

MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI - ESERCITAZIONI

INDICE

1. Aspetti generali sulla sicurezza all'interno del laboratorio di microbiologia
2. Analisi microbiologica degli alimenti
3. Preparazione dei terreni e dei diluenti più utilizzati
4. Piani di campionamento, raccolta e preparazione del campione
5. Preparazione delle diluizioni decimali seriali
6. Tecniche di semina su piastra (per inclusione e per spatolamento)
7. Conteggio di una popolazione microbica su piastra
8. Stima di una popolazione microbica in terreno liquido secondo la tecnica MPN
9. Principi di ricerca qualitativa su terreno selettivo e differenziale
10. Principi d'identificazione di un isolato batterico previo isolamento in coltura pura
11. Metodo di ricerca di Salmonella in una matrice alimentare

1. Aspetti generali sulla sicurezza all'interno del laboratorio di microbiologia

Il laboratorio didattico o di ricerca rappresenta un luogo di lavoro dove la sicurezza degli ambienti è una condizione necessaria al fine di preservare la salute degli operatori (studenti, tecnici di laboratorio, ricercatori, etc).

L'organizzazione e la gestione della tutela della salute nei luoghi di lavoro sono regolamentate dal Dlgs. 81/2008 che ha sostituito il Dlgs. 626/1994.

L'infortunio non è una fatalità e statisticamente a monte di esso vi è sempre la violazione di qualche norma o meglio un inadeguato svolgimento di qualche operazione; pertanto è di primaria importanza avere una conoscenza profonda di tutto ciò che è presente o viene manipolato e delle corrette procedure da eseguire.

Al fine di poter stabilire quale siano le procedure di corretta prassi da adottare è necessario dover effettuare un'analisi del rischio (Reg. CE 178/2002, art.3 com.10 "analisi del rischio", processo costituito da tre componenti interconnesse: valutazione, gestione e comunicazione del rischio).

Il rischio rappresenta la probabilità che un pericolo possa manifestarsi (Reg. CE 178/2002, art.3 com.9 "rischio", funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo).

Il pericolo o elemento di pericolo che possiamo trovare all'interno di un laboratorio di microbiologia degli alimenti può essere un agente di natura fisica (fiamme, apparecchiature), chimica (sostanze) o biologica/microbiologica.

Tale conoscenza è fondamentale per prevenire/evitare la comparsa di un pericolo ed in particolare di quello microbiologico la cui probabilità e le conseguenze per la salute umana (gravità del rischio) sono strettamente connesse alla tipologia di microrganismo manipolato.

Nel laboratorio di microbiologia degli alimenti si manipolano microrganismi che suggeriscono la presenza di un rischio limitato per cui è sufficiente svolgere le operazioni secondo buone pratiche di laboratorio.

Vi sono alcune norme di comportamento basilari e semplificative da seguire durante la permanenza nel laboratorio di microbiologia:

- ✓ buon senso, approccio disciplinato ed un'adeguata organizzazione permettono di lavorare garantendo una maggiore sicurezza;
- ✓ seguire le istruzioni degli operatori preposti e chiedere prima dell'utilizzo di un'apparecchiatura;
- ✓ depositare lontano dai banchi di lavoro oggetti quali libri/appunti, borse/ vestiario e oggetti personali vari;
- ✓ indossare un camice;
- ✓ non fumare, non consumare né conservare bevande e/o cibo;
- ✓ utilizzare dispositivi di protezione personale come guanti, occhiali, mascherine e altri quando particolari operazioni lo richiedano;
- ✓ porre una particolare attenzione all'uso di gas, fiamma del becco Bunsen e degli apparecchi elettrici il cui malfunzionamento o situazione non comune va segnalato agli istruttori;
- ✓ lavarsi le mani ogni qualvolta sia necessario;
- ✓ effettuare qualsiasi procedura/manipolazione microbiologica dopo aver ricevuto opportune istruzioni e dimostrazioni pratiche da parte degli operatori preposti;
- ✓ per ridurre al minimo le possibilità di contaminazione degli operatori e dell'ambiente, le colture microbiche vanno maneggiate come se fossero patogene secondo Buone Norme di Laboratorio;
- ✓ trasportare le provette contenenti microrganismi sempre nell'apposito portaprovette;
- ✓ pulire i banchi di lavoro con una soluzione disinfettante messa a disposizione al termine di ogni sessione di lavoro;
- ✓ non allontanare senza motivo nessun materiale dal laboratorio (soluzioni, vetreria, piastre, pipette, colture batteriche etc.);

- ✓ seguire le istruzioni che vi saranno fornite al termine della sessione di lavoro per eliminare qualsiasi materiale di scarto, in particolare il materiale biologici e chimici devono essere smaltiti in specifici contenitori;
- ✓ lavarsi accuratamente le mani prima di lasciare il laboratorio.

2. Analisi microbiologica dell'alimento

La microbiologia degli alimenti è una disciplina scientifica alquanto recente ed i primi riferimenti riguardano le analisi effettuate sui prodotti lattiero-caseari nel 1930, seguono le indagini svolte sui molluschi nel 1940 ed infine l'interesse si è esteso a tutti gli altri alimenti nel decennio successivo.

L'analisi microbiologica degli alimenti si distingue in:

- ✓ **qualitativa** → presenza o assenza di specifiche popolazioni microbiche, di uno specifico microrganismo, metaboliti microbici (enzimi, tossine);
- ✓ **quantitativa** → enumerazione/conta dei microrganismi.

Essa può essere effettuata:

- ✓ in fase di produzione primaria e durante le successive tappe del processo produttivo secondo il sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points);
- ✓ al termine del processo produttivo assumendo il carattere di ispezione.

L'analisi microbiologica dell'alimento viene effettuata per:

- ✓ dimostrare che l'alimento sia sicuro e di buona qualità;
- ✓ verificare se sia esente da agenti zoonosici in caso di sospetto;
- ✓ identificare i punti critici di controllo ed individuare gli eventuali pericoli durante le fasi del processo produttivo;
- ✓ stabilire la shelf-life di una derrata alimentare per determinare la data di scadenza oppure a scopo scientifico/tecnologico per comprendere se l'applicazione di una nuova tecnica di conservazione/tecnologia sia efficiente o al fine scientifico/conoscitivo per l'identificazione di specie microbiche presenti in un determinato prodotto.

E' fondamentale prestabilire che tipologia di analisi svolgere in funzione degli obblighi legislativi (Reg. CE 2073/2005 sui criteri microbiologici dei prodotti alimentari e modifiche del Reg. CE 1441/2007), della tipologia e quantità dei prodotti e della storia analitica.

I controlli microbiologici possono essere effettuati sulla materia prima, sui prodotti intermedi di lavorazione, sui coadiuvanti tecnologici, sul prodotto finito, sul personale e sugli ambienti di produzione.

