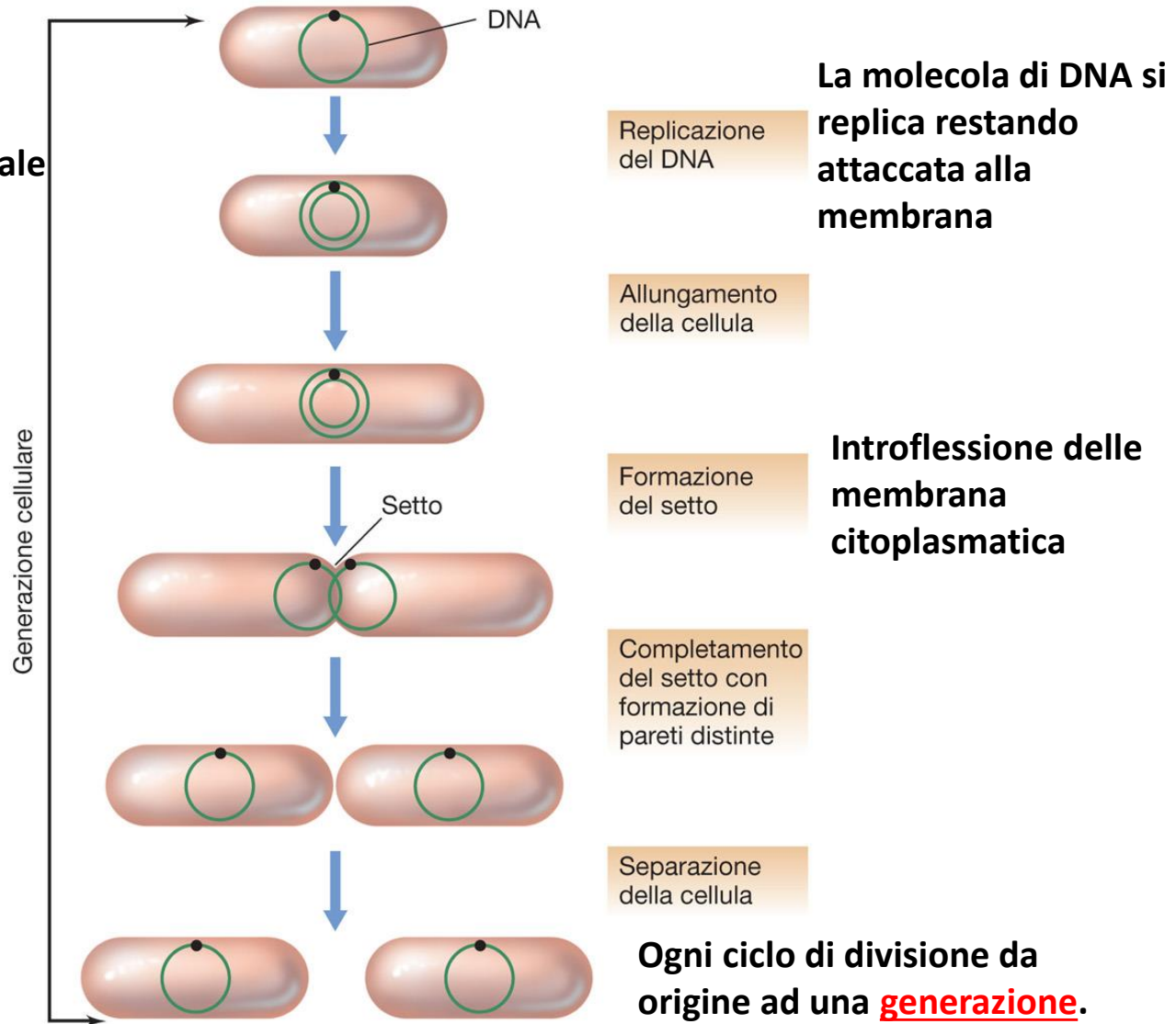
scissione binaria

Tutti i costituenti cellulari aumentano in modo proporzionale ed ogni cellula figlia riceve un intero cromosoma, copie sufficienti di macromolecole, monomeri e ioni inorganici.

Durata processo di divisione
Pochi minuti ↔ **diversi giorni**

In *E. coli* il tempo di duplicazione è ~ 20 minuti

↑
Condizioni ambientali



Nel corso della **divisione cellulare** intervengono le **proteine Fts** (proteine filamentose sensibili alla temperatura) FtsA, FtsI, FtsK, FtsZ.

Le proteine Fts sono ampiamente diffuse tra i procarioti (*Bacteria*, *Archaea*).

Le **proteine Fts** contribuiscono alla formazione del **divisoma** (apparato di divisione cellulare).

La formazione del divisoma inizia con l'attacco delle molecole **FtsZ** alla membrana, fino a formare un anello in prossimità della parte centrale della cellula dove avverrà la divisione.

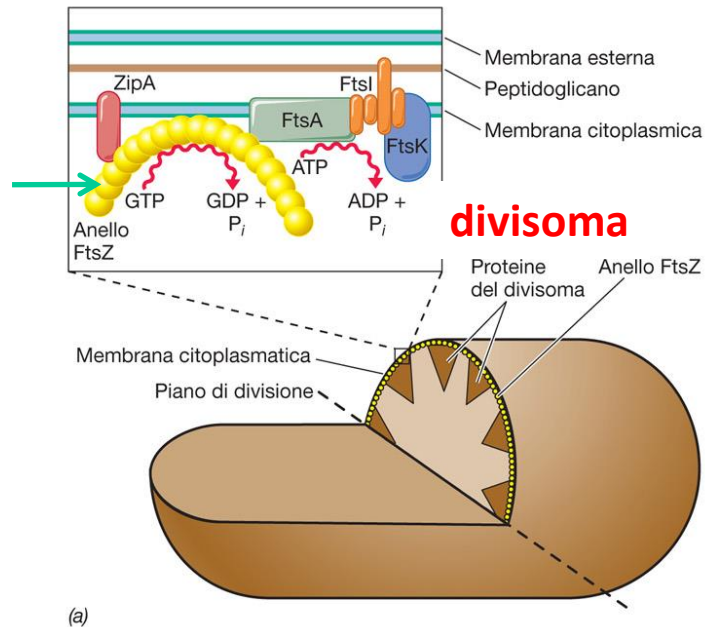
L'anello FtsZ attrae altre proteine (**FtsA** e **ZipA**).

FtsA → idrolizza l'ATP

ZipA → proteina di ancoraggio che lega FtsZ alla membrana

Il divisoma dirige la sintesi della nuova **membrana** e della **parete cellulare**, fino a raddoppiare la lunghezza della cellula in divisione.

FtsZ (analogie strutturali con la tubulina degli eucarioti)



Il **divisoma** contiene **proteine (FtsI)** per la sintesi del peptidoglicano. FtsI è una delle molecole che legano la penicillina. Anche **FtsK** partecipa alla corretta divisione cellulare.

La **replicazione del DNA** avviene prima della formazione dell'anello di proteine FtsZ.

Dopo il restringimento verso il centro della cellula, l'anello di proteine FtsZ comincia a depolimerizzarsi, ed inizia la crescita del materiale parietale verso l'interno fino ad isolare le due cellule figlie.

(b)

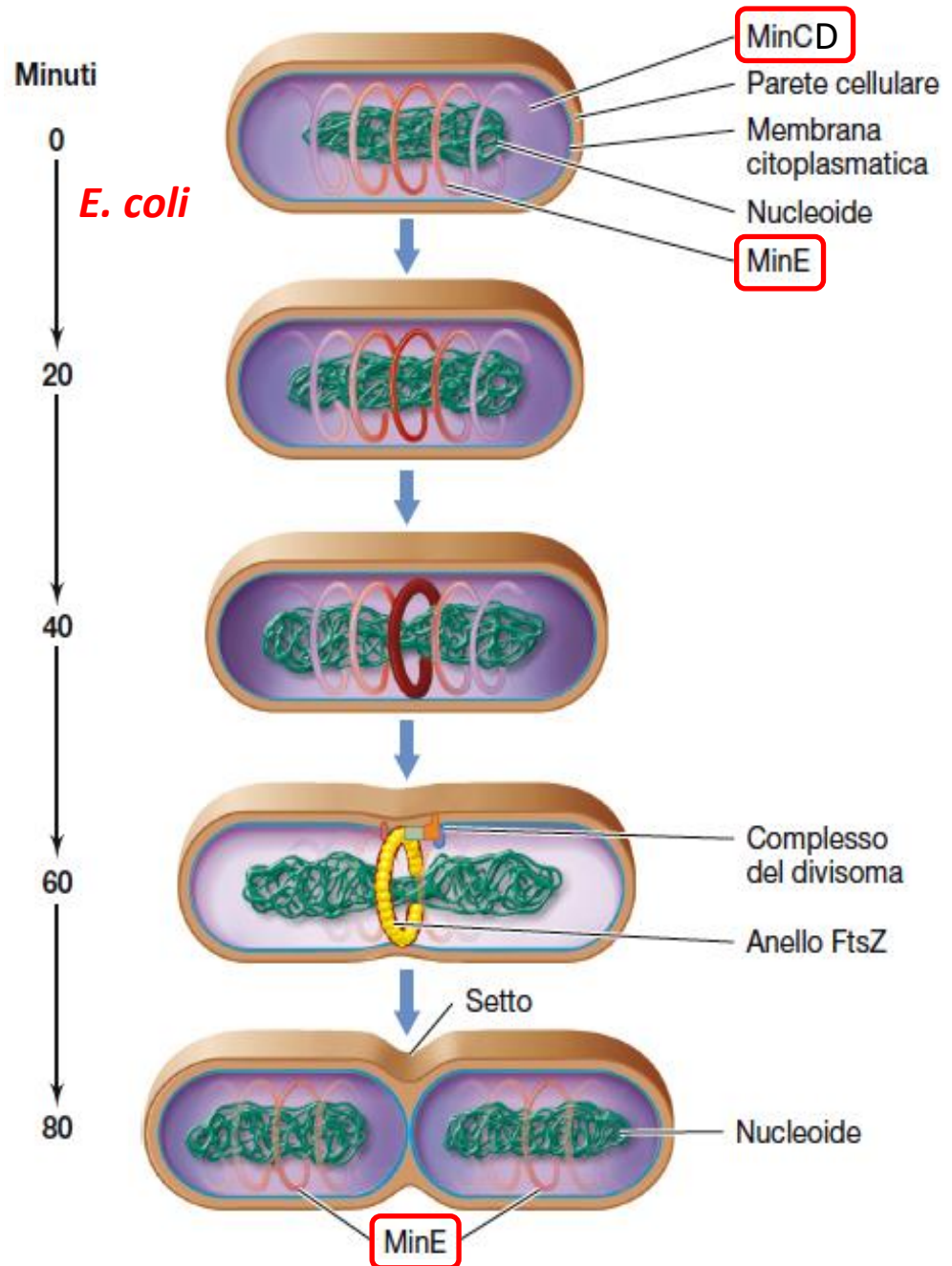
Altre proteine contribuiscono alla divisione della cellula:

MinC, **MinD** e **MinE** nel corso della divisione mantengono libera la zona mediana della cellula per consentire la formazione dell'anello FtsZ.

MinC → forma una spirale dal lato interno della membrana citoplasmatica ed **inibisce** la formazione precoce dell'anello FtsZ.

MinD → forma una struttura a spirale dal lato interno della membrana citoplasmatica ed **aiuta a posizionare MinC**, inibendo la formazione dell'anello FtsZ.

MinE → forma una spirale che spinge verso i poli **MinCD** e **controlla il posizionamento e la sintesi dell'anello FtsZ**.



Il **peptidoglicano**, assieme a proteine specifiche (**MreB**), definisce la forma della cellula batterica.

