

8. Conteggio di una popolazione microbica in terreno liquido secondo la tecnica MPN (Most Probable Number)

La tecnica di conteggio MPN si basa su di un metodo statistico utilizzato per stimare la densità di una popolazione di microrganismi vitali in un dato campione.

Esso calcola la probabilità di rilevare sviluppo microbico dopo coltura in tubi multipli di substrato liquido di diluizioni seriali del campione. Lo sviluppo microbico, quindi la positività, dopo incubazione dei brodi inoculati può essere evidenziato/a osservando uno o più cambiamenti del brodo

- intorbidamento;
- cambiamento di colore;
- produzione di gas;
- inacidimento.

La tecnica prevede l'utilizzo di una tavola statistica per determinare il valore del numero più probabile di microrganismi per varie combinazioni di tubi positivi.

Il campione dovrebbe essere diluito in maniera tale che le diluizioni più spinte non presentino microrganismi ("diluizione all'estinzione"). I migliori risultati si hanno quando tutti i tubi inoculati con le diluizioni più basse risultano positivi e tutti i tubi inoculati con le con le diluizioni più alte risultano negativi.

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

Le procedure standard per la determinazione dell'MPN fanno ricorso ad un minimo di 3 diluizioni e 3, 5 o 10 tubi di brodo inoculati per ciascuna diluizione.

La stima del MPN/ml o g di campione è letta su apposite tavole MPN in base al numero di tubi positivi per ciascuna serie inoculata con una data diluizione.

Esistono tavole MPN per inoculi di 3, 5 e 10 tubi.

Le tavole statistiche per la determinazione del MPN sono quella proposta da *Mc Crady* nel 1915 e da *de Man* nel 1983. In queste tavole, oltre al numero più probabile di microrganismi è riportato l'intervallo, con il valore massimo e minimo, entro il quale cade il 95% degli altri valori possibili per una specifica combinazione di risultati.

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

si annota per ciascuna diluizione il numero di provette positive (torbidità cambiamento di colore, produzione di gas, etc), quindi si calcola il numero caratteristico che è costituito da 3 cifre, la prima delle quali è data dal numero di tubi che alla diluizione più spinta (o diluizione limite) presentino la più elevata positività (cioè la serie di tubi con diluizione più spinta che presentano una maggiore numero di tubi positivi), la seconda e la terza cifra rappresentano rispettivamente il numero di tubi positivi nelle due diluizioni successive.

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.

Procedura di enumerazione di *E. coli*

Seminare 1 ml di ciascuna diluizione in 3 tubi contenenti il verde brillante