Vengono ricercati:

- ✓ il numero totale dei microrganismi presenti sull'alimento che moltiplicano a temperature intermedie come nel caso della Flora Mesofila totale (detta anche Flora Aerobica totale) o a temperature di refrigerazione come la Flora Psicrofila totale;
- ✓ indicatori di igiene di processo → derivanti da una cattiva igiene del personale, delle attrezzature e degli ambienti di lavorazione come ad esempio i Coliformi ed i Coliformi fecali;
- ✓ alteranti → responsabili di un fenomeno alterativo come ad esempio le muffe responsabili dell'ammuffimento;
- ✓ protecnologici → microrganismi che sono utili al processo di trasformazione di un alimento come ad esempio i Batteri lattici nei prodotti lattiero-caseari che presentano un ruolo chiave durante tutto il processo di produzione e stagionatura del formaggio contribuendo al sapore, aroma, aspetto e sapore caratteristico;
- ✓ patogeni → ad esempio Salmonella, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, etc. responsabili di tossinfezioni alimentari;
- ✓ tossine ed enzimi → come la tossina botulinica prodotta dal Clostridium botulinum e l'istamina che è un catabolita derivante dall'istidina metabolizzata da alcuni batteri.

Nell'analisi microbiologica di un alimento si devono prendere in considerazione diversi punti:

- il piano di campionamento e i criteri microbiologici;
- il prelievo e trasporto dei campioni in laboratorio;
- la scelta dei metodi analitici per il rivelamento, la numerazione e l'identificazione di specifici microrganismi o di gruppi di microrganismi e delle loro tossine.

3. Preparazione dei terreni e dei diluenti più utilizzati

I microrganismi hanno esigenze nutrizionali molto varie e per crescere in un determinato ambiente hanno bisogno di sorgenti di energia per le loro attività cellulari e sorgenti di composti chimici per la biosintesi dei componenti cellulari. Per il loro isolamento e la coltivazione in laboratorio è dunque necessario creare condizioni tali da soddisfare queste esigenze, mediante la formulazione di adatti terreni di coltura (o substrati nutritivi).

Un terreno di coltura può essere definito come l'ambiente nutritivo artificiale creato in laboratorio per far crescere un microrganismo. Dal punto di vista della composizione in nutrienti i terreni di coltura si possono dividere in due gruppi:

- terreni a composizione chimica definita: se ne conosce l'esatta composizione percentuale delle sostanze chimiche (organiche e inorganiche) utilizzate per la loro formulazione;
- terreni complessi o a composizione indefinita: nella loro formulazione contengono sostanze di origine varia e, nella maggior parte dei casi, di derivazione naturale (animale e vegetale) di cui non è nota la precisa composizione dei nutrienti. Le sostanze utilizzate si caratterizzano per il loro alto valore nutritivo; quelle più comunemente impiegate sono rappresentate da idrolizzati enzimatici di caseina e di soia, da estratti di cellule di lievito autolizzate, da infusi di cuore e cervello, da estratti di carne, ecc.

Entrambe le tipologie di terreni nutritivi possono essere preparati in forma liquida e in forma solida. I terreni nutritivi liquidi, detti anche brodi, sono preparati sciogliendo in acqua tutti i componenti necessari. I terreni solidi sono resi tali aggiungendo, alla soluzione dei nutrienti, una sostanza gelificante come l'agar, che è un mucopolisaccaride sulfonato estratto da alghe rosse che, una volta fluidificato a temperature superiori a 85°C, solidifica quando viene lasciato raffreddare a temperature inferiori a 45°C. In genere è usato a concentrazioni dell'1,5% per

preparare terreni solidi e allo 0,75% per terreni semi-solidi (agar soft). I terreni solidi possono essere dispensati in piastre Petri oppure in tubi per batteriologia.

In funzione dell'uso a cui sono destinati (coltivazione, mantenimento, isolamento, identificazione) i terreni di coltura possono essere ancora classificati in:

- terreni per uso generale: presentano una composizione in nutrienti tale da soddisfare la crescita della maggior parte dei microrganismi di uno specifico gruppo (batteri, lieviti e muffe). Comprendono terreni per la coltivazione e il mantenimento in laboratorio delle colture microbiche e terreni utilizzati per la numerazione delle popolazioni microbiche negli alimenti (conteggio vitale in piastra);

- terreni selettivi: oltre ai normali componenti nutritivi, contengono sostanze chimiche (antibiotici, coloranti derivanti dal trifenilmetano, azide sodica, acidi, ecc.) che esercitano un'azione inibente nei confronti di alcuni microrganismi o gruppi di microrganismi, senza interferire, nelle dosi di utilizzo, con l'organismo da isolare.

Ad esempio l'aggiunta di Sali biliari ad un terreno, influenza lo sviluppo della maggior parte dei batteri Gram-positivi ma non dei Gram-negativi, i quali si avvantaggiano nella crescita;

- terreni selettivi e differenziali: sono terreni selettivi ai quali sono aggiunte particolari sostanze chimiche che determinano una modificazione del terreno come conseguenza di una particolare attività metabolica del microrganismo da isolare, differenziandolo dalle specie che non sono in grado di utilizzare il composto differenziale (ad esempio la capacità del microrganismo di fermentare un particolare carboidrato o di produrre particolari metaboliti che rendono "caratteristica" la colonia microbica da isolare).

Fasi per la preparazione di un terreno di coltura sia liquido che solido:

- pesare esattamente i componenti secondo la ricetta o semplicemente pesare le polveri precostituite contenute nei flaconi;
- aggiungere acqua distillata nella misura richiesta;

- sciogliere gli ingredienti riscaldando su fiamma fino a 40-50°C per i terreni liquidi (cioè fino ad ottenere la chiarificazione del liquido senza raggiungere mai l'ebollizione) e fino all'ebollizione per i terreni contenenti agar (fino alla completa dissoluzione delle polveri/dei grumi, alla scioglimento delle particelle di agar e scomparsa delle goccioline, entrambe adese alle pareti della beuta);

- dispensare il terreno in bottiglie (duran) o in provette muniti di tappo;

- sterilizzare in autoclave a 121°C (1 atmosfera di sovrappressione) per 15 minuti, in modo da eliminare tutti i microrganismi, sporigeni e non, contaminanti.

Alcuni terreni nutritivi contengono sostanze che sono alterate da trattamenti termici drastici come la sterilizzazione per cui richiedono temperature e tempi di applicazione inferiori in autoclave o addirittura, per alcuni di essi, è sufficiente riscaldare fino ad ebollizione o sterilizzarli per filtrazione.

- aggiungere gli eventuali supplementi selettivi sterili al terreno sterile e raffreddato a 45-50°C (nel bagnomaria o bagnetto);

- dopo sterilizzazione i terreni agarizzati possono essere dispensati in piastre Petri oppure in tubi per batteriologia. In questo ultimo caso è possibile far solidificare il terreno lasciando la provetta in posizione verticale su di un raket/portaprovette oppure, i tubi sono poggiati su supporti in modo da ottenere la solidificazione inclinata dell'agar (detta a becco di clarino o agar slant) con una superficie abbastanza grande e favorevole per la coltura di batteri aerobi e facoltativi.

La maggior parte dei terreni di coltura utilizzati per la coltivazione e l'isolamento dei microrganismi di interesse alimentare sono disponibili come formulazioni in polvere prodotti da aziende specializzate. Per ogni terreno nutritivo commerciale sono riportate sull'etichetta la composizione e le istruzioni per la preparazione e l'uso.

Diluenti utilizzati in microbiologia

I campioni alimentari possono essere solidi (formaggio, carne, pesce, etc) e liquidi (acqua, latte).

