

**Corso propedeutico di microbiologia applicata**  
**15/16/17 ottobre 2013**  
**AROUNDLABNEWS**  
**Villa Cella - Milano ,Via Novara 89**

# **Le basi della analisi microbiologica degli alimenti**

*Gabriella Rondinini*

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti*

*Università di Udine*

# Il laboratorio di microbiologia

- ✓ Attrezzatura essenziale
- ✓ Strumentazione mirata
  - Settore alimentare
  - Ambientale
  - medico
  - Farmaceutico
  - altri

# Il laboratorio di microbiologia

## ➔ Locale

- Separato – porte finestre chiudibili
- Acqua
- Luce
- Forza motrice
- Gas
- Deflusso fumi e vapori
- Depurazione aria

# Attrezzatura essenziale

**Il lavoro del microbiologo deve avvenire sempre  
in condizioni di sterilità**

- ➔ Cappa a flusso laminare
  - Cannelli bunsen
- ➔ Autoclavi
- ➔ Stufe a secco

# Attrezzatura essenziale

- ✓ Termostati (da T.a. a +65°C)
- ✓ Bagni termostatici (da T.a. a +100°C)
- ✓ Sistemi per anaerobiosi (incubatori, giare)
- ✓ Frigoriferi
- ✓ Congelatori
- ✓ Centrifughe
- ✓ Omogeneizzatori
  - peristaltico (*Stomaker*)
  - rotante

## • MICROSCOPIO

# Attrezzatura essenziale

- ✓ Bilancia (precisione 0.1 g)
- ✓ pH metro (precisione 0.1 unità a 25°C)
- ✓ Termometri
- ✓ Misuratore  $a_w$  ( $\pm 0,01$  unità a 25°C)
- ✓ Misuratore potenziale redox
- ✓ Miscelatore Vortex
- ✓ pipettatori automatici con puntali sterili da 10 $\mu$ L ed 1 $\mu$ L

# Vetreteria ed utensili per analisi batteriologiche

- Vetro termoresistente
  - Materiali plastici monouso
  - Materiali plastici riutilizzabili e autoclavabili
- 
- ✓ provette
  - ✓ bicchieri
  - ✓ beute
  - ✓ cilindri graduati
  - ✓ palloni
  - ✓ bottiglie, flaconi, altri contenitori
  - ✓ Pipette
  - ✓ Piastre
  - ✓ Anse , spatole

# I microrganismi degli alimenti

protecnologici

alterativi

patogeni

indicatori



# protecnologici

Microrganismi utili che caratterizzano i prodotti

Naturalmente presenti

innesti naturali in caseificio

fermentazioni in vegetali e salami

lieviti nelle uve e nel mosto

acetici nelle madri

# protecnologici

Microrganismi utili che caratterizzano i prodotti

Selezionati e aggiunti volontariamente

colture da yogurt

colture da burro

ceppi selezionati per formaggi e salami

colture fungine per formaggi erborinati

lieviti per vinificazione

# Microrganismi alterativi

*batteri*

*muffe*

*lieviti*

ad attività

- proteolitica
- glicolitica
- lipolitica

differenti a seconda

- del substrato alimentare
- del processo

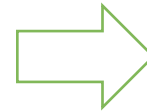
# Microrganismi alterativi

- **alimenti di origine animale**

carni, pesci, latte, uova

pH 6,5-7,0

degradati prevalentemente da



***batteri***

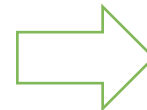
- **alimenti di origine vegetale**

verdure, frutti

vino, birra, bibite

pH 5.5-2.0

degradati prevalentemente da



***muffe e lieviti***

# patogeni

- Patogeni “classici”
  - *Salmonella*
  - *Listeria monocytogenes*
- Patogeni “emergenti”
  - Batteri
  - Muffe tossinogene
  - Virus
  - Parassiti (Protozoi, Vermi)

# Esempi di patogeni emergenti

- **Batteri**

- *Campylobacter* spp
- *Aeromonas* spp
- *Vibrio* spp
- *Enterobacter sakazakii*
- *Salmonella enteritidis*

- **Muffe**

- *Fusarium*

- **Virus**

- Norwalk virus

- **Parassiti**

- *Cryptosporidium parvum*
- *Anisakis simplex*

# Microrganismi indicatori

Dato che è impossibile tenere sotto controllo tutti i microrganismi presenti

mirare il controllo solo a quelli determinanti per la qualità microbiologica di un prodotto

# Microrganismi indicatori

## *Qualità igienica*

### ➔ **indici di salubrità**

- microrganismi patogeni

### ➔ **indici di carenza di igiene**

- microrganismi alterativi
- microrganismi indicatori generici
- carica microbica ambientale