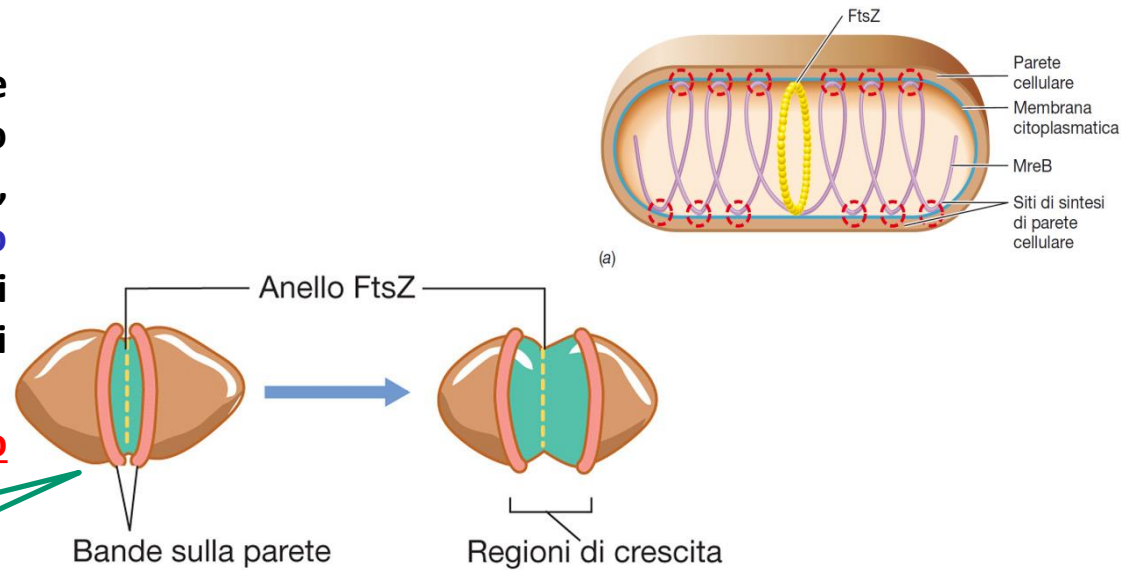
MreB contribuisce alla formazione di un **citroscheletro actino-simile** al di sotto della membrana citoplasmatica.

Nelle cellule bastoncellari (o con altre morfologie) le proteine **MreB**, formando delle bande filamentose spiraliformi, generano delle **forze che spingono contro la membrana citoplasmatica**. La sintesi del peptidoglicano avviene nei punti di contatto, lungo l'asse longitudinale.

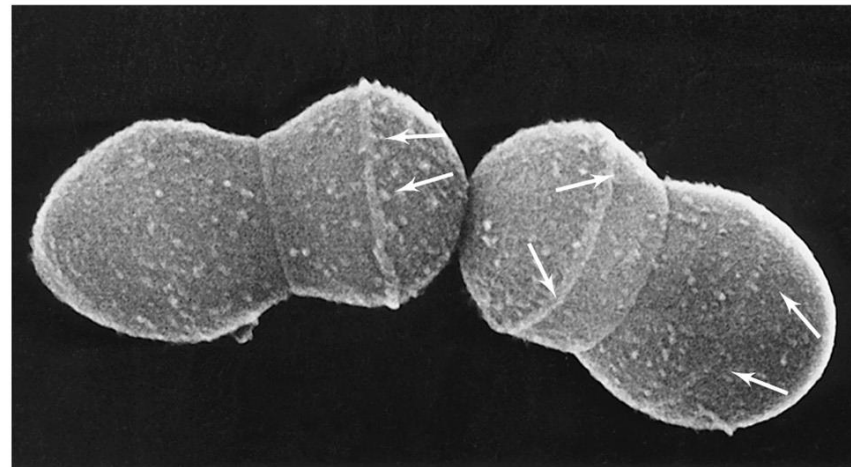
Nei batteri a forma di cocco non sono state osservate MreB.

Nei batteri di forma sferica (cocchi G+) la sintesi della parete cellulare avviene in direzioni opposte all'anello FtsZ.

Le **autolisine**, presenti nel divisoma, provocano delle piccole fessure nella struttura macromolecolare della parete attraverso le quali viene aggiunto il materiale di nuova sintesi.



(a)



(b)

A. Urmeda and K. Amako

Durante la crescita cellulare la sintesi di nuovo peptidoglicano richiede l'azione delle **autolisine** su quello preesistente e la contemporanea inserzione dei precursori peptidoglicanici.

Durante questa fase è importante il ruolo svolto dal **bactoprenolo**, una molecola idrofobica con funzioni di trasporto.

Bactoprenolo → trasporto dei precursori del peptidoglicano attraverso la membrana

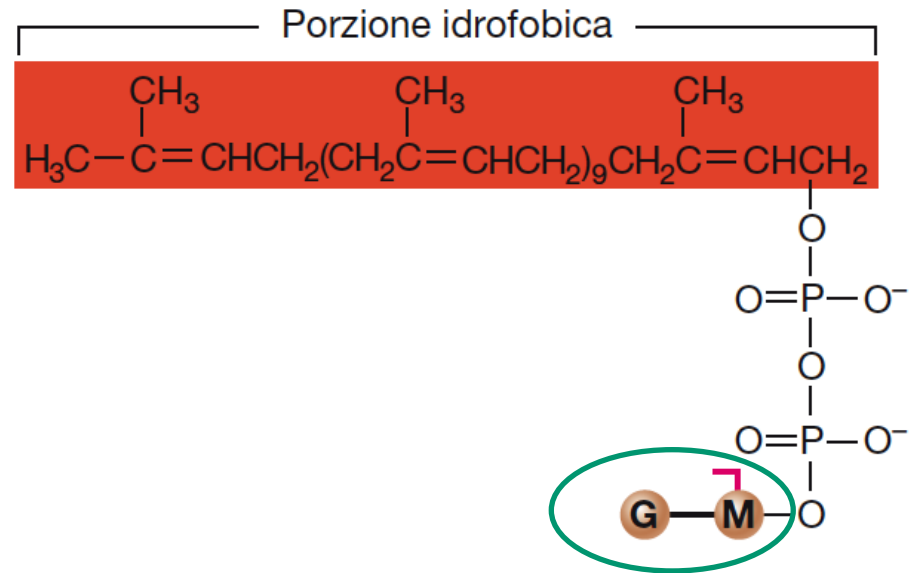


Figura 5.6 Bactoprenolo (undecaprenolo difosfato).

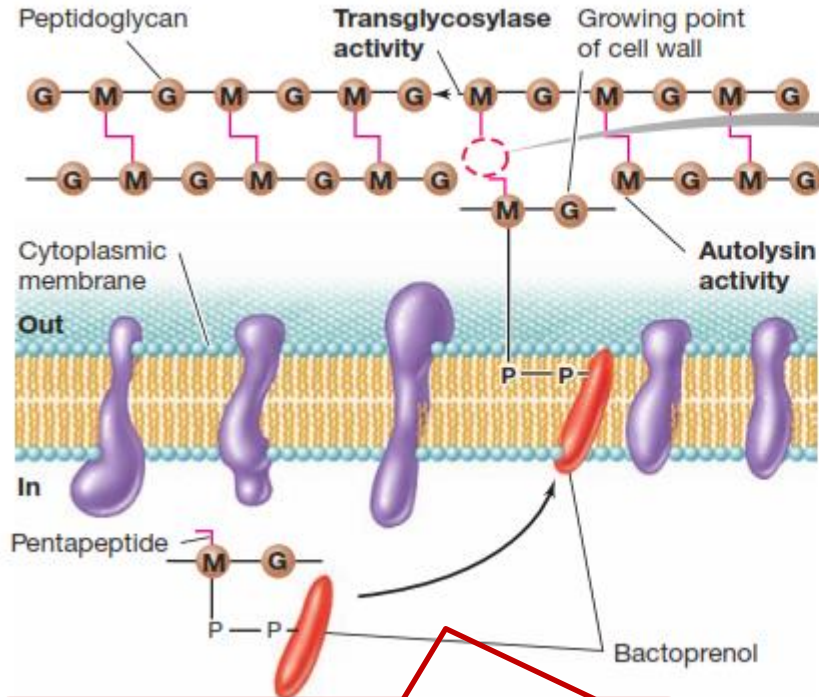
Queste molecole altamente idrofobiche trasportano precursori del peptidoglicano attraverso la membrana citoplasmatica.

Il **bactoprenolo** lega

N-actilglucosamina, acido N-acetilmuramico ed un pentapeptide

Polimerizzazione (transglicosilasi) → legami β -1,4
Transpetidazione (transpetidasi) → legami crociati

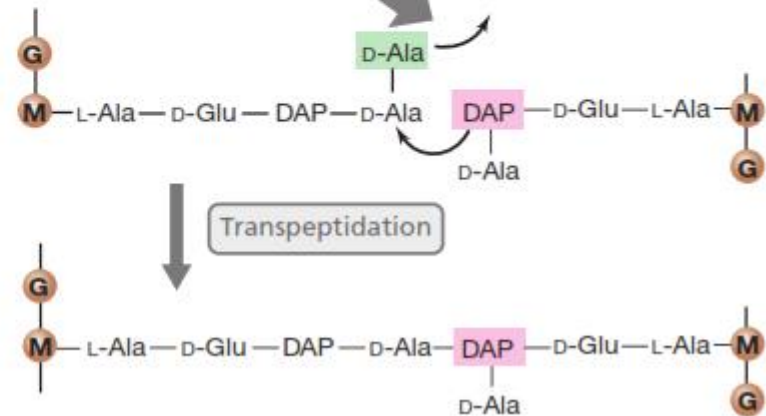
TRANSGLICOSILAZIONE



Il **bactoprenolo** permette ai precursori del peptidoglicano di attraversare la membrana, rendendoli idrofobici.

Nel periplasma il bactoprenolo interagisce con gli enzimi che intervengono nell'inserzione dei precursori nel punto di crescita della parete cellulare.

L'eliminazione di un residuo di D-Ala fornisce energia necessaria per la formazione del legame crociato. La reazione avviene all'esterno della membrana citoplasmatica (assenza di ATP).



TRANSPETIDAZIONE

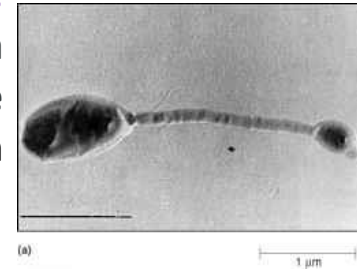
La fase finale consiste nella formazione dei **legami peptidici crociati** tra residui di acido muramico di catene adiacenti di peptidoglicano.

La **Penicillina** inibisce la transpetidazione!

Alternative Patterns of Cell Division

Binary fission is the most common pattern of cell division in prokaryotes, but it is not the only one. Other mechanisms usually involve asymmetrical division (as in budding) or production of spores in aerial filaments.

In some cyanobacteria, many nucleoids may accumulate in an enlarged round cell or along a filament, leading to the generation of many new cells at once. The new cells often split from the parent filament and float away in a process called fragmentation. Fragmentation is commonly observed in the **Actinomycetes**, a group of gram-positive, aerobic bacteria commonly found in soil. Another curious example of cell division in prokaryotes, reminiscent of live birth in animals, is exhibited by the giant bacterium ***Epulopiscium***. Several daughter cells grow fully in the parent cell, which eventually disintegrates, releasing the new cells to the environment. Other species may form a long narrow extension at one pole in a process called budding. The tip of the extension swells and forms a smaller cell, the bud that eventually detaches from the parent cell. Budding is most common in yeast, but it is also observed in **prosthete bacteria** and **some cyanobacteria**.