I campioni alimentari solidi prima di essere analizzati vanno addizionati ad un adatto diluente ed omogeneizzati (con un apparecchio chiamato stomacher) al fine di consentire l'estrazione dei microrganismi dall'alimento e la dispersione nella fase liquida che può essere facilmente manipolata per l'analisi (diluizione madre).

La scelta del diluente è una fase di fondamentale importanza, in quanto diluenti non adatti, come ad esempio l'acqua, possono danneggiare le cellule microbiche con conseguente sottostima del numero di microrganismi.

Le principali caratteristiche dei diluenti sono:

- isotonicità (stessa pressione osmotica delle cellule microbiche);
- assenza di componenti nutritivi (o presenti in minima quantità);
- bassa tensione superficiale (favorisce la miscelazione del liquido con il substrato agarizzato fluido).

Sono stati proposti diversi diluenti per la preparazione della diluizione madre e delle diluizioni decimali seriali di un campione alimentare; per i prodotti lattiero- caseari si potrebbe utilizzare il trisodio citrato per formulare la diluizione madre ed il ringer lattato per le diluizioni decimali seriali, mentre per gli altri alimenti, come carni e pesce, è sovente l'uso del diluente peptone salino.

Si preparano in maniera analoga ai terreni e cioè:

- dissolvere i componenti in 1000 ml di acqua distillata riscaldando se necessario;
- eventualmente aggiustare il pH a $7,0 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- sterilizzare in autoclave a $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti;
- conservare a temperatura di refrigerazione ($0\text{-}4\text{ }^{\circ}\text{C}$) con una stabilità di circa 1 mese, se non altrimenti specificato dal produttore.

4. Piani di campionamento, raccolta e preparazione del campione

L'analisi microbiologica degli alimenti deve tener conto dell'ecologia microbica dello stesso, essa presenta un carattere dinamico poiché i microrganismi negli alimenti possono aumentare o diminuire di numero in funzione delle condizioni ecologiche che si realizzano ed in tal senso tale si differenzia dall'analisi chimica degli alimenti dove le sostanze chimiche contenute sono il più delle volte distribuite uniformemente e, nella maggioranza dei casi, la loro concentrazione rimane più o meno costante nel tempo.

Queste considerazioni richiedono una scelta adeguata del piano di campionamento.

Ogni campione preso per l'analisi rappresenta una perdita per il produttore e spesso l'intera unità da cui è prelevato il campione da sottoporre ad analisi è in pericolo di andare incontro ad alterazione; principalmente è per tale motivo che l'intera unità va scartata dopo il prelievo (ossia non verrà messa in commercio o consumata).

Per minimizzare le perdite, solo la porzione più piccola possibile è presa come campione; però se una particolare proprietà dell'alimento varia all'interno dell'alimento nella sua interezza, ogni conclusione rispetto a quella proprietà è di limitato valore se essa è basata su un campione piccolo; inoltre, prendere delle decisioni sulla base di tali conclusioni potrebbe comportare considerevoli rischi sullo stato di sicurezza del prodotto. In ogni modo incertezza e rischio sono inevitabili nel liberare un lotto (cioè definirlo accettabile) sulla base di test a campione. Il campione deve essere costituito da uno specificato numero di unità campionarie (in genere 5) prelevate a random da ogni lotto di prodotto. Ogni unità campionaria dovrebbe consistere di almeno 100 g o ml e, in ogni caso, dovrebbe essere in quantità tale da rispettare i criteri stabiliti nel piano.

Quando è possibile, prelevare sempre campioni da contenitori perfettamente sigillati. Se il prodotto da analizzare è costituito da grosse masse, prelevare diverse sottounità che andranno a costituire l'unità campionaria finale. Le unità campionarie

totali non devono provenire dallo stesso contenitore della massa del campione, ma da contenitori diversi.

I campioni di alimento vanno raccolti in contenitori sterili, avendo cura di adottare tutte le precauzioni di asepsi per evitare contaminazioni. Inoltre, i campioni vanno conservati e trasportati in condizioni refrigerate (0-4°C) o allo stato congelato, in funzione della natura del prodotto.

In alcuni casi, la legislazione nazionale e comunitaria fornisce indicazioni specifiche sulle modalità operative da seguire per il campionamento di alimenti da analizzare da un punto di vista microbiologico come il Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari modificato dal Regolamento (CE) n. 1441/2007.

L'accertamento del numero di microrganismi presenti nelle materie prime, negli intermedi, nei prodotti alimentari pronti per il consumo e negli ambienti di lavorazione viene largamente impiegato per il controllo della qualità microbiologica nelle industrie alimentari.

Uno dei metodi utilizzati per la numerazione dei microrganismi presenti in un campione alimentare è il conteggio standard di cellule vitali su piastra (Standard Plate Counts, SPC).

Il metodo colturale di numerazione dei microrganismi prevede una serie di fasi che vanno seguite nell'ordine predefinito e sono:

- Preparazione del campione;
- Preparazione delle diluizioni decimali seriali
- Semina in o su terreno nutritivo agarizzato (scelta del substrato adatto);
- Incubazione alla temperatura e per tempi di incubazione appropriati alla microflora da numerare;
- Conteggio delle colonie e interpretazione dei risultati.

Preparazione del campione per l'analisi

Le cellule microbiche imbrigliate nelle matrici alimentari, per essere contate devono essere trasferite nell'adatto substrato nutritivo. I campioni alimentari liquidi possono essere trasferiti in piastra tal quali (eventualmente previa diluizione). I campioni solidi, invece, prima di essere analizzati, vanno omogeneizzati in un adatto diluente al fine di estrarre e disperdere i microrganismi nella fase liquida che può essere facilmente manipolata per l'analisi. Il prelievo di un'aliquota di campione solido avviene tra due fiamme, quindi in condizioni di sterilità, dove avviene l'apertura della confezione e/o il taglio, con specifici strumenti, per ottenere quell'aliquota di campione destinata alla preparazione dell'omogenato che deve essere sufficientemente grande e prelevata a caso in modo da essere rappresentativa della complessa composizione microbica del campione. Vengono omogenate generalmente 25 g partendo da un minimo di 10 g.

L'omogenato del campione alimentare viene preparato diluendolo nel rapporto 1:10 in un adatto diluente. Tale sospensione-diluizione, detta anche prima diluizione o diluizione madre, usualmente viene realizzata aggiungendo 90 ml di diluente a 10 g di campione. Tale metodo, dato il diverso grado di solubilità degli alimenti, potrebbe comportare errori nel calcolo finale del numero di microrganismi realmente presenti nel campione iniziale. Un metodo più accurato di preparazione della prima diluizione è quello di pesare 10 g di campione, aggiungere circa 70-80 ml di diluente, omogeneizzare, trasferire l'omogenato in un cilindro graduato da 100 ml, quindi portare a volume con lo stesso diluente.

Sono stati proposti diversi diluenti per la preparazione della diluizione madre di un campione alimentare. La scelta del diluente è una fase molto importante dell'analisi, in quanto diluenti non adatti, come ad esempio l'acqua, possono causare danneggiamenti delle cellule microbiche, con conseguente sottostima del numero di microrganismi. Il

diluyente più utilizzato è la soluzione sale-peptone (0,85% NaCl + 0,1% peptone) detto anche diluyente peptone salino.