# microrganismi indicatori di qualità

Impasto di pane	<i>Bacillus</i> spp
Conserve di frutta	<i>Bissochlamys</i> spp
Formaggi stagionati	Clostridi butirrici
Vegetali in scatola	Spore di <i>Bacillaceae</i>
Vino, birra	Batteri lattici e acetici
Zucchero	<i>Leuconostoc</i> spp
Succhi e derivati di frutta bibite	Lieviti - Muffe Batteri lattici
burro	<i>Pseudomonas</i> spp, Coliformi, muffe

# HACCP e analisi microbiologiche

## Validità dei criteri microbiologici

- orientamento per stabilire l' accettabilità di un prodotto alimentare
- verifica e validazione delle procedure HACCP

fissare criteri microbiologici utili a raggiungere gli obiettivi sopra citati.

REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE  
del 15 novembre 2005  
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

## **prove per verificare il rispetto dei criteri**

*“Gli operatori del settore alimentare effettuano  
....analisi per verificare il rispetto dei criteri  
microbiologici ....*

*...quando convalidano o controllano il corretto  
funzionamento delle procedure basate sui  
principi HACCP e sulla corretta prassi igienica”*

# Criterio microbiologico

Definisce l' accettabilità di

- prodotto
- processo

In base a:

- quantità e/o qualità dei microrganismi
- quantità di tossine/metaboliti

# **l'analisi microbiologica dei prodotti alimentari**

## Trasporto del campione per l'analisi microbiologica (ISS)

- Trasportare il campione in modo da non modificare il numero dei microrganismi presenti
- Prodotti deperibili non congelati →  $+0^{\circ}\text{C} - +4^{\circ}\text{C}$
- Prodotti congelati → in tale stato fino all'analisi
- Analisi entro max 36 ore dal prelievo

# Esigenze dei microrganismi *chemioorganotrofi*

- Carbonio organico
- Azoto organico/inorganico
- Uno o più aminoacidi
- Una o più vitamine
- Sali minerali

# Terreni colturali ingredienti supplementi

Per consentire la crescita  
dei microrganismi  
è necessario fornire loro  
un substrato da metabolizzare



# Terreni colturali

- **Terreni nutritivi liquidi:** detti anche brodi, sono preparati sciogliendo in acqua tutti i componenti necessari
- **Terreni nutritivi solidi:** sono resi tali aggiungendo ai nutrienti, una sostanza gelificante

## *agar*

mucopolisaccaride estratto da alghe rosse

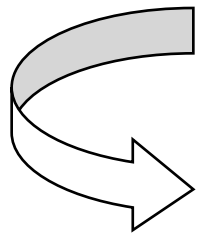
fluidifica a temperature  $> 85^{\circ}\text{C}$

solidifica a temperature  $< 45^{\circ}\text{C}$

In genere è usato a concentrazioni dell' 1,5% per preparare terreni solidi e allo 0,75% per terreni semi-solidi (agar soft)

## Terreni colturali

- La maggior parte dei terreni colturali usati in microbiologia si trova in forma disidratata completo di tutti gli ingredienti necessari.
- Per la preparazione è sufficiente pesare il terreno, aggiungere il volume d' acqua riportato nelle istruzioni, sciogliere al calore, aggiustare il pH, sterilizzare



quindi mettere

in provetta i terreni liquidi

in piastra i terreni solidi (agarizzati)

Anche l' **agar** si trova in forma disidratata, così da poter solidificare, se necessario, anche substrati originariamente liquidi

# Terreni colturali

- Naturali
- Semisintetici
- Sintetici → disponibili in commercio

- Generici
- Di arricchimento
- Selettivi
- Differenziali

*Liquidi o solidi*

# Terreni colturali

## ✿ **Generici** (substrati di base)

- Conta batterica totale
- Conta eumicetica totale

## ✿ **Di arricchimento**

- Aggiunte di materiali  
(estratto di lievito, sangue)  
Per microrganismi particolarmente esigenti

# Terreni colturali

- ***Terreni selettivi***

- Resi selettivi per aggiunta di sostanze che inibiscono microrganismi diversi da quelli che si desidera studiare

- ***Terreni differenziali***

- Terreni selettivi aggiunti di sostanze in grado di rilevare particolari attività metaboliche
- consentono di differenziare specie diverse nell'ambito di un genere

# Diluenti

*utilizzati per l'allestimento delle diluizioni del campione*

- **SOLUZIONE FISIOLÓGICA**

NaCl 8,5 g

H<sub>2</sub>O 1000 ml

pH = 7

- **SALE PEPTONE O SALE TRIPTONE**

Peptone (o triptone) 1,0 g

NaCl 8,5 g

H<sub>2</sub>O 1000 ml

pH = 7

- **SOLUZIONE DI RINGER 1:4**

Soluzione fisiologica + Na Cl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>

pH = 6,9 ± 7

- **SODIO CITRATO AL 2%**

# Diluenti

## ● ***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)

# Perché diluire ?

## *Conta in piastra:*

è possibile contare in modo affidabile solo piastre contenenti fra **20** e **200** colonie.