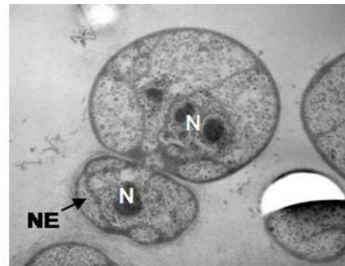


Frammentazione



(a)

Gemmazione (lieviti)



(b)

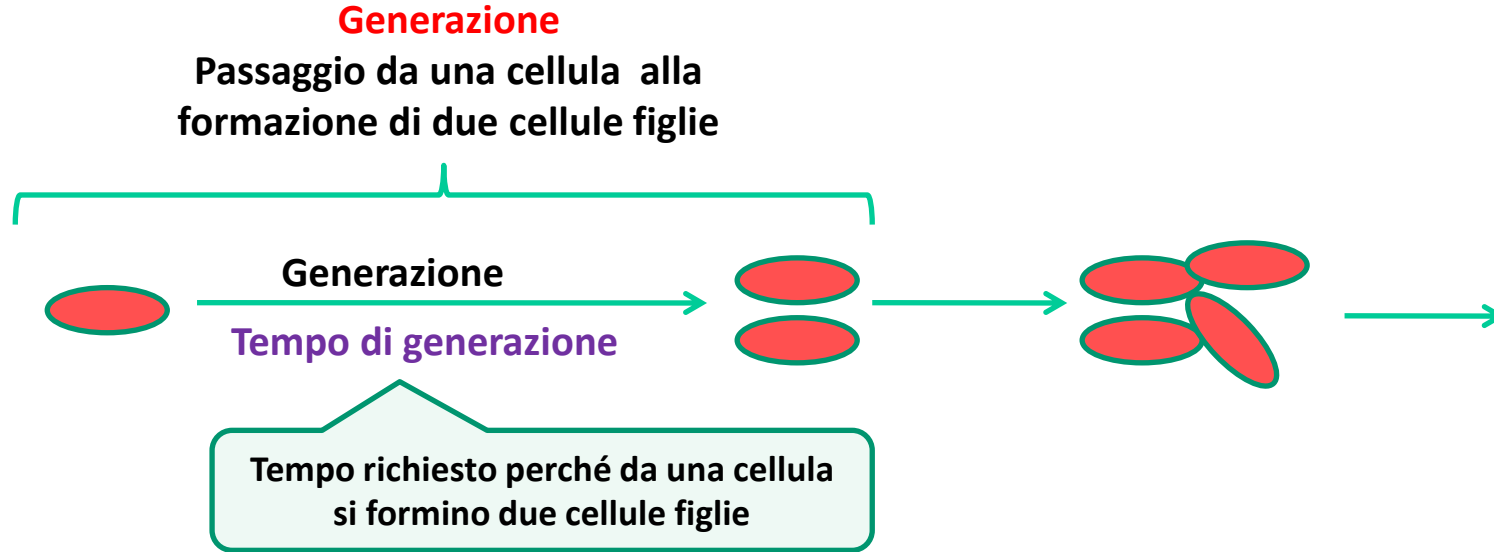
a) **Filamentous cyanobacteria**, like those pictured here, replicate by **fragmentation**. (b) In this electron micrograph, cells of the **bacterium *Gemmata obscuriglobus*** are **budding**. The larger cell is the mother cell. Labels indicate the nucleoids (N) and the still-forming nuclear envelope (NE) of the daughter cell. (credit a: modification of work by CSIRO; credit b: modification of work by Kuo-Chang Lee, Rick I Webb and John A Fuerst)

<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/how-microbes-grow/>

CRESCITA MICROBICA

Aumento del numero di cellule

Durante il ciclo di divisione tutti i componenti strutturali della cellula raddoppiano.



In una **popolazione** il tempo richiesto per la sua duplicazione è definito **tempo di generazione o di duplicazione**.

I tempi di generazione sono diversi da un microrganismo ad un altro (6 minuti – diversi giorni).

Se una cellula batterica si divide ogni 30', dopo 10 ore quanti batteri avremo?



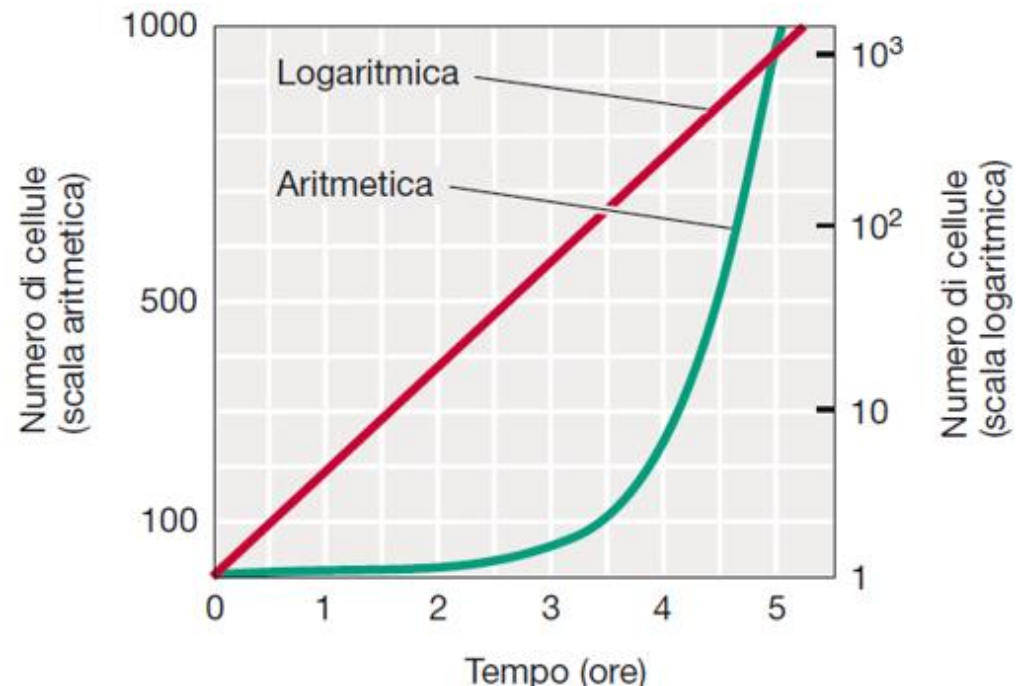
Velocità di crescita di una coltura batterica

Tempo (ore)	Numero totale di cellule
0	1
0,5	2
1	4
1,5	8
2	16
2,5	32
3	64
3,5	128

Se si riporta la crescita microbica su un grafico in **scala aritmetica** si ottiene una curva con una pendenza che aumenta in modo costante (modello esponenziale).

Utilizzando una **scala logaritmica** si ottiene una retta che evidenzia una crescita di tipo esponenziale.

Questo modello di crescita, in cui una coltura batterica raddoppia il numero di cellule in un dato intervallo di tempo costante, è detto **CRESCITA ESPONENZIALE**.



Durante la crescita esponenziale la velocità di **incremento del numero di cellule** è bassa nella fase iniziale, ma aumenta sempre di più con il passare del tempo.

La scala semilogaritmica consente di calcolare il **tempo di generazione (g)** → in quanto tempo la cellula si replica?

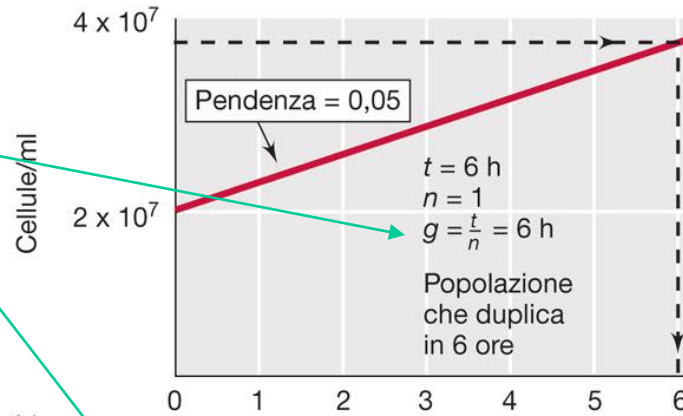
In fase di crescita esponenziale, la **pendenza delle rette** è uguale a $0,301/g$

L'aumento del numero di cellule durante la crescita esponenziale di una coltura batterica è una **progressione geometrica in base 2**.

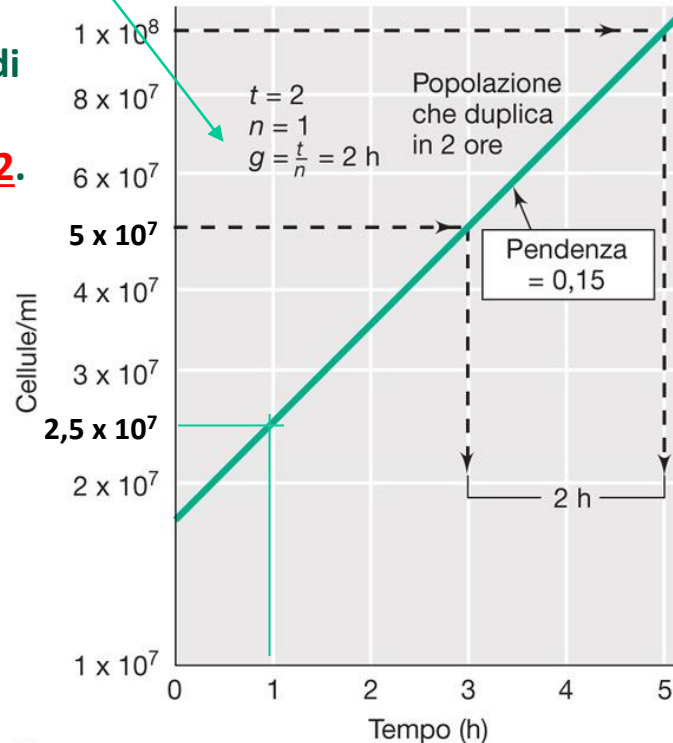
Esiste una **relazione matematica** tra il numero di cellule iniziali di una coltura (N_0) e il numero di cellule dopo un certo periodo di tempo della **crescita esponenziale (N)**:

$$N = N_0 2^n$$

N_0 = numero cellule iniziali
 n = numero delle generazioni

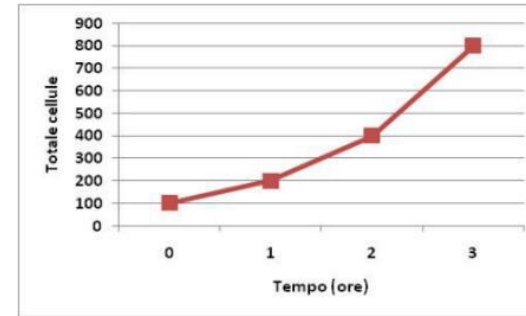


(a)



(b)

crescita esponenziale?



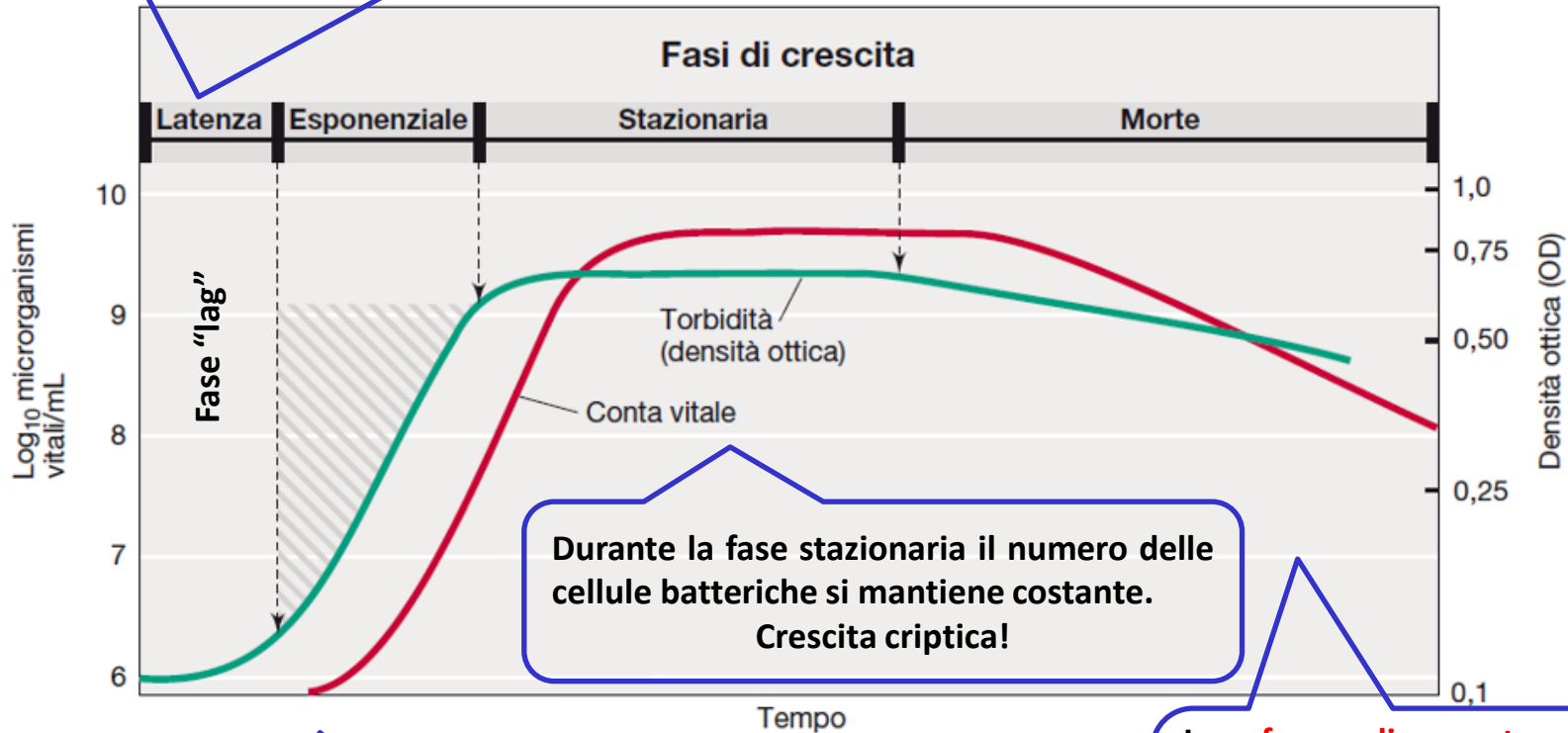
t = durata crescita esponenziale
 n = numero delle generazioni

Ciclo di crescita (curva di crescita) di una coltura batterica (popolazione) in un contenitore chiuso (coltura in "batch").