Per la preparazione dell'omogenato, la sospensione dell'alimento deve essere omogeneizzata per favorire il passaggio dei microrganismi nel diluyente. L'omogeneizzazione deve avvenire in maniera tale da evitare il danneggiamento delle cellule microbiche. A tale scopo si utilizza un omogeneizzatore peristaltico a pale (Stomacher) che "massaggia" il campione facilitando la liberazione dei microrganismi dall'alimento.

Il tempo di omogeneizzazione va standardizzato in funzione della natura del campione alimentare. In genere tempi di 1-2 minuti sono ritenuti sufficienti per liberare i microrganismi dalla matrice alimentare senza un loro danneggiamento.

È fondamentale ricordare di:

- iniziare le operazioni il più presto possibile dopo il prelievo del campione;
- operare in sterilità per evitare contaminazioni del campione;
- i campioni liquidi vanno miscelati invertendo più volte il contenitore prima di essere prelevati con una pipetta sterile o misurati in un cilindro sterile;
- i campioni solidi vanno pesati e omogeneizzati con un adatto diluyente;
- scegliere il diluyente in funzione del metodo e della natura del campione alimentare;
- il diluyente usato deve avere una temperatura prossima a quella del campione, per evitare danni termici ai microrganismi.

5. Preparazione delle diluizioni decimali seriali

In microbiologia quantitativa si mira a determinare il numero di microrganismi o, più precisamente, il numero di Unità Formanti Colonie (UFC) per ml o g in un determinato campione. 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 e troviamo, dopo incubazione delle piastre, che si sono sviluppate 20 colonie, siamo in grado di concludere che il campione di latte conteneva 20 UFC/ml.

Più realisticamente, la concentrazione di microrganismi in un campione di latte è considerevolmente più elevata, per cui il conteggio delle colonie su una piastra inoculata con 1 ml del campione potrebbe essere impossibile.

ESEMPIO 2: supponiamo che il nostro campione di latte 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. Infatti, facendo delle diluizioni decimali seriali del campione di latte (ad es. 1 ml di campione in 9 ml di diluente sterile, 1 ml di questa diluizione in altri 9 ml di diluente sterile e, ancora, 1 ml di quest'ultima diluizione in altri 9 ml di diluente sterile), operiamo una diluizione del numero di microrganismi inizialmente presenti in esso, realizzando così una procedura equivalente a quella descritta precedentemente nell'esempio 2, in cui 0,001 ml di latte sono corrispondenti a 1 ml della diluizione 1:1000. In definitiva, allestendo delle

diluizioni decimali (1:10) seriali di un campione, operiamo una diluizione del numero di microrganismi inizialmente presenti in esso.

Nella realtà, noi non conosciamo mai l'esatto numero di microrganismi presenti in un g o ml di campione. Al momento dell'analisi dobbiamo dunque decidere quante volte diluire il campione per fare in modo che le piastre petri, contenenti l'adatto terreno nutritivo, una volta seminate con aliquote delle diluizioni del campione possano contenere, dopo incubazione in adatte condizioni (tempo, temperatura e atmosfera) un numero di colonie facilmente contabili (considerando che il diametro standard di una piastra petri è di 90 mm, al massimo 250-300 colonie si svilupperanno separatamente per essere contate).

Il numero di diluizioni da realizzare può scaturire da una serie di considerazioni:

a) può essere dettato dai criteri microbiologici da soddisfare per accertare se un campione risulta accettabile: se ad esempio è stabilito che in una unità campionaria il numero di UFC/g o ml non deve superare 100, allora è sufficiente diluire una sola volta il campione nel caso sia solido ovvero usare 1 ml del campione indiluito nel caso esso sia liquido, per accertare se il criterio è soddisfatto. Infatti, se il campione contiene meno di 100 cellule per g o ml, dopo la semina in piastra della diluizione 10^{-1} siamo in grado di contare l'esatto numero di colonie presenti; qualora il numero di cellule fosse maggiore di 100, seminando 1 ml della prima diluizione o del campione liquido indiluito, siamo allo stesso modo in grado di soddisfare il criterio, poichè ci basta sapere solo se il campione supera il limite prefissato è stato superato;

b) può essere dettato da precedenti esperienze di analisi condotte su prodotti simili considerando la natura del campione, il tipo di processo tecnologico cui è stato sottoposto, le condizioni in cui viene conservato, ecc.

c) quando non si hanno notizie sufficienti sul campione per poter prevedere il numero potenziale di microrganismi in esso contenuto, allora è necessario diluire il campione almeno fino alla $10^{-8}/10^{-9}$.

Il diluente utilizzato deve avere una temperatura prossima a quella del campione per evitare danni termici ai microrganismi.

La prima diluizione può essere lasciata a riposo per favorire la decantazione di particelle grossolane e la dispersione di microrganismi nel diluente. In ogni modo l'intervallo di tempo tra la preparazione della prima diluizione e quelle successive non dovrebbe mai superare i 15 minuti mentre la semina in piastra delle diluizioni preparate deve avvenire al massimo entro 20-30 minuti dalla preparazione della diluizione iniziale.

Materiale occorrente:

- pipettatrice e pipette sterili da 1 o 2 ml;
- tubi contenenti 9 ml di diluente sterile.

Procedura

Prelevare, con una pipetta sterile, 1 ml dalla diluizione madre (1:10) nel caso in cui si tratti di campione solido (es. un formaggio) o 1 ml dal tal quale nel caso in cui si tratti di campione liquido (es. latte) e trasferirlo in 9 ml di diluente sterile evitando il contatto tra la pipetta e il diluente; in tal modo si realizza rispettivamente una diluizione 1/100 (10^{-2}) nel caso del campione solido e 1/10 (10^{-1}) nel caso del campione liquido. Omogeneizzare con cura mediante agitatore automatico (vortex) per 5-10" e ripetere le operazioni per ottenere diluizioni decimali successive (10^{-3} , 10^{-4} etc.) fino alla diluizione limite prestabilita.

6. Tecniche di semina su piastra (per inclusione e per spatolamento)

Una volta preparate le diluizioni decimali seriali del campione (e quindi dei microrganismi in esso presenti) è necessario trasferire loro aliquote sul o nell'adatto terreno nutritivo. Tali aliquote in genere sono rispettivamente di 0.1 ml o di 1 ml in funzione del metodo di inoculo utilizzato.

L'obiettivo è di inoculare in piastra, con le aliquote delle diluizioni scalari, un numero sempre minore di microrganismi, in maniera tale che almeno 1 o 2 piastre abbiano, dopo incubazione in condizioni ottimali, colonie ben isolate, in numero compreso tra 30 e 300, in maniera tale da essere facilmente contate.

Esistono due tecniche principali di piastramento (semina delle piastre con aliquote delle diluizioni del campione):

- a) Tecnica per inclusione dell'inoculo in substrato solidificabile (Tecnica "Pour Plate").
- b) Tecnica di semina per distribuzione (spatolamento) superficiale dell'inoculo su substrato solido (Tecnica "Spread plate").

La tecnica di semina per inclusione in terreno solidificabile prevede l'uso di agar allo stato liquido al momento del suo utilizzo perché mantenuto nel bagnomaria ad una temperatura di 45-50°C, in questo caso la crescita delle colonie avverrà sia in superficie che in profondità. Le colonie inglobate nella matrice del substrato, qualora siano in numero non elevato, in alcuni casi possono essere difficili da numerare alle diluizioni più basse poiché si possono confondere con le particelle del campione alimentare.