- **se il campione è solido** deve essere omogeneizzato in diluente e diluito fino a quando l' aliquota che si intende piastrare non contiene il numero (presunto) di colonie considerato leggibile
- **se il campione è liquido** è necessario diluire fino a quando l' aliquota che si intende piastrare non contiene il numero presunto di colonie leggibile



# Preparazione del campione

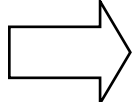
scopo della preparazione di un campione  
per un' analisi microbiologica

*omogeneizzare il prodotto mediante l' utilizzo di un diluente  
senza danneggiare le forme microbiche presenti che si vogliono  
determinare*

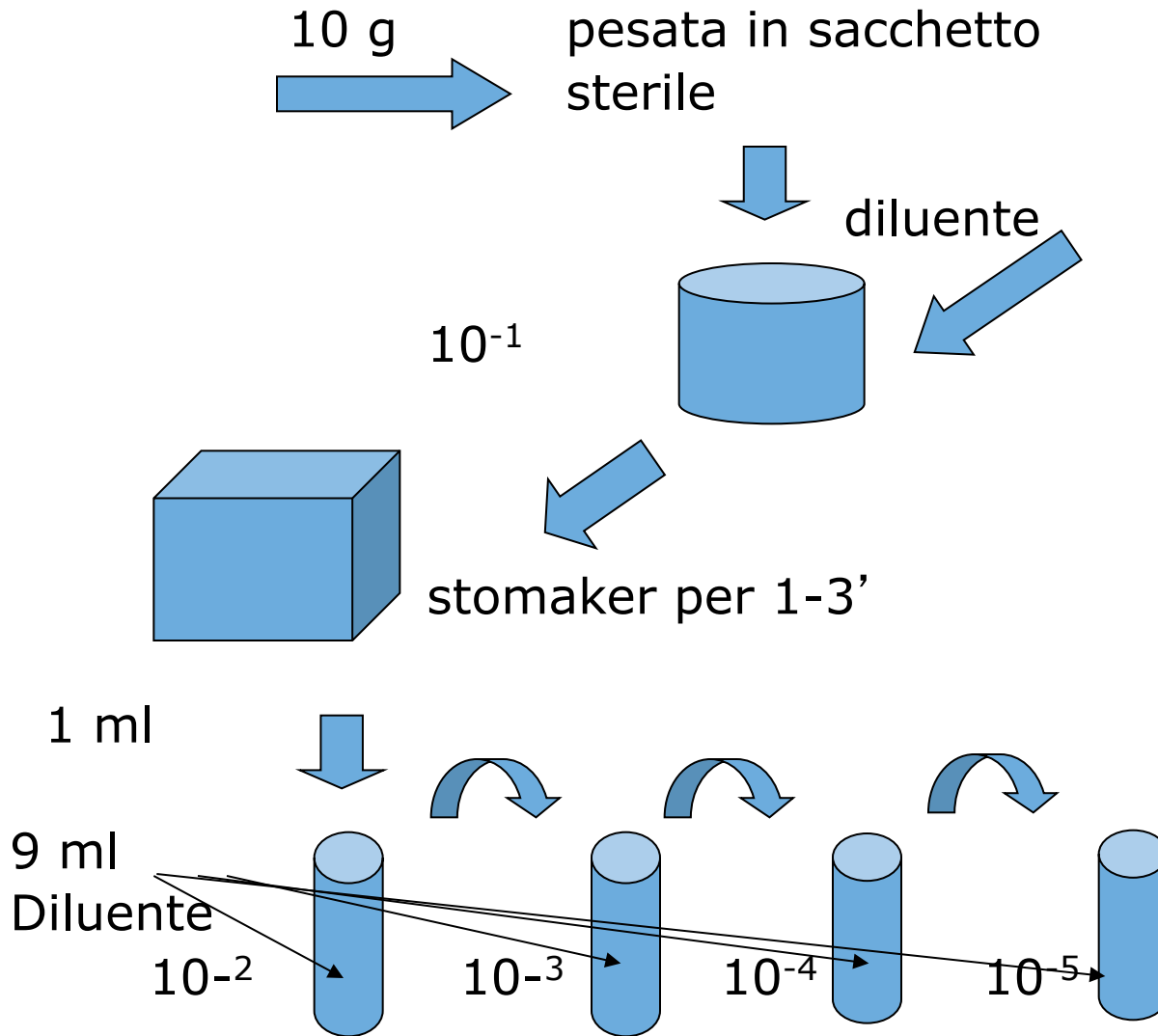
- Si deve operare in sterilità per evitare contaminazioni esterne
- Le modalità di preparazione sono diverse a seconda della natura del prodotto.