Conta microbica

Permette di seguire la crescita microbica. La **conta vitale** si basa su tecniche di coltivazione dei microrganismi. La **densità ottica** (torbidità) è una misura quantitativa della luce riflessa dai microrganismi in una coltura liquida.

La **fase lag** (fase di latenza) può essere più o meno lunga. Le cellule inizialmente non hanno quantità ottimali di enzimi, coenzimi o altri componenti essenziali per la crescita.



Durante la fase stazionaria il numero delle cellule batteriche si mantiene costante. Crescita criptica!

Cellule nel migliore stato metabolico. La velocità della **crescita esponenziale** dipende dalle caratteristiche del microrganismo e dalle condizioni di crescita.

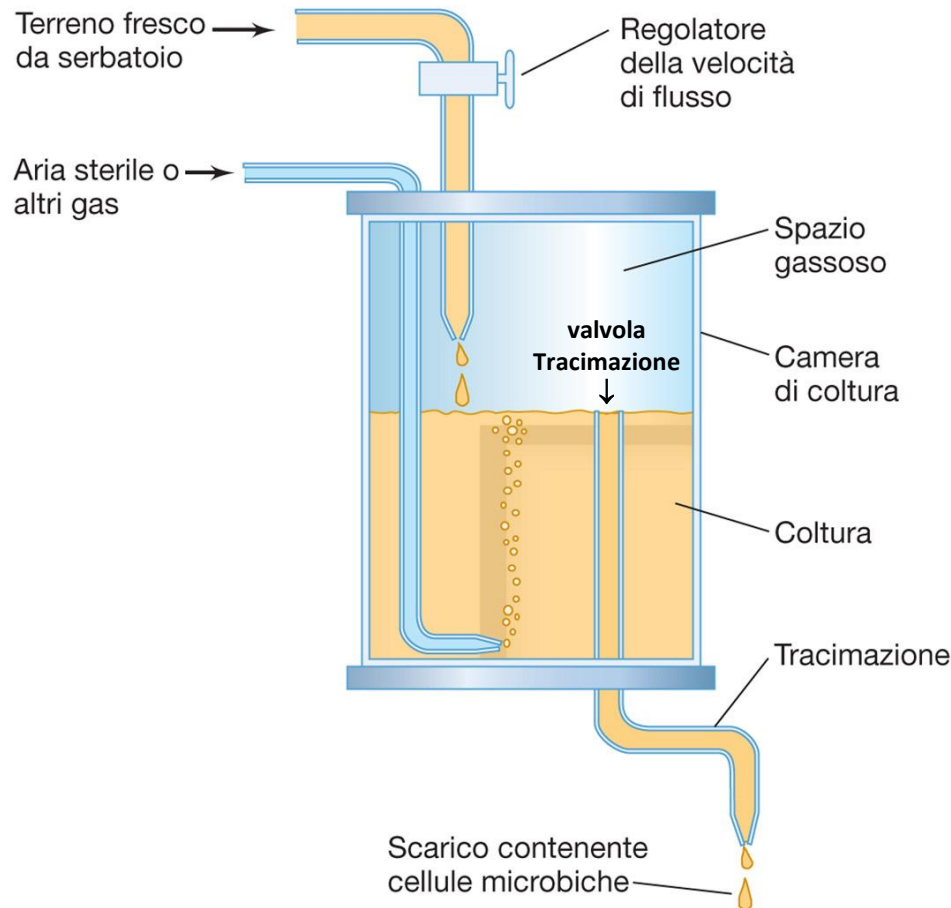
La **fase di morte** ha un andamento esponenziale, con una velocità più lenta rispetto alla fase esponenziale precedente.

CHEMOSTATO

Mantenimento cellule in fase esponenziale

Viene immesso continuamente terreno fresco e, contemporaneamente, viene rimosso lo stesso volume di brodocoltura (**sistema aperto**).

Un **volume noto** di terreno fresco viene immesso a **velocità costante**.



Consente di mantenere costante

- la composizione chimica del sistema,
- il volume della coltura,
- la fase di crescita
- il numero delle cellule.

Quando restano costanti

- volume della brodocoltura,
 - numero di cellule,
 - concentrazione di nutrienti/scarti
- il sistema ha raggiunto una **condizione di equilibrio dinamico** (*steady-state*).

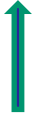
Coltura continua

È possibile controllare/monitorare

- pH
- Temperatura
- Composizione atmosfera
- ...

Il sistema consente di eseguire prelievi della coltura, in condizioni di sterilità, su cui eseguire delle misure.

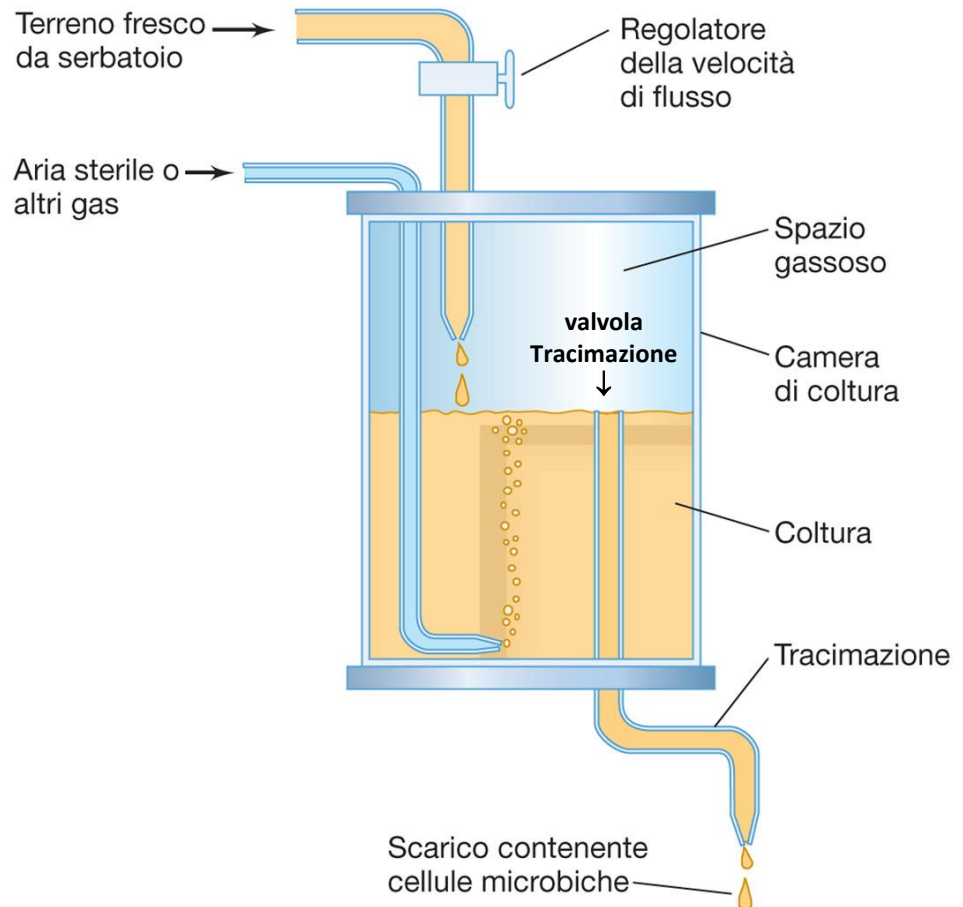
Il chemostato consente di controllare indipendentemente velocità di crescita e densità cellulare (biomassa)



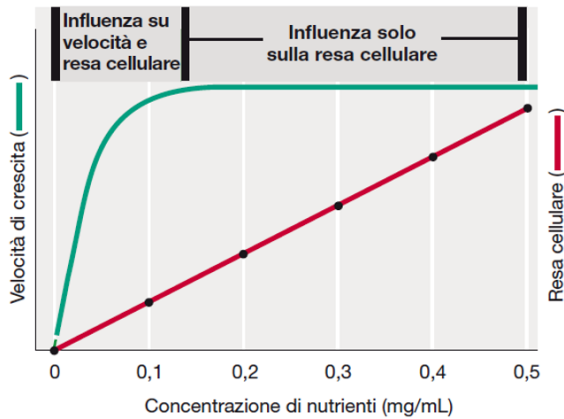
Flusso (volume/tempo) di terreno fresco immesso (Velocità di diluizione)



Concentrazione nutriente limitante (fonte di energia, azoto, fosforo, ...)



La velocità di crescita e la resa cellulare sono influenzate solo a basse concentrazioni di nutrienti



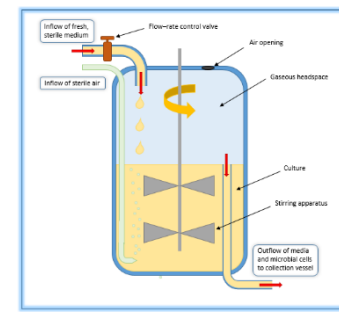
Regolando la **velocità di diluizione (flusso)** è possibile mantenere colture alla stessa densità di popolazione (concentrazione), anche se le cellule presentano velocità di crescita diverse.

Il chemostato consente di mantenere per lungo tempo le cellule in **fase esponenziale di crescita (crescita continua)**.

Applicazioni del chemostato

- Studi di fisiologia batterica
- Studi sulla frequenza delle mutazioni
- Isolamento di batteri

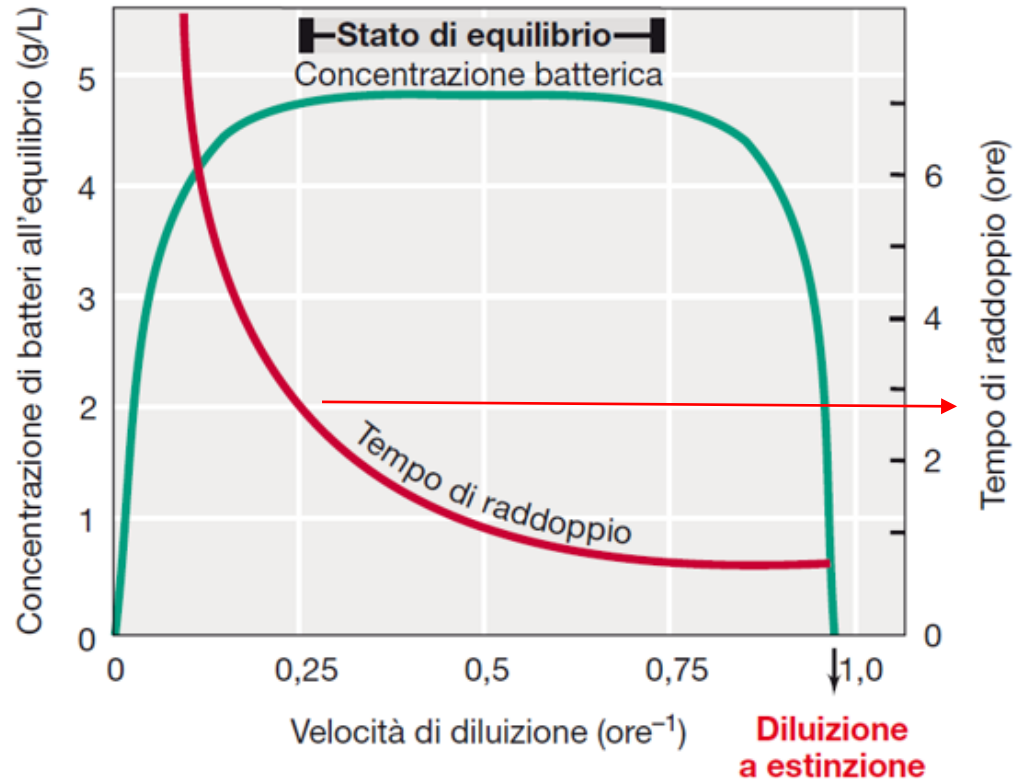
Chemostato



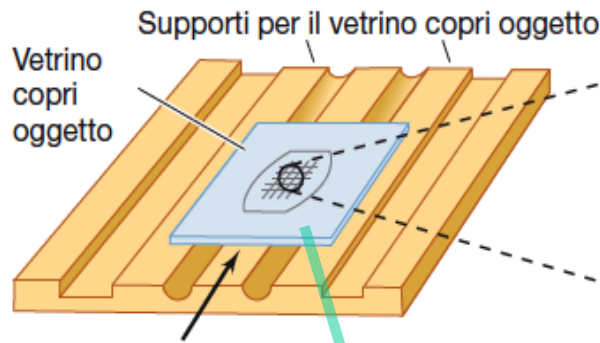
Relazione tra

- velocità di diluizione (**flusso**),
- velocità di crescita (**tempo di generazione o duplicazione**)
- densità di popolazione (**concentrazione batterica**)