Nella tecnica di semina per spatolamento la crescita delle colonie avviene in superficie facilitando la loro numerazione.

Procedura di semina per inclusione dell'inoculo in terreno solidificabile

Materiale occorrente:

- ✓ diluizioni decimali seriali del campione;
- ✓ pipettatrice e pipette sterili da 1-2 ml;

- ✓ substrato nutritivo agarizzato sterile e mantenuto fuso a 45-50°C;
- ✓ piastre di Petri sterili;

Procedura

In una piastra di Petri sterile vuota, si versa 1 ml della diluizione del campione da analizzare (inoculo) quindi si aggiunge il substrato agarizzato (12-15 ml) mantenuto in fusione a 45-50°C. Dopo l'aggiunta del substrato, si rotea delicatamente la piastra, in modo da descrivere uno 0, un 8, una X o una croce al fine di distribuire l'inoculo (i microrganismi) uniformemente nel substrato. Dopo solidificazione del substrato, le piastre vengono incubate capovolte (per evitare che l'accumulo di eventuale vapore condensato sotto il coperchio possa ricadere sulla superficie dell'agar disturbando lo sviluppo delle colonie e dunque il conteggio) in termostato all'adatta temperatura.

Procedura di semina per distribuzione superficiale dell'inoculo su terreno solido

Materiale occorrente:

- ✓ diluizioni decimali seriali del campione;
- ✓ pipettatrice e pipette sterili da 0,1-2 ml;
- ✓ piastre di Petri contenenti il substrato nutritivo solidificato;

Procedura

Le piastre contenenti l'adatto substrato nutritivo solidificato (circa 15 ml per piastra) sono preparate prima dell'operazione di inoculo. Le piastre una volta preparate possono essere conservate a 4°C anche per una settimana prima dell'uso. L'inoculo, costituito da aliquote da 0,1 ml delle diluizioni seriali, è depositato con una pipetta sulla superficie dell'agar e distribuito uniformemente su di essa con una bacchettina di vetro sterile a forma di L/spatola in materiale plastico sterile. Si lascia adsorbire l'inoculo e quindi le piastre sono trasferite capovolte in termostato.

La differenza tra la semina per inclusione e quella per spatolamento risiede nel fatto che in quest'ultima si fa uso di piastre contenenti il substrato già pronto che vengono inoculate con volumi minori (di 0,1 ml) di ciascuna diluizione. Inoculando ogni piastra

con 0,1 ml di ciascuna diluizione e quindi con 1/10 del numero di UFC che sono presenti in 1 ml di inoculo, è necessario moltiplicare il n° di UFC/g o ml determinato per un fattore 10. Lo stesso risultato si ottiene etichettando le piastre con la diluizione virtuale piastrata. Ad esempio, una piastra inocolata con 0,1 ml di una diluizione 10^{-1} è equivalente ad una piastra inocolata con 1 ml della diluizione 10^{-2} . Dunque scriveremo: 10^{-2} sulla piastra che inoculiamo con 0,1 ml della diluizione 10^{-1} ; 10^{-3} sulla piastra che inoculiamo con 0,1 ml della diluizione 10^{-2} ; e così via.

ESEMPIO: supponiamo di inoculare una piastra con 0,1 ml della diluizione 10^{-2} di un alimento solido. Dopo incubazione contiamo sulla piastra 100 UFC. Siccome piastrare 0,1 ml di una diluizione 10^{-2} equivale a piastrare 1 ml della diluizione 10^{-3} , il nostro campione conteneva 100×10^3 UFC/g

Per entrambe le tecniche di semina, al fine di ottenere conteggi più accurati, è consigliabile inoculare almeno due piastre con ciascuna diluizione, facendo la media del numero di colonie ottenute sulle due piastre.

Condizioni di incubazione delle piastre

Le piastre una volta inoculate con una delle tecniche descritte precedentemente, devono essere incubate in termostato a temperature, tempi e atmosfera gassosa che dipendono dal tipo di popolazioni microbiche che si vuole numerare. In particolare l'anaerobiosi e la microaerofilia vengono create con l'aggiunta di bustine, contenenti sostanze chimiche, in giare ermeticamente chiudibili all'interno delle quali vengono collocate/inpilate le piastre.

7. Conteggio di una popolazione microbica su piastra

Al termine dell'incubazione delle piastre, se l'inoculo è stato distribuito omogeneamente nel/sul substrato, teoricamente ogni cellula presente nel campione iniziale ha dato origine, in seguito a moltiplicazione, ad una colonia singola visibile ad occhio nudo. Per il conteggio delle colonie si selezionano solo le piastre che sono contabili, cioè quelle che presentano un numero di colonie comprese tra 30 e 300. Tale intervallo è scelto perché considerato statisticamente significativo. Quando su una piastra ci sono meno di 30 colonie, anche piccoli errori nella tecnica di diluizione del campione o la presenza di poche cellule di contaminati (ad derivanti da contaminazioni durante le operazioni) potrebbero avere effetti significativi sul conteggio finale. Invece, una piastra con un numero di colonie superiore a 300 potrebbe risultare difficile da contare. Un modalità per agevolare la conta, qualora vi sia un numero elevato di UFC contabili, è la suddivisione della piastra di Petri in semicerchi o in quarti di cerchio e di conseguenza verrà effettuata la numerazione di una sola frazione ed il successivo prodotto delle UFC ottenute $\times 2$ (conta di un semicerchio) o $\times 4$ (conta di $\frac{1}{4}$ di cerchio).

Quando sul substrato sono deposte con l'inoculo molte cellule, queste tenderanno a svilupparsi in maniera confluyente dando origine a colonie non isolate a sufficienza per essere contate.

Per il conteggio, il numero di colonie contato su una piastra viene moltiplicato per il numero di volte in cui è stato diluito il campione iniziale (si moltiplicano le UFC ottenute per il reciproco della diluizione alla quale ho effettuato la conta).

Ad esempio, se due piastre che sono state inoculate ciascuna con 1 ml della diluizione 1:1000 (10^{-3}) del campione iniziale presentano mediamente 50 colonie, allora 50 rappresenta 1/1000 del numero di colonie presenti in 1 g o 1 ml del campione iniziale. Dunque, il numero di colonie per g o ml del campione sarà calcolato moltiplicando 50×1000 (1000 rappresenta il fattore della diluizione 1/1000).

Più semplicemente si contano le colonie ad una determinata diluzione e si aggiungono tanti zeri quanto il numero espresso dalla diluzione alla quale effettuiamo la conta ed infine si aggiungerà un altro 0 se è utilizzata la tecnica di semina per spatolamento. Ipotizziamo di contare a 10^{-3} un numero di 50 UFC; il numero totale sarà di 50000 UFC/g o ml per l'aggiunta di 3 zeri e né verrà aggiunto un altro (0) qualora la tecnica di semina utilizzata sia lo spatolamento. I risultati che otteniamo sono spesso costituiti da numeri a molte cifre, per tale ragione si effettua un calcolo logaritmico in base 10 o lo si esprime come numero decimale con due cifre dopo la virgola che moltiplica 10^n .