# Prodotti solidi

- Pesare sterilmente una quantità rappresentativa del campione in esame (10-25 g)  
in un sacchetto sterile
- aggiungere diluente sterile 1/10
- omogeneizzare
- L' omogeneizzazione viene effettuata con *Stomacher*

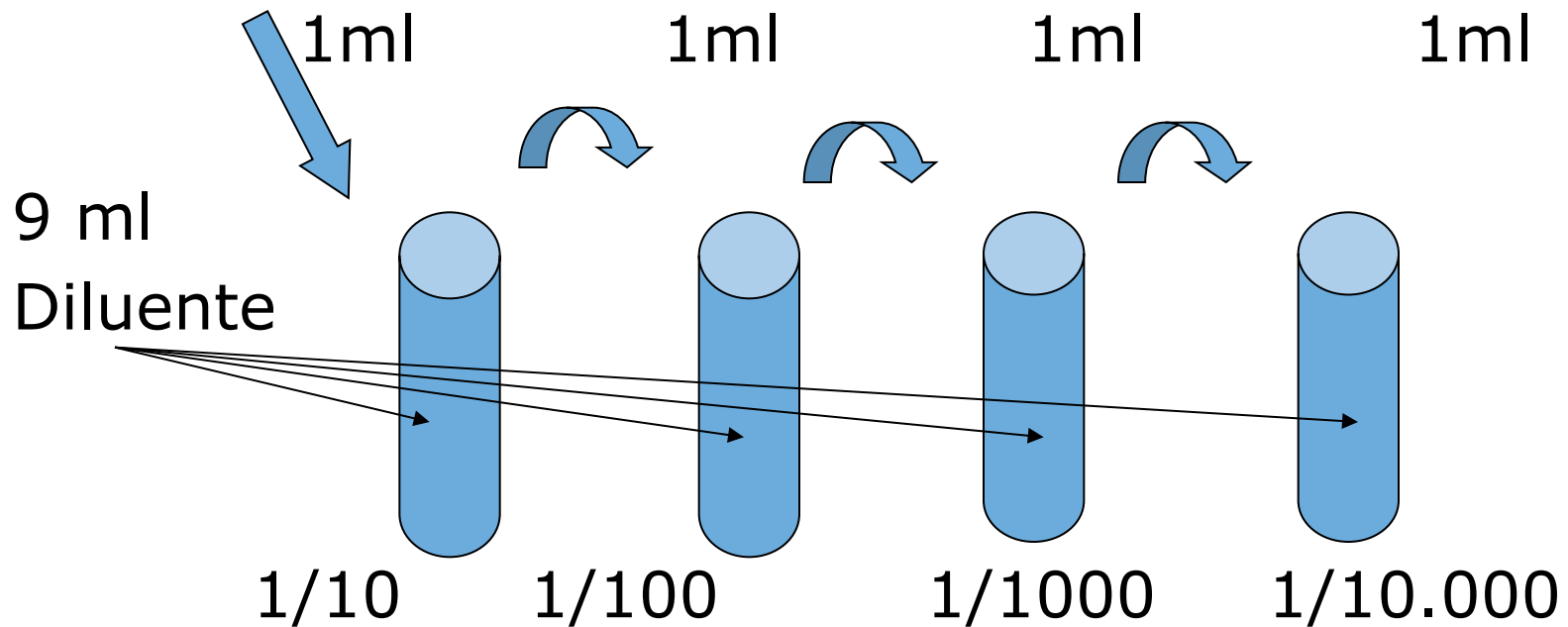
durata dell' omogeneizzazione  stabilita in base  
alla durezza e alla consistenza del campione