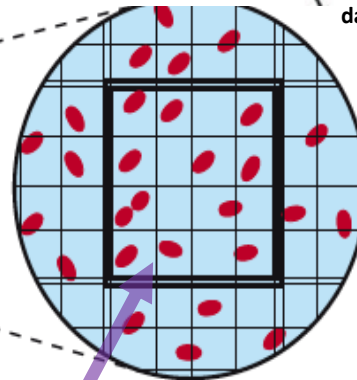
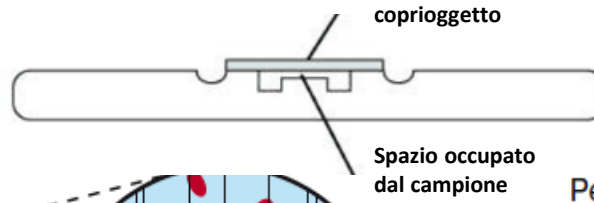
Durante lo stato di equilibrio la concentrazione batterica può restare costante anche se varia la velocità di crescita



CONTA MICRORGANISMI camera di conta (al microscopio)



Il campione viene introdotto da qui, evitando un eccesso di liquido. Lo spazio tra il vetrino copri oggetto e il fondo è di 0,02 mm ($\frac{1}{50}$ mm). L'intera griglia ha 25 quadrati grandi che coprono un'area totale di 1 mm², corrispondente a un volume totale di 0,02 mm³.



Osservazione microscopica; si contano tutte le cellule (12 in questa immagine) in un quadrato grande (16 quadrati piccoli). La conta è effettuata in diversi quadrati grandi e poi si determina la media dei conteggi.

Per calcolare il numero di cellule per mL di campione:
12 cellule × 25 quadrati grandi × 50 × 10³

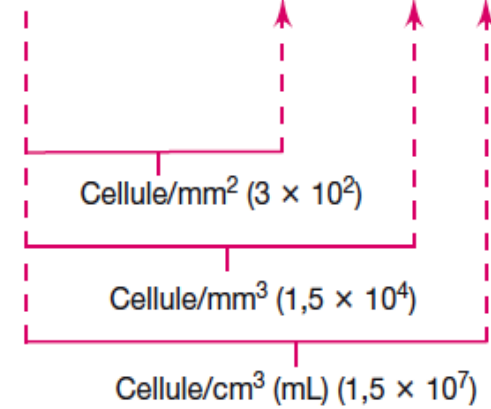
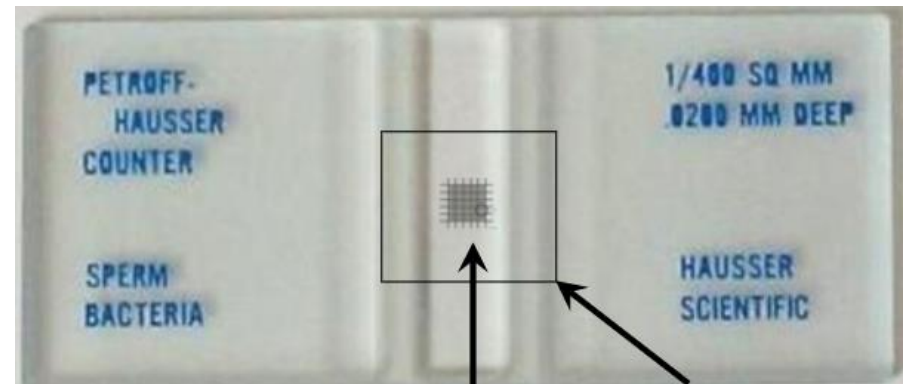
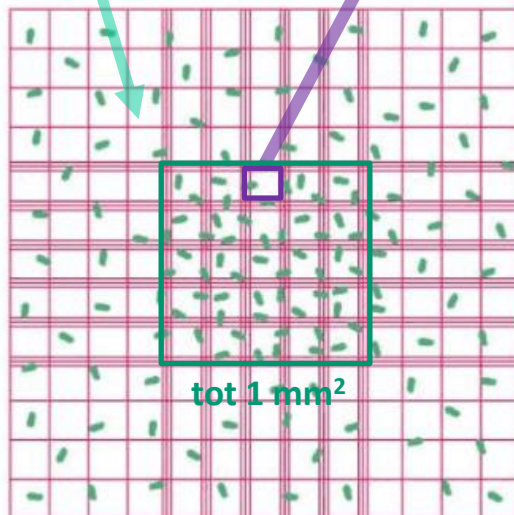


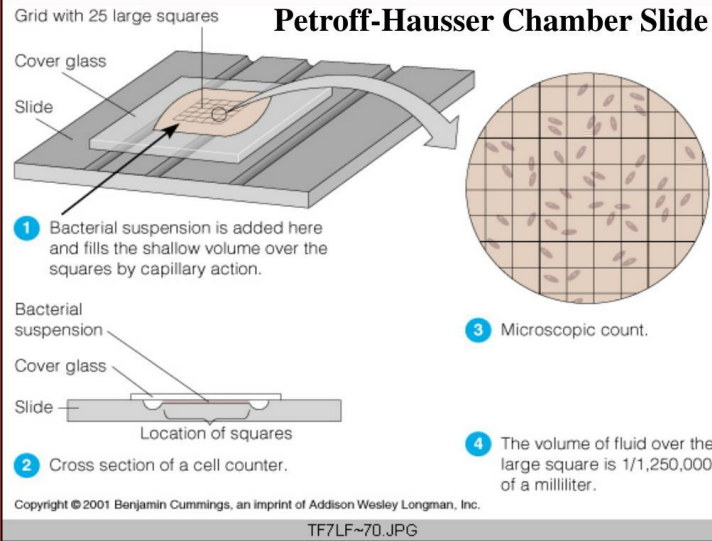
Figura 5.14 Procedura di conta diretta al microscopio usando la camera di conta Petroff-Hausser. Per contare le cellule senza colorarle viene utilizzato un microscopio a contrasto di fase.

Tecnica veloce, ma non molto affidabile!

25 quadrati
(tot 1 mm²)

ognuno diviso in
16 quadrati più piccoli



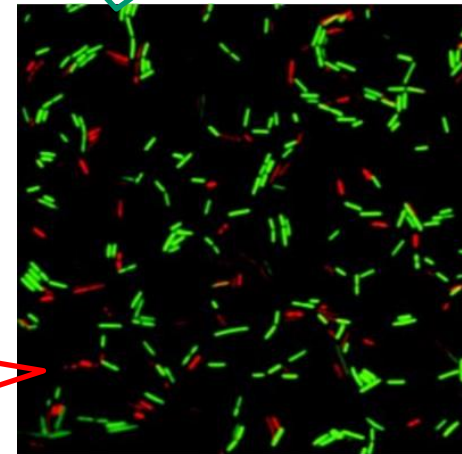


Con questa tecnica di conta microscopica non sono distinguibili i batteri vivi da quelli morti!

NucView Green is a green-fluorescent nucleic acid dye (it passes through the cell membrane of bacteria easily): bacteria with intact cell membranes is stained fluorescent green.

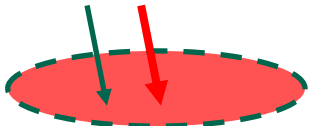
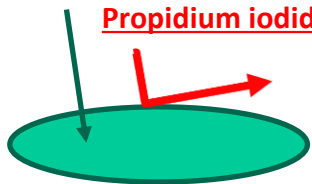
CONTA CON MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

Bacteria Cell Viability Kit provides two-color fluorescence staining on both **live (green)** and **dead (red)** bacteria using two probes: NucView Green and Propidium iodide.



NucView Green

Propidium iodide



Propidium iodide is a red-fluorescent nucleic acid dye (it can only enter bacteria with damaged cell membranes): bacteria with damaged cell membranes is stained fluorescent red.

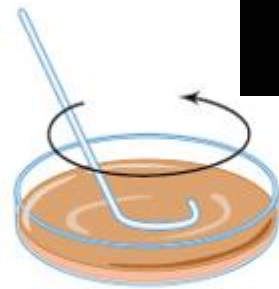
Possono essere usate anche sonde marcate con coloranti fluorescenti che mettono in evidenza batteri con geni specifici (attività enzimatiche).

Conta microrganismi → CONTA VITALE o conta in piastra (terreno di coltura solido)

Metodo di piastramento in superficie



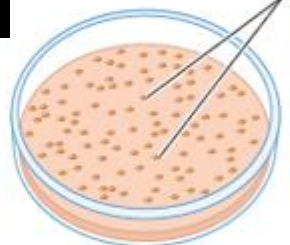
Il campione (0,1 mL o meno) viene pipettato sulla superficie di una piastra di terreno solido



Il campione viene distribuito uniformemente sulla superficie del terreno usando un'ansa sterile

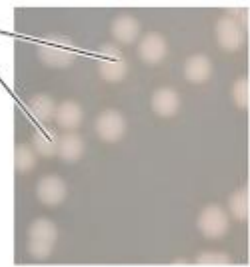


Incubazione



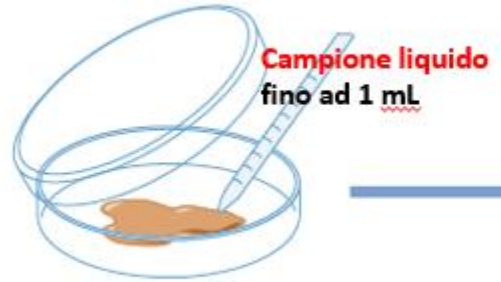
Tipico risultato del piastramento in superficie

Colonie sulla superficie



Deborah O. Jung

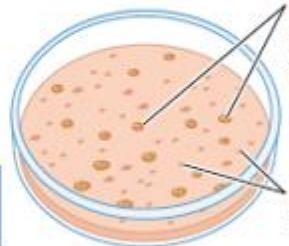
Metodo di piastramento per inclusione



Il campione è pipettato in una piastra sterile



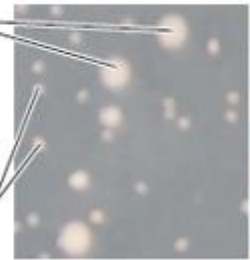
Aggiunta di terreno di coltura sterile e miscelazione con l'inoculo