Se l'inoculo è distribuito omogeneamente nel substrato, teoricamente ogni cellula presente nel campione iniziale dovrebbe dare origine, in seguito a moltiplicazione, ad una colonia singola visibile ad occhio nudo. In realtà, cellule aggregate in coppia, in catene o in ammassi, quando sono depositate sul substrato si moltiplicheranno dando origine ad una singola colonia. Per tale motivo è più corretto esprimere il risultato di un conteggio microbico come numero di Unità (cellula/e) in grado di formare una colonia singola (Unità Formanti Colonie: UFC/g o ml) piuttosto che come cellule/g o ml.

8. Stima di una popolazione microbica in terreno liquido secondo la tecnica MPN

La tecnica di conteggio MPN (Most Probable Number) 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:

- intorbidimento;
- 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 é 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 é 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.

Determinazione dei coliformi totali, coliformi fecali ed *E.coli* con il metodo MPN

Vengono preparate la diluizione madre (per alimenti solidi) e le diluizioni decimali seriali, nonché un terreno nutritivo liquido selettivo denominato Brilliant Green Bile Broth - BGBB distribuito in provette munite di campanule di Durham. I selettivi di questo terreno sono la bile e il verde brillante che inibiscono i batteri gram-positivi.

Condideriamo uno schema di inoculo 1 - 0,1- 0,01 - 0,001 ml per un campione liquido (come ad esempio il latte) qualora si presuma la presenza di poche cellule di coliformi fino ad un migliaio per g o ml.

- inoculare 3 tubi contenenti BGBB a concentrazione normale ciascuno con 1 ml del campione di latte (corrispondenti a inoculi di 1 ml di campione per tubo);
- inoculare 3 tubi contenenti BGBB a concentrazione normale ciascuno con 1 ml della diluizione 1:10 del campione di latte (corrispondenti a inoculi di 0,1 ml di campione per tubo);

- inoculare 3 tubi contenenti BGGB a concentrazione normale ciascuno con 1 ml della diluizione 1:100 del campione di latte (corrispondenti a inoculi di 0,01 ml di campione per tubo);
- inoculare 3 tubi contenenti BGGB a concentrazione normale ciascuno con 1 ml della diluizione 1:1000 del campione di latte (corrispondenti a inoculi di 0,001 ml di campione per tubo).

Incubazione: 30°C per 48 ore.

Lettura dei risultati: si considerano positivi i tubi che presentano accumulo di gas nelle campanule di Durham fino al completo galleggiamento della campanula stessa. Supponiamo di ottenere i seguenti risultati: 3 tubi positivi nel tal quale; 3 tubi positivi nella diluizione 10^{-1} ; 2 tubi positivi nella diluizione 10^{-2} ; 2 tubi positivi nella diluizione 10^{-3} . Ricordando che si parte dalla serie di tubi con diluizione più spinta che presenta la massima positività, il numero caratteristico è 322; si ricerca il corrispondente MPN sulla tavola di Mc Crady che in questo caso è 20. Inoltre tenendo presente che la diluizione limite è la 10^{-1} , allora l'MPN/ml di coliformi totali è pari a 200 (20×10).

Si procede inoculando una nuova provetta di BGGB (per i Coliformi fecali) e una provetta di Acqua Tryptonata (AT per l'*E. coli*) prelevando 1 ml da ciascuna delle provette risultate positive nella prova per coliformi totali, cioè:

- 3 tubi alla diluizione 10^0 ;
- 3 tubi alla diluizione 10^{-1} ;
- 2 tubi alla diluizione 10^{-2} ;
- 2 tubi alla diluizione 10^{-3} .

Incubazione delle provette di BGGB e AT a 44,5°C per 24-48 ore.

Lettura dei risultati: annotare l'eventuale produzione di gas nei tubi di BGGB, mentre nella provetta contenente Acqua Tryptonata si ricerca la produzione di indolo da triptofano, aggiungendo 1 ml di Reattivo di Kovacs; in presenza di indolo, entro pochi minuti si avrà un anello violaceo sulla superficie del brodo.

Supponiamo di ottenere i seguenti risultati sia nelle provette di BGGB e che di AT: 3 tubi positivi nel tal quale; 1 tubo positivo nella diluizione 10^{-1} ; 0 tubi positivi nella diluizione 10^{-2} ; 0 tubi positivi nella diluizione 10^{-3} . Il numero caratteristico è 310 a cui corrisponde un MPN/ml di coliformi fecali e di *E. coli* pari a 45 ($4,5 \times 10$).

9. Principi di ricerca qualitativa su terreno selettivo e differenziale

L'analisi microbiologica mirata alla ricerca di specifici microrganismi patogeni negli alimenti fa ricorso alla creazione di condizioni che favoriscono elettivamente la crescita ed il successivo isolamento di specifici microrganismi o gruppi di microrganismi dalla complessa microflora che popola un campione alimentare.

Specifici microrganismi o gruppi di microrganismi possono essere isolati dal loro habitat naturale creando in laboratorio condizioni ambientali artificiali che migliorino la loro crescita rispetto agli altri microrganismi competitori, attraverso:

- l'utilizzo di substrati nutritivi (liquidi e solidi) che migliorino la loro crescita;
- condizioni d'incubazione ad esso favorevoli (temperatura, atmosfera, tempo);
- pretrattamenti che facilitino il loro isolamento selettivo (ad esempio il pretrattamento termico che si effettua sul campione per isolare le forme sporigene).

I terreni utilizzati, detti di pre/arricchimento, consentono di aumentare la carica della specie batterica che ci interessa isolare, grazie alla presenza di fattori che rallentano la crescita di specie batteriche contaminanti presenti nel campione in esame.

I terreni di arricchimento selettivi sono substrati che favoriscono la crescita solo di particolari specie batteriche grazie alla presenza di fattori che inibiscono lo sviluppo delle altre specie; questi fattori vengono denominati sostanze inibenti e possono essere antibiotici, coloranti (come verde brillante, cristalvioletto ecc.) e tensioattivi (come i sali biliari) a cui il microrganismo da isolare è resistente.

I terreni di arricchimento possono essere sia allo stato solido (contenenti agar) che liquido (brodi); un arricchimento in brodo selettivo aumenta la probabilità che le colonie dell'microrganismo desiderato potranno essere isolate nel successivo passaggio di striscio su substrato solido in piastre. In genere i brodi di arricchimento hanno una composizione molto simile ai substrati solidi usati per il successivo isolamento selettivo.

I terreni selettivi possono contenere delle sostanze che consentono di differenziare il microrganismo da isolare da altri che pur crescendo sullo stesso substrato selettivo non presentano quella particolare attività metabolica (terreni selettivi e differenziali). I componenti presenti all'interno di un terreno differenziale possono essere:

- indicatori di pH (rosso fenolo, blu di bromotimolo);
- indicatori reazioni redox (sostanze che cambiano la loro configurazione elettronica in base alle quantità di elettroni, cambiando così colore, come il blu di metilene e il verde brillante);
- amminoacidi (lisina, triptofano, ornitina);
- carboidrati (lattosio, mannitolo).

La maggior parte dei substrati differenziali sfruttano la capacità del microrganismo di fermentare un particolare carboidrato (variazioni di pH) o di produrre particolari metaboliti che rendono "caratteristica" la colonia da isolare.