# Preparazione prodotto solido

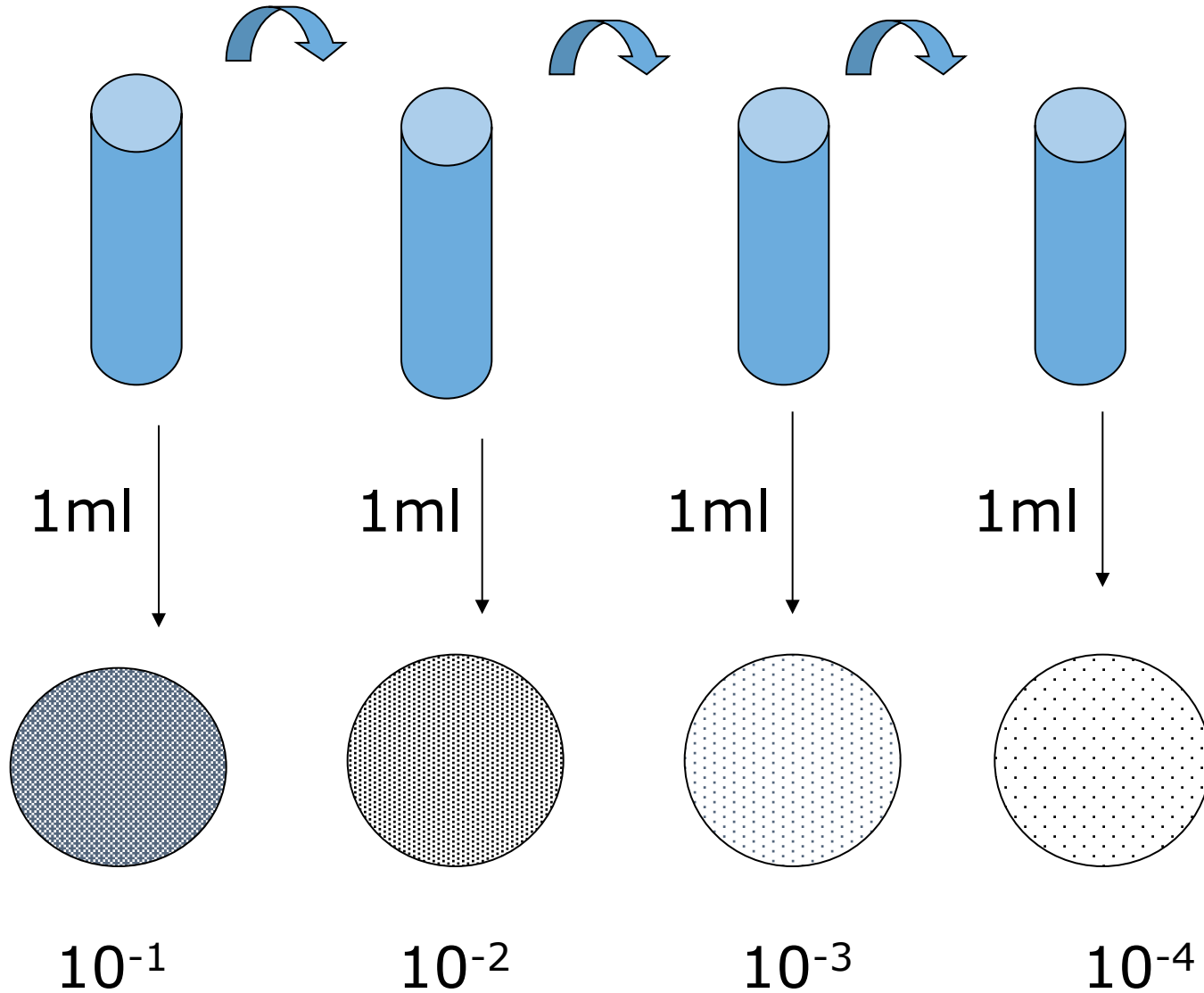


# Prodotti liquidi

campione  
(tal quale)



# Semina in piastra



# Tecniche di semina

- per incorporamento
- per spatolamento superficiale
- in doppio strato
- per infissione
- in alto strato
  
- Tecnica dello striscio

# Semina per incorporamento

il campione viene diluito

- ✓ un' aliquota nota viene pipettata in una piastra vuota, alla quale si aggiunge substrato agarizzato fuso e raffreddato ( $\sim 45^{\circ}\text{C}$ )
- ✓ substrato e inoculo vengono omogeneizzati. Dopo la solidificazione il substrato viene incubato per non meno di 24 h alla temperatura opportuna
- ✓ si contano le colonie: ogni colonia è derivata da una cellula o da un aggregato di cellule immobilizzato nell' agar
- ✓ il numero di colonie viene moltiplicato per il fattore di diluizione

# Semina per spatolamento superficiale

il campione viene diluito

- un' aliquota nota (0,1 ml) viene pipettata sulla superficie del substrato agarizzato, precedentemente versato in piastra e solidificato
- l' inoculo viene distribuito sul substrato che viene incubato per non meno di 24 h alla temperatura opportuna
- ✓ si contano le colonie: ogni colonia è derivata da una cellula o da un aggregato di cellule immobilizzato nell' agar
- ✓ il numero di colonie viene moltiplicato per il fattore di diluizione



## Tecniche di conta: la conta in piastra

Si considerano solo le piastre con un numero di colonie  
< 200 e > 20.