Tipico risultato del piastramento per inclusione

Colonie sulla superficie

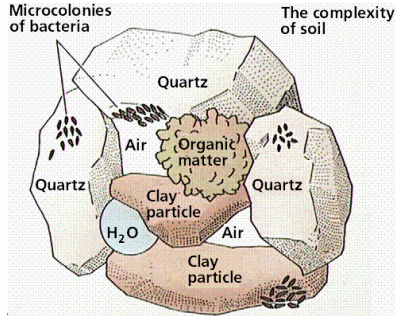
Colonie incluse



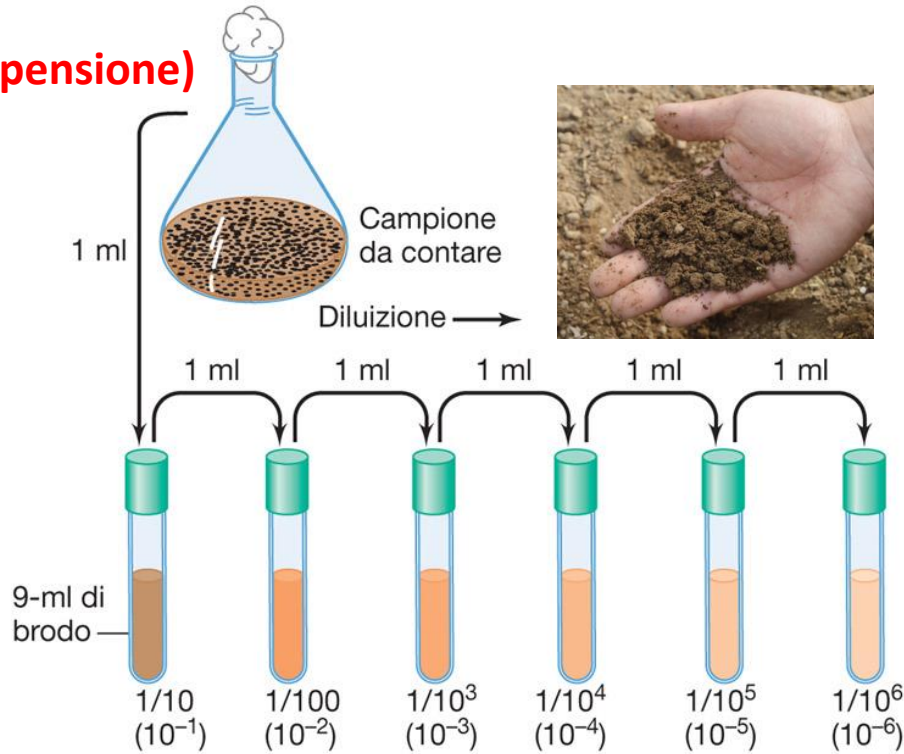
Deborah O. Jung

Conta microrganismi da un campione di suolo

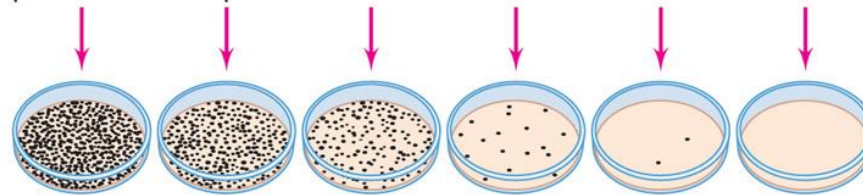
Dispersione batteri (sospensione)



Diluizione campione



Campioni di 1 ml su piastra



Troppe colonie per essere contate

$$159 \times 10^3 =$$

Conta in piastra
Fattore di diluizione

$$1.59 \times 10^5$$

Cellule (unità formanti colonia) presenti in 1 ml del campione originario

Prelievo campione



milioni di batteri per grammo di suolo

Semina diluizioni

Incubazione piastre

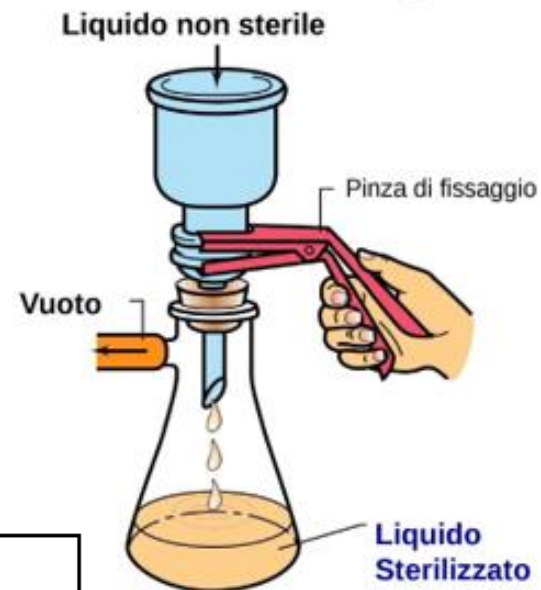
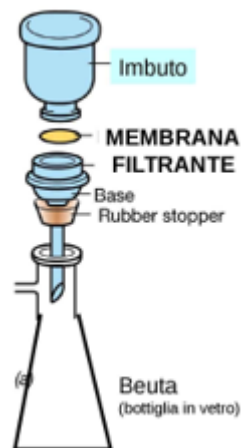
Lettura piastre ed espressione risultati

La «grande anomalia della conta in piastra»



manca di perfetta correlazione tra conta microscopica e conta in piastra!

Decreto legislativo 02 febbraio 2001 , n. 31
 Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla
qualità delle acque destinate al consumo umano
 (G.U. Serie Generale , n. 52 del 03 marzo 2001)



Parametri microbiologici

Parametro	Valore di parametro (numero/100ml)
Escherichia coli (E. coli)	0
Enterococchi	0

Per le acque messe in vendita in bottiglie o contenitori sono applicati i seguenti valori:

Parametro	Valore di parametro
Escherichia coli (E.coli)	0/250 ml
Enterococchi	0/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	0/250 ml
Conteggio delle colonie a 22°C	100/ml
Conteggio delle colonie a 37°C	20/ml

Batteri coliformi ed Escherichia coli (E. coli) (ISO 9308-1)

Enterococchi (ISO 7899-2)

Pseudomonas aeruginosa (prEN ISO 12780)

Enumerazione dei microrganismi coltivabili – conteggio delle colonie a 22° C (prEN ISO 6222)

Enumerazione dei microrganismi coltivabili – conteggio delle colonie a 37° C (prEN ISO 6222)



Conta microrganismi in campione liquido filtrabile



Membrana pori → 0,45/0,2 μm



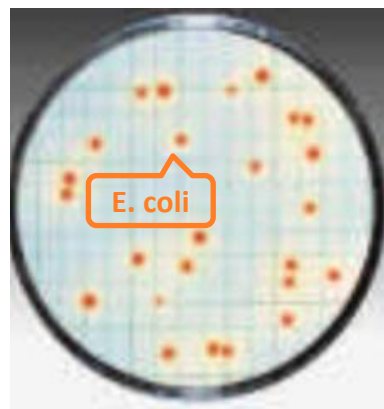
Rampa di filtrazione

Pompa da vuoto

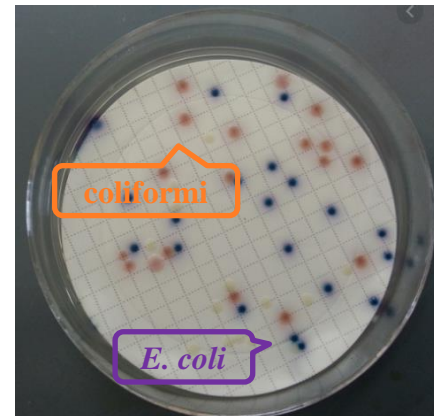
Beuta da vuoto (per raccogliere l'acqua ed evitare che passi nel pompa)



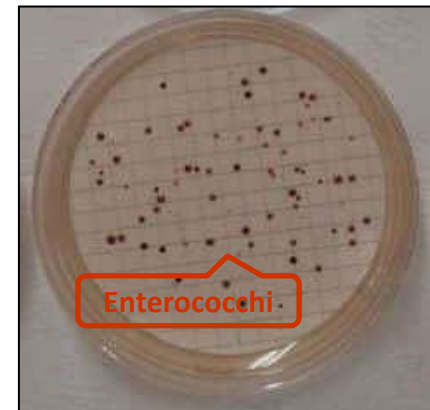
M-Endo Agar LES



TTC Tergitol 7 Agar



Chromocult Coliform Agar



Slanetz-Bartley Agar

Conta microrganismi → CONTA VITALE in brodo (terreno di coltura liquido)

Soprattutto nel caso di campioni solidi

MPN?

**Esempio di normativa che richiama espressamente
la conta dei microrganismi mediante la tecnica MPN**

REGOLAMENTO (CE) N. 2074/2005 DELLA COMMISSIONE

... I progressi scientifici hanno portato all'adozione della **norma ISO 16649-3 come metodo di riferimento riconosciuto per l'analisi di *E. coli* nei molluschi bivalvi.**

Tale metodo di riferimento è già in uso per i molluschi bivalvi vivi provenienti da zone di produzione di classe A, conformemente al regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione (1) sui criteri microbiologici per i prodotti alimentari. Di conseguenza, **la norma ISO 16649-3 deve costituire il metodo MPN (numero più probabile) di riferimento anche per l'analisi di *E. coli* nei molluschi bivalvi** provenienti da zone di classe B e C.

L'impiego di altri metodi può essere autorizzato soltanto se tali metodi sono considerati equivalenti al metodo di riferimento.

...

CONTA BATTERI (di solito, in terreno liquido)

La validità del conteggio è indipendente dal tipo di terreno utilizzato, purché questi sia adatto alla crescita dello specifico organismo da contare.

Principi su cui si basa il metodo

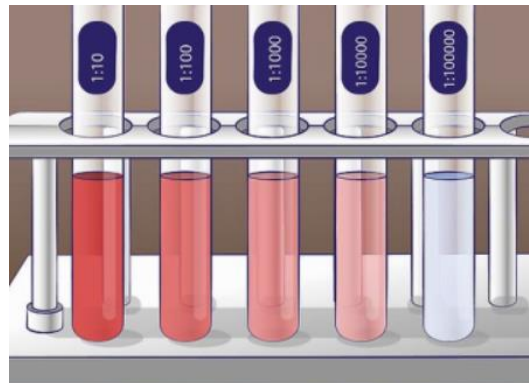


- Una singola cellula viva, inoculata in terreno di coltura, si moltiplica producendo un effetto visibile ad occhio nudo: torbidità, produzione di acido o gas (brodo), formazione di colonie (terreni solidi), etc.
- L'effetto visibile rilevato alla diluizione più spinta è derivato dalla replicazione di una sola cellula batterica.

MPN (Most Probable Number) numero medio più probabile.

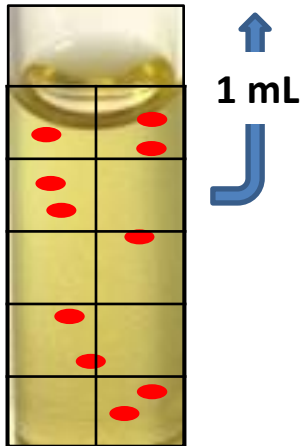
Numero batteri/mL dopo diluizione 1000 100 10 1 0

Il campione viene diluito in serie fino al punto in cui restano pochi o nessun batterio; le diluizioni seriali vengono, poi, inoculate in altrettante provette contenenti un terreno di crescita adatto.



Poiché il fenomeno non è sempre ripetibile, specialmente nel caso di sospensioni con poche cellule, ciò può costituire causa di errore; occorre, quindi, mediare i risultati effettuando ripetute analisi (repliche) sullo stesso campione.

Pertanto questo metodo non garantisce una precisione assoluta, ma solo statistica.



In base al numero di repliche effettuate (3, 5 o 10) per ogni diluizione, è possibile valutare il numero di batteri consultando specifiche tabelle statistiche (tabelle McCrady).

ESECUZIONE TECNICA MPN

- Eeguire una diluizione 10^{-1} (1:10) del campione. Omogeneizzare delicatamente il campione e trasferirne 1 mL o 1 g in una provetta per diluizione contenente 9 ml di diluente .

- Agitare bene la provetta 10^{-1} e trasferire asepticamente 1 mL della sospensione ad una seconda provetta con 9 ml di diluente (→ diluizione 10^{-2}). Agitare la provetta 10^{-2} per disperdere uniformemente i batteri nel liquido e procedere con le diluizioni successive seguendo lo stesso schema.

- Allestire un numero sufficiente di provette contenenti il terreno di coltura (con campanella Durham, nel caso si voglia rilevare anche la produzione di gas). Per una conta MPN basata su 3 repliche, per cui si prevedono di inoculare 1, 0,1, 0,01 e 0,001 mL o g del campione, sono necessarie **12 provette** (3 provette per ogni volume dei inoculo).

- Trasferire 1 ml o 1 g dal campione tal quale e 1 ml da ciascuna delle diluizioni ($10^{-1}, 10^{-2}, \dots$) nelle rispettive provette contenenti il terreno di coltura.

- Incubare le provette alla temperatura richiesta e per il tempo necessario.

- Dopo incubazione osservare le provette per valutarne la positività (torbidità, produzione di acido e/o di gas, variazione di colore, etc.) e registrare i risultati.

- Individuare, la diluizione più spinta alla quale tutte le repliche sono positive e sommare, da questa posizione, tutti i tubi positivi in ognuna delle 2 diluizioni successive: si otterrà un numero caratteristico a 3 cifre (es. 321) da utilizzare nella consultazione delle tabelle statistiche.