In generale distinguiamo una serie di tappe per riuscire ad isolare delle specifiche colonie batteriche:

1) Resuscitazione o prearricchimento non selettivo.

In alimenti processati (cioè che subito trattamenti termici, essiccazione, irradiazione, refrigerazione, congelamento, etc.) le cellule microbiche presenti potrebbero essere state danneggiate dal trattamento, che pur non uccidendole, non consente loro di moltiplicarsi; in questo caso si parla di cellule danneggiate subletalmente.

Il danno cellulare può essere di natura fisica e cioè a carico delle strutture cellulari con conseguente fuoriuscita del contenuto citoplasmatico o a livello di alcune attività metaboliche. Fin quando il danno cellulare non sarà riparato, le cellule danneggiate subletalmente non saranno in grado di moltiplicarsi. In questa fase, il tentativo di isolare colonie in o su un substrato selettivo potrebbe risultare un insuccesso, in

quanto le stesse sostanze selettive (a cui il microrganismo con cellule non danneggiate risulta resistente) potrebbero essere causa della loro morte.

Il danno cellulare può essere riparato dal microrganismo anche nello stesso alimento processato se le condizioni nutritive e di conservazione dell'alimento sono tali da favorire la sua moltiplicazione.

Questa condizione può avere importanti implicazioni nell'analisi microbiologica di un alimento. Infatti, i risultati analitici potranno essere non attendibili con una sottostima del numero di patogeni, o addirittura condurre a falsi negativi, come conseguenza del mancato rilevamento del microrganismo danneggiato.

Queste situazioni si superano se l'analisi microbiologica di alimenti fortemente processati viene fatta precedere da una fase di resuscitazione o prearricchimento in un substrato o in condizioni colturali che consentono la riparazione delle cellule danneggiate.

Nell'analisi qualitativa, per recuperare cellule danneggiate subletalmente, si omogeneizza il campione in un substrato liquido nutrizionalmente completo e complesso (terreno di prearricchimento) che dopo incubazione per tempi e temperature ottimali per il microrganismo, viene trasferito in un substrato liquido selettivo.

II) Arricchimento selettivo.

In questa fase viene effettuato utilizzando un brodo selettivo formulato in maniera da inibire lo sviluppo di microrganismi competitori; un arricchimento in brodo selettivo aumenta la probabilità che le colonie dell'organismo desiderato potranno essere isolate nel successivo passaggio di striscio su substrato solido in piastre.

L'obiettivo dell'arricchimento selettivo per la ricerca di uno specifico patogeno negli alimenti è quello di favorire il più possibile il suo sviluppo rispetto alla microflora che lo accompagna, che non essendo di nessun interesse per l'analisi, si cerca di inibire il più possibile. L'arricchimento selettivo è una fase obbligatoria quando si ricercano i

microrganismi patogeni, in quanto i criteri microbiologici per questi microrganismi prevedono la loro assenza in almeno 25 g di alimento. Questo implica che il metodo di analisi deve essere in grado di rilevare anche una sola cellula del microrganismo in presenza di altri contaminanti.

Ciò equivale a dire che l'arricchimento selettivo deve assicurare che in un'ansata (pochi μ l) del substrato prelevata al termine della fase di incubazione contenga almeno 1 UFC del microrganismo.

III) Piastramento o isolamento su substrato selettivo e differenziale.

Quando si parla di isolamento selettivo si fa riferimento allo striscio di aliquote di un brodo di arricchimento di un campione su substrati agarizzati selettivi e differenziali. L'obiettivo di questa fase è quella di ottenere colonie isolate del patogeno che potranno essere utilizzate nelle fasi successive dell'analisi.

Specifici microrganismi danno origine a colonie tipiche su appropriati substrati selettivi e differenziali. Tuttavia, la selettività e la differenzialità di tali substrati non è assoluta. Infatti, è possibile che nell'ambito di popolazioni normalmente sensibili agli agenti selettivi utilizzati nel substrato per isolare un dato patogeno, esistano specie o ceppi particolarmente resistenti; inoltre, molto spesso, le caratteristiche metaboliche utilizzate per differenziare il batterio ricercato, sono possedute in ugual misura da altri microrganismi, anche non strettamente correlati tassonomicamente ad esso.

10. Principi d'identificazione di un isolato batterico previo isolamento in coltura pura

Sulla base delle considerazioni fatte in precedenza, una colonia tipica cresciuta su un substrato selettivo e differenziale deve essere considerata solo come presuntivamente appartenente alla specie batterica ricercata. L'identificazione di specie dell'isolato, pertanto, deve essere confermata con ulteriori test.

Preliminarmente, si annotano le caratteristiche di crescita della colonia (morfologia, colore, dimensioni, margini) ed eventuali variazioni del substrato selettivo e differenziale di primo isolamento (colore, aloni di chiarificazione, altro).

Si procede quindi all'isolamento della/e colonia/e su substrato non selettivo al fine di ottenere una coltura pura (popolazioni di cellule costituenti un'unica colonia) e fresca (popolazioni di cellule che abbiano meno di 24h di vita). L'isolamento della colonia dal terreno solido selettivo e differenziale consiste nel prelevare con un'ansa una colonia presuntiva ben isolata e successivamente seminarla per strisciamento su substrato agarizzato non selettivo (**isolato in coltura pura**).

L'isolato in coltura pura sarà sottoposto ai seguenti test preliminari:

- ✓ osservazione microscopica per accertare la sua morfologia (cocco, bastoncino, forme aggregate ecc);
- ✓ reazione di Gram;
- ✓ saggio della catalasi;
- ✓ saggio dell'ossidasi;
- ✓ identificazione di un isolato batterico con metodi biochimici

a) Reazione di Gram

Procedura:

- ✓ pulire e sgrassare un vetrino portaoggetti;
- ✓ porre una goccia di acqua sterile sul vetrino;
- ✓ stemperare il materiale microbico nell'acqua sterile;

- ✓ lasciare asciugare il preparato microbico all'aria;
- ✓ fissare il preparato tagliando tre volte la fiamma;
- ✓ colorare per 1 minuto con cristal violetto-ammonio ossalato;
- ✓ lavare con acqua;
- ✓ trattare per 1 minuto con Lugol;
- ✓ lavare con acqua;
- ✓ decolorare con alcool-acetone per meno di 15 secondi;
- ✓ lavare con acqua;
- ✓ colorare con safranina per 1 minuto;
- ✓ lavare, asciugare e osservare al microscopio.

Le cellule dei batteri Gram-positivi appaiono colorate in blu-violetto, mentre le cellule dei batteri Gram-negativi in rosso.

Dopo la colorazione con cristal violetto si colorano sia le cellule dei batteri Gram positivi che quelle dei Gram negativi. Il Lugol è un mordenzante. Il trattamento con alcool-acetone decolora le cellule dei Gram negativi. Le cellule dei Gram negativi si colorano con la safranina.

b) Saggio della catalasi

Si utilizza come reagente una soluzione di perossido di idrogeno al 3% (la comune acqua ossigenata).

Molti microrganismi possiedono l'enzima catalasi e sono in grado di scindere l' H_2O_2 nel seguente modo: $2H_2O_2 + \text{catalasi} = 2H_2O + O_2$.