Il numero dei microrganismi in 1 ml/1g di prodotto,  
è dato dalla formula:

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1 n_2)d}$$

dove:

$\Sigma C$ : è la somma del numero di colonie contate

$n_1$  : numero di piastre utilizzate per la 1° diluizione

$n_2$  : numero di piastre utilizzate per la 2° diluizione

$d$  : fattore di diluizione

# Esempi di calcolo

- ◆ 2 piastre per diluizione,  $10^{-3}$ - $10^{-4}$
- ◆  $10^{-3}$ : 170 e 190 colonie -  $10^{-4}$ : 20 e 22 colonie
- ◆ Si usano entrambe le diluizioni e si calcola la media:  
$$(170+190+200+220)/4 = 195$$
- ◆ si moltiplica per il fattore di diluizione:  
$$195 \times 10^3$$
- ◆ si esprime il risultato con una sola cifra significativa:  $2.0 \times 10^5$  ufc/ml

# I problemi della conta in piastra

- non tutti i microrganismi vitali sono coltivabili
- in genere è necessario avere fra 20 e 200 colonie per considerare affidabili i risultati
- sono necessarie in genere diverse diluizioni per campione
- una colonia può originarsi da un microrganismo o da un aggregato

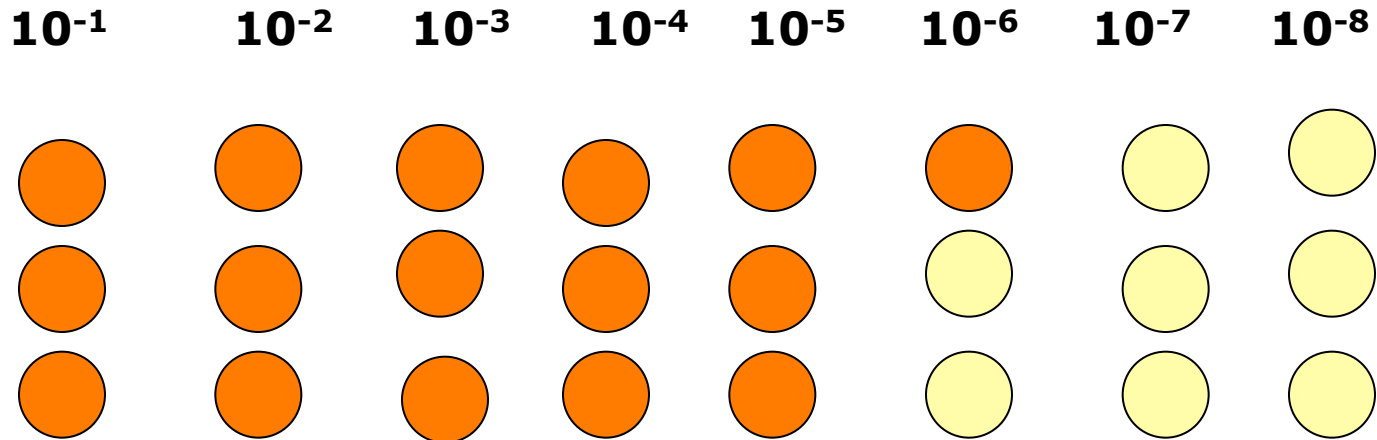
(unità formanti colonia = U.F.C.)

# Tecnica del *most probable number*

il campione solido viene diluito

- un' aliquota nota di ciascuna diluizione viene pipettata in tubi contenenti il substrato (da 3 a 7 tubi per diluizione)
- il substrato che viene incubato per non meno di 24h alla temperatura opportuna
- si individuano i tubi positivi per ogni diluizione (presenza di torbidità, di gas, etc.)
- utilizzando delle tabelle statistiche si determina, dalla combinazione di tubi positivi a partire dalle 3 ultime diluizioni cresciute, il numero più probabile di microrganismi.