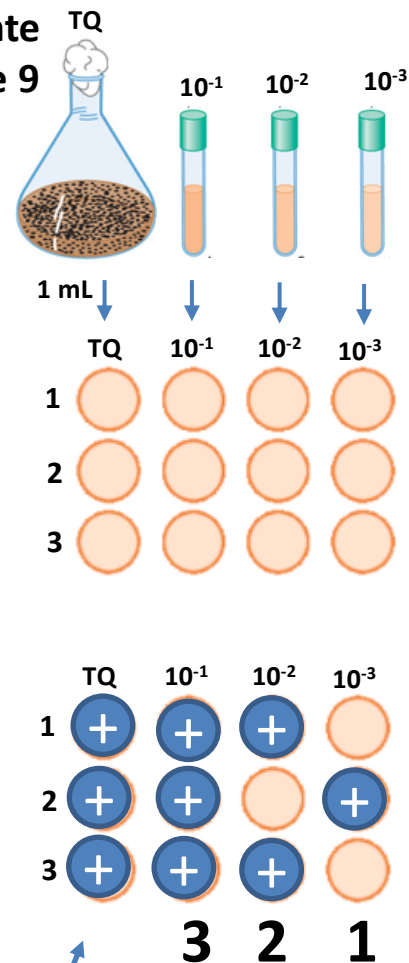


Tabella 2 - Valori MPN (Mac Crady)

valori per un inoculo del campione di: 3x1; 3x0,1; 3x0,01 g o ml

MPN: espressione risultati

... si otterrà un numero caratteristico a 3 cifre (es. **321**), in base al quale, dopo consultazione delle tabelle statistiche e moltiplicazione per il **fattore di diluizione**, si può risalire al numero di batteri/mL o g espresso come **MPN/mL** o **MPN/g**.

321

15 x 10 → 150 MPN/ml

Fattore diluizione

Numero caratteristico	MPN per g	categoria	Limiti di confidenza			
			95 %		99 %	
000	<0,3	-	0,0	0,94	0,0	1,4
001	0,3	3	0,01	0,95	0,0	1,4
010	0,3	2	0,01	1,0	0,0	1,6
011	0,61	0	0,12	1,7	0,05	2,5
020	0,62	3	0,12	1,7	0,05	2,5
030	0,94	0	0,35	3,5	0,18	4,6
100	0,36	1	0,02	1,7	0,01	2,5
101	0,72	2	0,12	1,7	0,05	2,5
102	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
110	0,74	1	0,13	2,0	0,06	2,7
111	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
120	1,1	2	0,4	3,5	0,2	4,6
121	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
130	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
200	0,92	1	0,15	3,5	0,07	4,6
201	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
202	2,0	0	0,5	3,8	0,2	5,2
210	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
211	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
212	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
220	2,1	1	0,5	4	0,2	5,6
221	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
222	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
230	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
231	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
300	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
301	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
302	6,4	3	1,6	18,1	1	25
310	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25
311	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27
312	12	3	3	36	2	44
313	16	0	3	38	2	52
320	9,3	1	1,8	36	1,2	43
321	15	1	3	38	2	52
322	21	2	3	40	2	56
323	29	3	9	99	5	152
330	24	1	4	99	3	152
331	46	1	9	198	5	283
332	110	1	20	400	10	570
333	>110	-	-	-	-	-

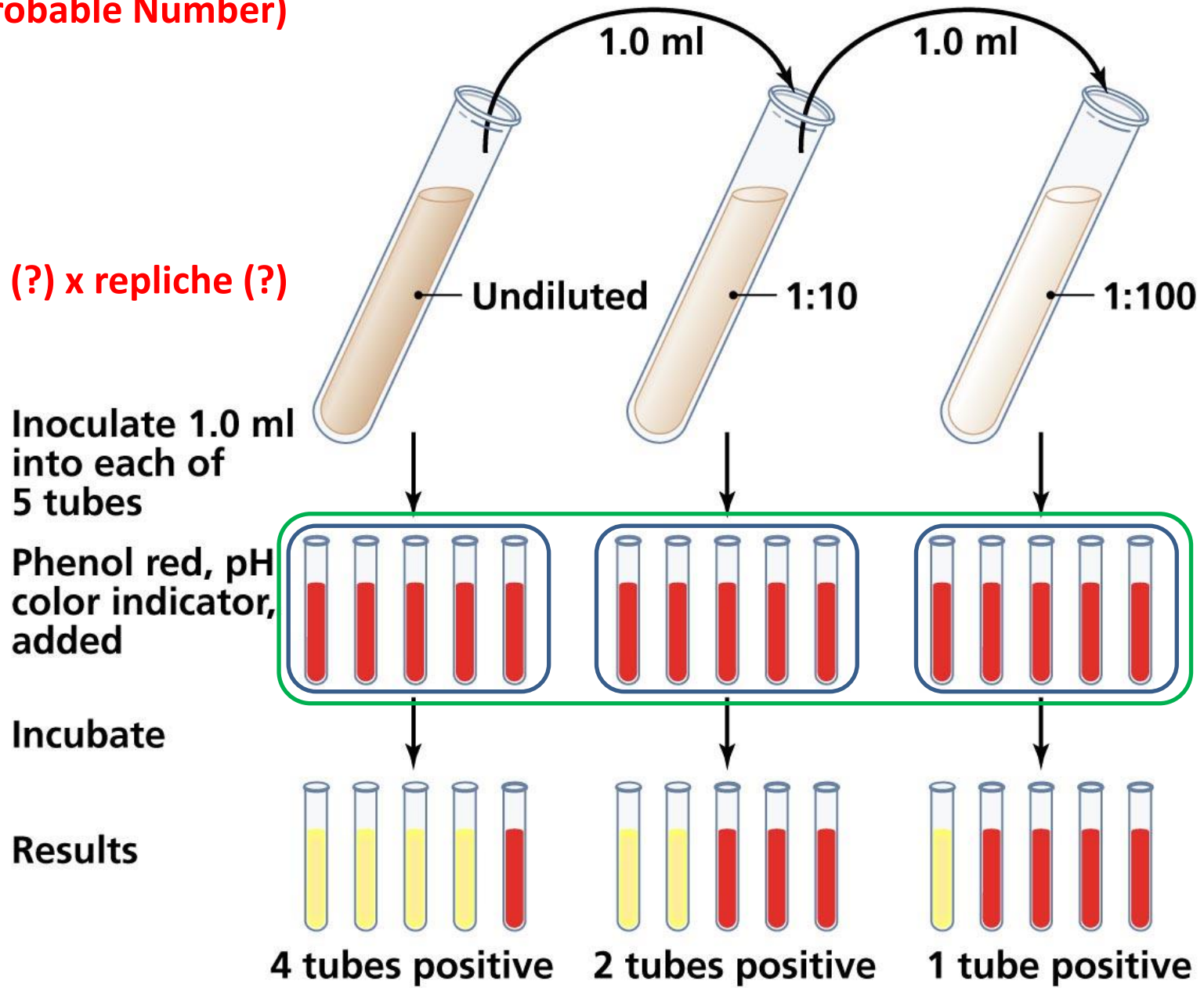
De Man J.C. MPN Tables, corrected Eur.J.Appl.Biotechnol., 1983, 17, 301-305 riportato in norme ISO 7251-1984

Significato delle categorie

La probabilità che il valore MPN ottenuto sia quello corrispondente al numero effettivo di microrganismi nel campione esaminato, va decrescendo quando si passa dalla categoria 1 alle successive (nell'ordine: 2, 3, 0).

MPN (Most Probable Number)

Diluizioni (?) x repliche (?)

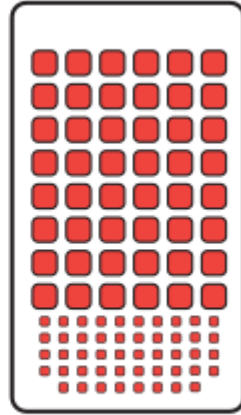


15-Tube Serial Dilution



diluent
 sample

Quanti-Tray/2000



no diluent needed
 sample

2. Quantification



1 Add Reagent to sample and mix well



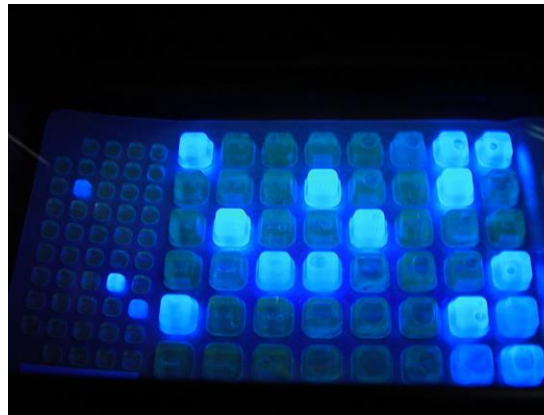
2 Pour into Quanti-Tray® (count from 1 to 200) or Quanti-Tray® (count from 1 to 2,419)



3 Seal in Quanti-Tray Sealer and place in incubator for 24 hours at 35°C



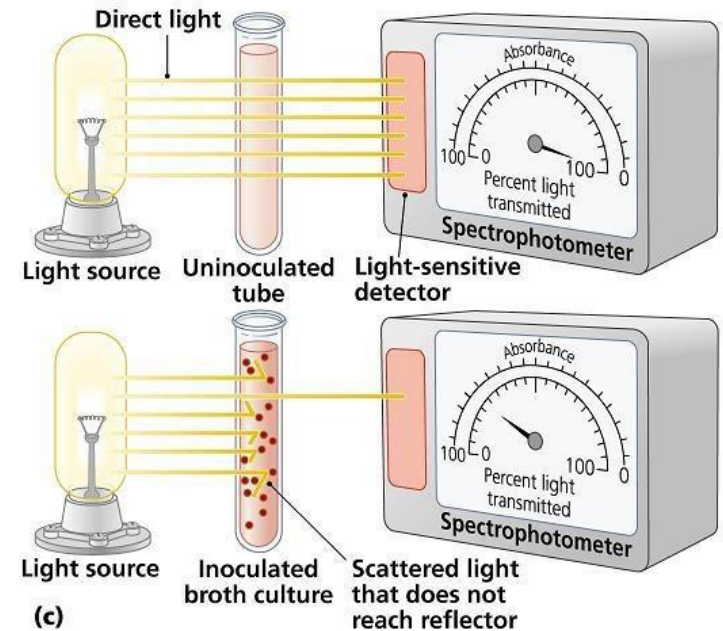
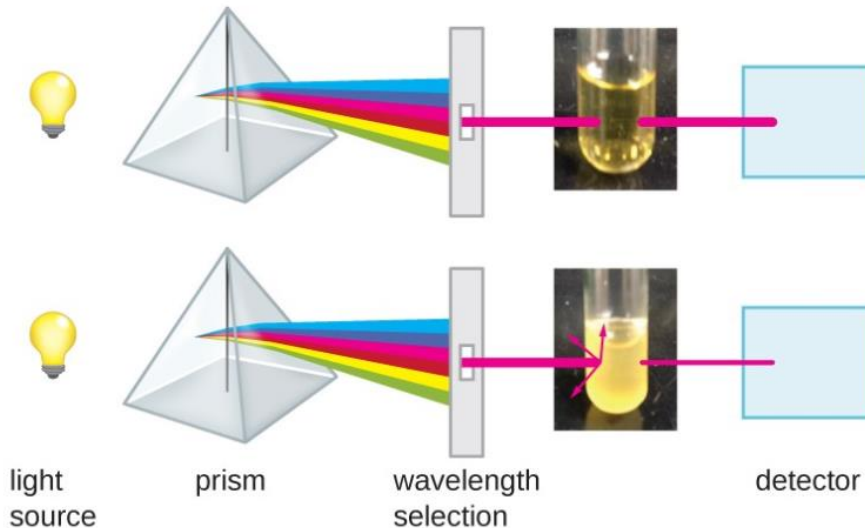
a. Read Quanti-tray results.
 Yellow wells = total coliforms
 Yellow/Fluorescent wells = *E.coli*
 Refer to MPN table
 b. Read Quanti-tray 2000 results.
 Yellow wells = total coliforms.
 Yellow/Fluorescent wells = *E.coli*
 Refer to MPN table



INDIRECT CELL COUNTS

Besides direct methods of counting cells, other methods, based on an **indirect detection of cell density**, are commonly used to estimate and compare cell densities in a culture.