Procedura

Si deposita in una piastra di Petri/su un vetrino una goccia di perossido di idrogeno al 3% nella quale si stempera, con un ansa, una colonia cresciuta su substrato nutritivo agarizzato; la positività del saggio è evidenziata dalla formazione di un'effervescenza dovuta alla liberazione di ossigeno che indica la presenza della catalasi nella coltura saggiata.

c) Saggio dell'ossidasi

Si utilizza come reagente la Tetrametil-p-fenilendiammina idrocloride 1 g; molti microrganismi possiedono l'enzima citocromo a₃ ossidasi (componente del sistema di trasporto degli elettroni) che riduce il Tetrametil-p-fenilendiammina idrocloride a un composto di colore viola.

Procedura

Si preleva, con un ansa, una colonia in esame cresciuta su substrato nutritivo agarizzato, la si temperarla su carta da filtro Whatman e si aggiungono alcune gocce di reattivo; il saggio è positivo quando la coltura microbica assume al massimo entro 10 minuti una colorazione violacea a contatto con il reattivo cioè una sorta di graffio di penna a sfera blu.

d) Identificazione di un isolato batterico con altri metodi biochimici

La determinazione delle caratteristiche metaboliche (biochimiche) dei microrganismi consente di ottenere informazioni molto importanti per la loro identificazione.

Tali caratteristiche possono riguardare:

- la determinazione delle sorgenti di energia, di carbonio e azoto;
- la determinazione dei prodotti derivanti dall'utilizzazione di composti azotati;
- la sensibilità a sostanze antimicrobiche;
- la capacità di fermentare i carboidrati.

Per lo studio delle caratteristiche metaboliche del microrganismo si utilizzano terreni non selettivi differenziali, che contengono composti su cui agiscono gli enzimi implicati nello specifico processo metabolico. In genere, il risultato dell'attività enzimatica, è accompagnato da modificazioni cromatiche del substrato.

Le attività biochimiche dei batteri possono essere determinate con metodi tradizionali che prevedono l'inoculo della coltura da saggiare nello specifico substrato, oppure ricorrendo all'impiego di sistemi di identificazione multitest che contengono in forma miniaturizzata i substrati necessari all'identificazione dell'isolato. Esistono in

commercio numerosi sistemi di identificazione miniaturizzati per l'identificazione delle specie appartenenti a gruppi, a Famiglie o a singole specie. Possono essere allestiti numerosi test per identificare un microrganismo sconosciuto. La scelta dei test è dettata dalla conoscenza di alcune caratteristiche generali del microrganismo (ambiente e substrato di isolamento, morfologia, Gram reazione, catalasi, ossidasi, mobilità, ecc.) le quali consentono di classificarlo in maniera presuntiva e indirizzare l'identificazione definitiva.

Prova della fermentazione degli zuccheri

Un tipico esempio di terreno nutritivo e differenziale per la differenziazione degli enterobatteri in base alla loro capacità di fermentare il glucosio ed il lattosio con e senza produzione di gas e di produrre idrogeno solforato è il Kligler Iron Agar (KIAgar). Nella sua preparazione è fondamentale dopo la sterilizzazione lasciarlo solidificare a "becco di clarino" con una parte di fondo alta circa 2,5 cm.

Procedura

Prelevare con un ansa una colonia da un substrato di primo isolamento del microrganismo, infiggere l'ansa nel fondo della parte cilindrica del terreno colturale e terminare con lo strisciamento sul becco di clarino del KIAgar.

Dopo aver incubato a 37°C, al massimo per 18-24 ore, si possono registrare tre reazioni sul substrato:

- variazione di colore dell'agar;
- produzione di gas;
- produzione di H₂S.

Le variazioni di colore del terreno possono verificarsi sulla superficie inclinata o e/o in profondità (fondo del tubo); se l'agar diventa di colore giallo è avvenuta una reazione con acidificazione del terreno mentre se diventa di colore rosso è avvenuta un'alcalinizzazione. Le diverse reazioni registrabili sul substrato dipendono dal

rapporto tra glucosio e lattosio e dal rapporto di questi ultimi con la quantità di peptone: glucosio 1 g, lattosio 10 g e peptone 20 g.

La rilevazione della fermentazione degli zuccheri è dovuta al diverso bilanciamento tra metaboliti acidi (derivanti dalla fermentazione degli zuccheri) e metaboliti alcalini (proteine).

Quando è fermentato solo il glucosio, l'acido prodotto fa virare solo il fondo del tubo (condizioni anaerobiche), mentre in superficie il tubo resta rosso, perché i metaboliti alcalini sono preponderanti. Quando è fermentato il lattosio, tutto il tubo diventa giallo; questo perché il lattosio è presente in concentrazione 10 volte superiore al glucosio, per cui i metaboliti acidi diventano preponderanti su quelli alcalini.

Quindi, registrare nell'ordine: la reazione sulla superficie inclinata, la reazione in profondità, la produzione di gas e la produzione di H_2S .

Superficie di color rosso / fondo color giallo: fermentazione del solo glucosio

Superficie di color giallo / fondo color giallo: fermentazione del glucosio e del lattosio

Superficie di color rosso / fondo color rosso: nessuna fermentazione

Se la produzione di gas è presente, si formano delle bolle nel terreno e/o l'agar si fessura e/o si distacca dalla parete del tubo; la produzione di gas è da ritenere assente in caso contrario.

La produzione di H_2S è evidenziabile con l'annerimento di tutto il terreno o della parte più profonda.

11. Metodo di ricerca di *Salmonella* in una matrice alimentare

Metodo per rilevare la presenza di *Salmonella spp.* in alimenti per uso umano e mangimi.

Metodo presenza/assenza su 25 g di:

- 25 g di campione (sacchetto in plastica sterile con membrana filtrante - Bag filter) + 225ml di terreno di prearricchimento BPW (Buffered Peptone Water).
- Omogeneizzare in Stomacher ed incubare per 18 ore a 37°C +/- 1°C.
- Trasferimento di 0.1 ml e 1.0 ml di brodo coltura in 10 ml di brodi di arricchimento selettivi rispettivamente RPV (Rappaport Vassiliadis Broth) e MKTT (Muller Kauffmann Tetrathionate Broth Base con Novobiocin).
- Incubare RPV per 24 ore a 41.5 °C +/- 3 ore.
- Incubare MKTT per 24 ore a 37 °C +/- 3 ore.
- Trasferire un'ansata di ogni brodo coltura su terreno agarizzato selettivo XLD (Xilosio Lisina Desossicolato) ed un'ansata su *Salmonella Chromogenic Agar Base*.
- Incubare XLD e *Salmonella Chromogenic Agar Base* per 24 ore a 37°C.
- Trasferimento di colonie sospette (colonie tipiche/presuntive) eventualmente sviluppate su XLD e *Salmonella Chromogenic Agar Base* su Tryptone Soya Agar (TSA) per successive prove di conferma.
- Eseguire prove di conferma :
 - ✓ reazione di Gram ;
 - ✓ saggio della catalasi;
 - ✓ saggio dell'ossidasi;
 - ✓ prova di utilizzazione degli zuccheri su Triple Sugar Iron Agar (TSI agar);
 - ✓ identificazione con sistema biochimico miniaturizzato.