# valutazione del numero più probabile di microrganismi



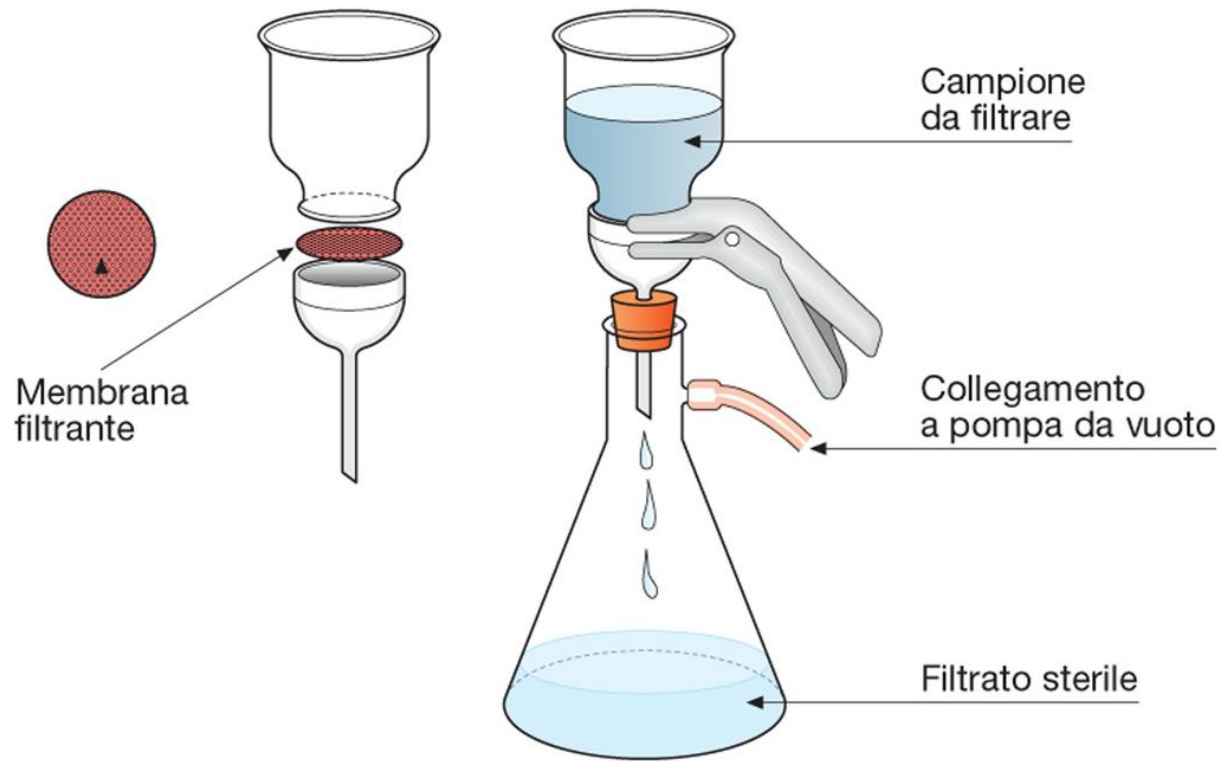
1. individuare la **diluizione limite**: è l'ultima diluizione, se esiste, con tutti i tubi positivi; nell'esempio è  $10^{-5}$
2. individuare il **numero caratteristico**: è un numero a 3 cifre sostituito dal numero di tubi positivi nella diluizione limite, dal numero di tubi positivi in quella successiva e poi ancora nella successiva: nell'esempio è **310**
3. ricavare dalle tabelle MPN il numero più probabile corrispondente al numero caratteristico: nell'esempio **4**
4. moltiplicare per il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione limite:  **$4 \times 10^5$** .

# Conte su membrana

Per la determinazione del numero di microrganismi in volumi elevati (acqua)

- Il campione viene filtrato su una membrana porosa (diametro dei pori 22-45  $\mu$ ) che viene posta sul substrato agarizzato idoneo per il gruppo microbico da valutare
- Dopo l' incubazione si svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, la cui quadrettatura semplifica la conta.

# Conte su membrana



**Criteri microbiologici  
e  
Metodi di analisi  
nel settore alimentare**



REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE  
del 15 novembre 2005  
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

## **prove per verificare il rispetto dei criteri**

*“Gli operatori del settore alimentare effettuano  
....analisi per verificare il rispetto dei criteri  
microbiologici ....*

*...quando convalidano o controllano il corretto  
funzionamento delle procedure basate sui principi  
HACCP e sulla corretta prassi igienica”*

REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE  
del 15 novembre 2005  
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

*I risultati delle analisi dipendono dal metodo analitico  
utilizzato*

*pertanto occorre associare ad ogni criterio  
microbiologico un metodo di riferimento specifico.*

REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE  
del 15 novembre 2005  
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

*gli operatori del settore alimentare devono avere la  
possibilità di usare metodi d'analisi diversi dai metodi  
di riferimento, in particolare quelli più rapidi, a  
condizione che tramite tali metodi alternativi si  
ottengano risultati equivalenti*

REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE  
del 15 novembre 2005  
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

*È necessario definire un piano di campionamento per  
ciascun criterio, per garantire un'attuazione  
armonizzata*

autorizzando tuttavia

*l'uso di altri sistemi di campionamento e analisi,  
compreso il ricorso ad organismi indicatori  
alternativi, a condizione che essi forniscano garanzie  
equivalenti in merito alla sicurezza alimentare*