The foremost approach is to **measure the turbidity** (cloudiness) of a sample of bacteria in a liquid suspension. The laboratory instrument used to measure turbidity is called a **spectrophotometer**.



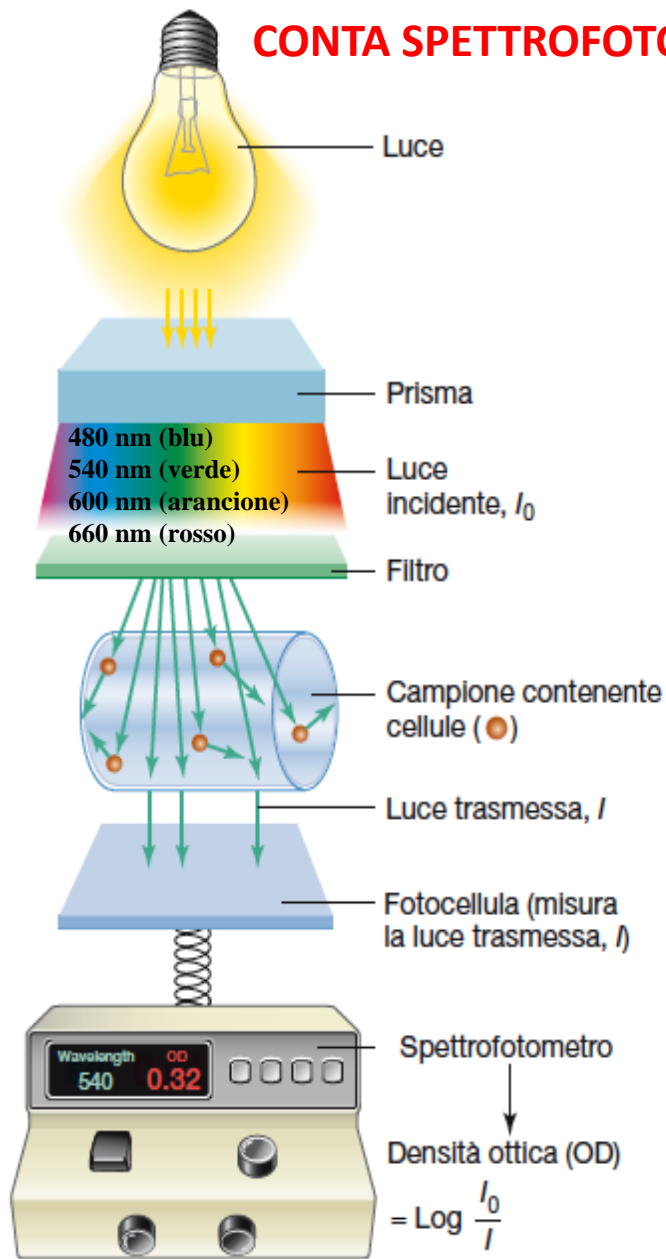
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

La concentrazione microbica (torbidità) può essere espressa

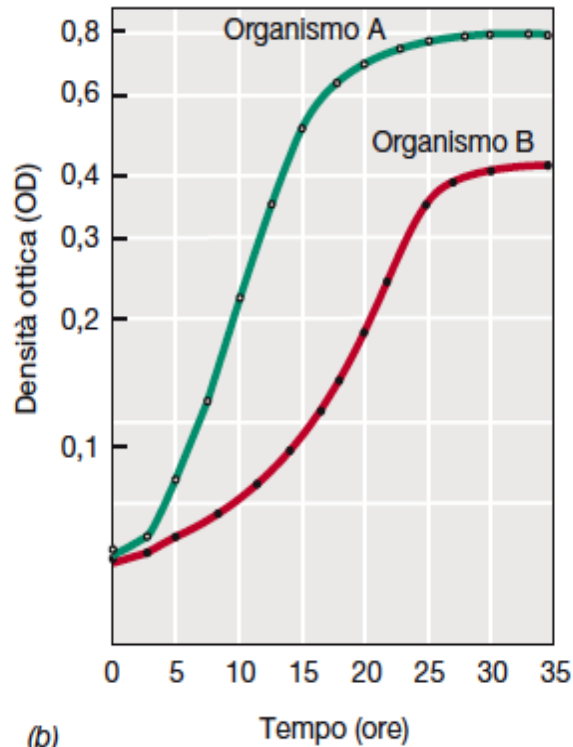
Densità Ottica (DO_{480} , DO_{540} , ...)

Assorbanza (A_{480} , A_{540} , ...)

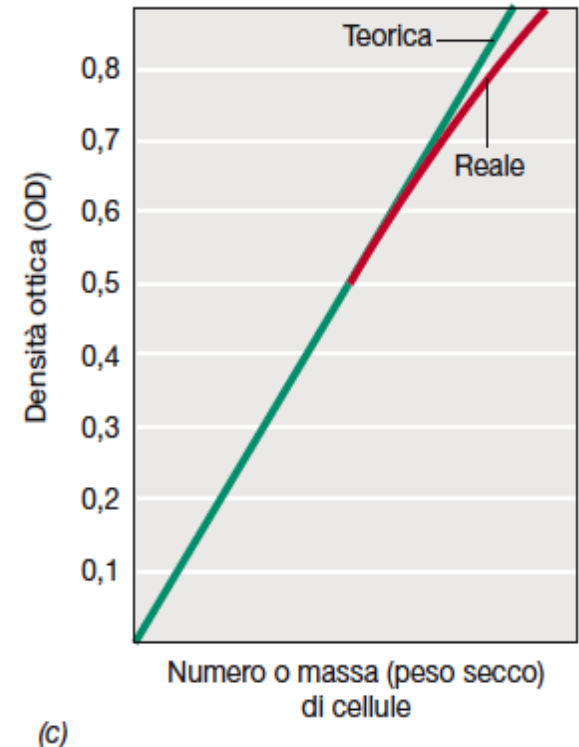
CONTA SPETTROFOTOMETRICA



(a)



(b)



(c)

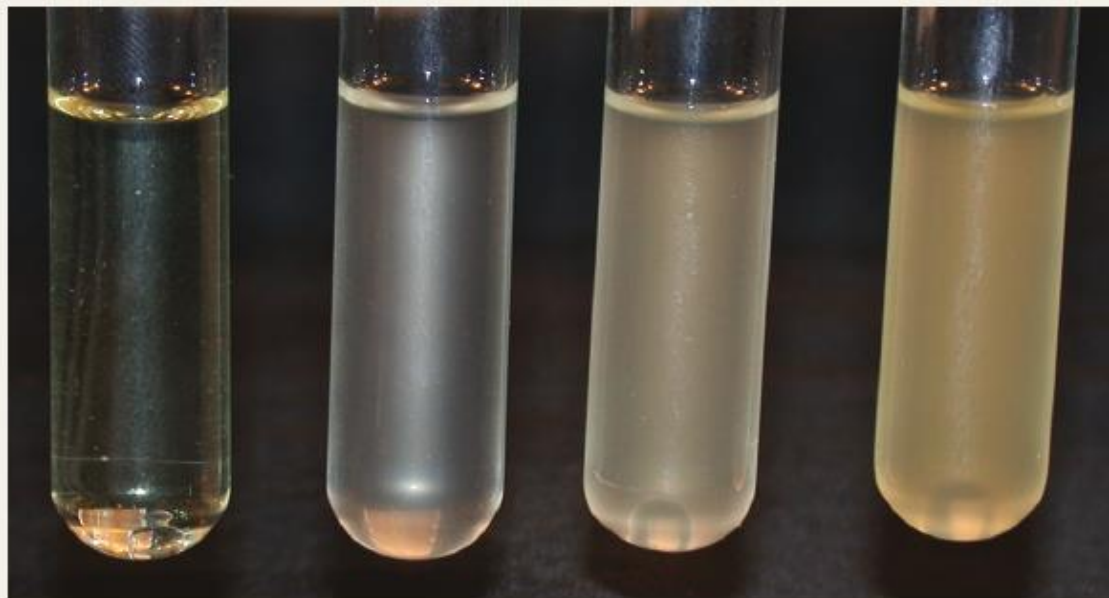
Figura 5.17 Misura della torbidità durante una crescita microbica.

(a) Uno spettrofotometro, lo strumento usato per misurare la torbidità. La fotocellula misura la luce trasmessa, non dispersa dalle cellule in sospensione, e fornisce una lettura in unità di densità ottica (OD). (b) Dati relativi a tipiche curve di crescita di due organismi con differenti velocità di crescita. Per esercitazione, calcolate il tempo di generazione (g) delle due colture usando la formula $n = 3,3(\log N - \log N_0)$, dove N e N_0 sono due differenti letture di OD con un intervallo di tempo t intercorrente tra le due letture. Quale organismo sta crescendo più velocemente, A o B?

(c) Rapporto tra numero di cellule o peso secco e letture di torbidità.

Notate che la corrispondenza univoca tra questi rapporti si perde quando la torbidità è elevata.

È necessario preparare una curva standard!



OD₅₄₀ 0

0.18

0.45

0.68

Figura 1 Colture liquide di *Escherichia coli*. In queste colture le cellule sono in uno stato planctonico, in sospensione uniforme nel mezzo di coltura. L'aumento (da sinistra verso destra) della densità ottica (OD₅₄₀) di ciascuna coltura è mostrato sotto la provetta. La densità ottica è una misura della luce dispersa, qui misurata alla lunghezza d'onda di 540 nm, come descritto nella Figura 5.17a.

Brook, Biologia dei microrganismi – 1 Microbiologia generale - Pearson

conta spettrofotometrica
pro

- Misura semplice e rapida
- La coltura non viene disturbata
- ...

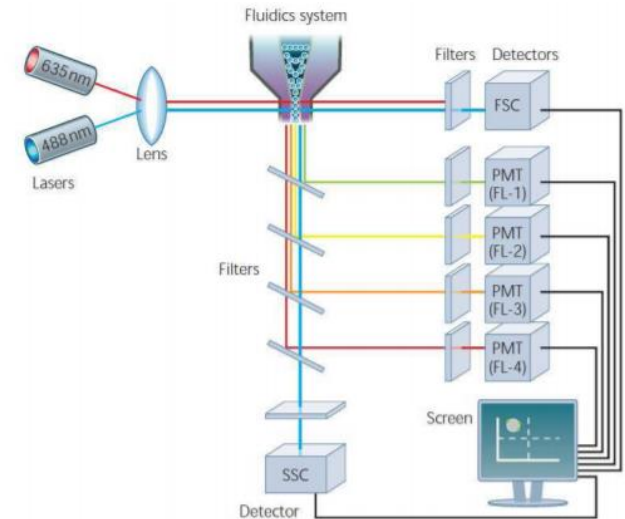
contro

- Presenza di aggregati microbici
- Presenza biofilm sulle pareti
- ...

CITOFUORIMETRIA

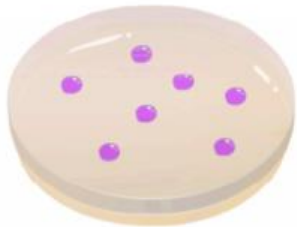
Conta batterica mediante citofluorimetro a flusso
(← raggio laser).

Consente di contare le cellule batteriche, di separarle ed isolarle.

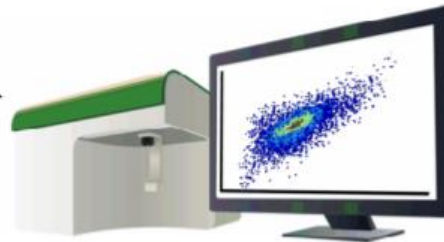
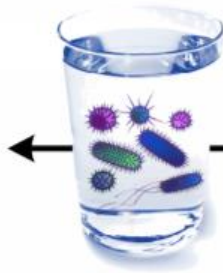


ROUTINE DRINKING WATER ANALYSIS

heterotrophic plate counts
(HPC)



flow cytometric total/intact cell
counts (TCC/ICC)



selective
variable
slow
labour intensive

sensitive
reproducible
fast
automated

1880

2016

La **riproducibilità** è il grado di concordanza tra una serie di misure di uno stesso misurando, quando le singole misurazioni vengono effettuate cambiando una o più condizioni:

- cambiando l'operatore alla misura;
- spostandosi in altro luogo;
- ...

Van Nevel et Al. (2017). **Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring.** Water Research doi: 10.1016/j.watres.2017.01.065.