Norme generali per il campionamento e la preparazione dei campioni da analizzare  
REG. (CE) n. 2073/2005 Allegato 1

*In assenza di norme più specifiche in materia di campionamento e di preparazione dei campioni da analizzare*

*si utilizzano come metodi di riferimento*

- ***le norme ISO***

(International Organisation for Standardization)

- ***gli orientamenti del Codex alimentarius***

# Piani di campionamento

- Piano Campionamento a due classi
- Piano Campionamento a tre classi

Il documento del Codex Alimentarius CAC/GL 21-1997 per i criteri microbiologici da applicare nel campionamento degli alimenti tiene in considerazione diversi elementi indissociabili

# Piano di campionamento

*Deve considerare:*

- Tipo di microrganismo o metabolita
- Limite di accettabilità
- Categoria derrate alimentari
- Stadio di applicazione
- Comportamento in caso di risultati non soddisfacenti.

# Piani di campionamento

## Piano di Campionamento:

“**n**” numero di unità che costituiscono il campione

“**c**” numero massimo di risultati che possono presentare nel Piano a due Classi un valore superiore al limite “**m**” oppure in un Piano a tre Classi il numero massimo dei valori compresi tra “**m**” e “**M**”



# Piani di campionamento

## *Piano di Campionamento a due Classi*

basato su un giudizio qualitativo e si applica per la ricerca di microrganismi patogeni che devono risultare assenti in una serie (n) di unità campionarie o per il controllo di sterilità

prevede due sole categorie di accettabilità

*favorevole*

*sfavorevole*

quindi con “c” = “o”.

# Piani di campionamento

## *Piano di Campionamento a tre Classi*

caratterizzato dai valori “n”, “c” ed “M” e si applica per valutare le caratteristiche microbiologiche di tipo quantitativo relative a

- microrganismi che non costituiscono un pericolo diretto per la salute  
(es. microrganismi alterativi come batteri psicrotrofi, batteri lattici, muffe e lieviti)
- microrganismi che possono costituire un pericolo indiretto di bassa entità (es. indicatori come *Enterobacteriaceae* e coliformi).

# Piano di campionamento a 3 classi

In funzione della concentrazione dei microrganismi nel campione, la qualità dell' alimento può essere suddivisa in tre classi:

- **Qualità accettabile.** Contenuto microbico inferiore a un valore “m” per ml/g di prodotto
- **Qualità marginale.** La concentrazione dei microrganismi nel campione supera “m”, ma è inferiore a “M” .
- **Qualità inaccettabile.** La concentrazione dei microrganismi è superiore al valore “M”

# Criteri di sicurezza alimentare regolamento CE n.2073/2005

Microrganismi patogeni “*classici*”  
correlabili a più categorie alimentari

*Listeria monocytogenes*

*Salmonella spp*

# Criteri di sicurezza alimentare regolamento CE n.2073/2005

Patogeni alimentari emergenti

➔ ***E.coli* VTEC O157**

*E.coli* ⇨ indice contaminazione fecale

➔ ***Staphylococcus* coagulasi positivi**

➔ ***Enterobacteriaceae***

*Enterobacter sakazakii*

# Criteria di igiene di processo regolamento CE n.2073/2005

☀ *marcatori microbiologici* che siano indici dello stato di igiene di produzione

- prodotti carnei
- lattiero-caseari
- ovoprodotti
- prodotti ittici
- ortaggi, frutta e derivati.

# *Microrganismi indicatori* carni e prodotti carnei

<b>Enterobatteriacee</b>	50-100 ufc/cm <sup>2</sup>	carcasse
<b><i>E.coli</i></b>	50-500 ufc/cm <sup>2</sup> o g	carni macinate preparazioni di carne
<b>Batteri aerobi totali</b>	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^5$ ufc/g o cm <sup>2</sup>	carcasse carni macinate preparazioni di carne

# *Microrganismi indicatori*

## Latte e prodotti lattiero-caseari

<b>Enterobatteriacee</b>	ass. in 10g 10 ufc/g	Latti infanzia e dietetici Latti/prodotti pastorizzati altri prodotti
<b><i>E.coli</i></b>	10 ufc/g 100 ufc/g	panna – burro formaggi
<b>Stafilococchi coagulasi +</b>	10 ufc/g 100-ufc/g 100-10 <sup>4</sup> ufc/g	Latte in polvere formaggi freschi formaggi da latte termizz. formaggi da latte crudo



# *Microrganismi indicatori*

## Ortaggi - frutta e prodotti derivati

### *E.coli*

➔ max 100 ufc/g

- frutta e ortaggi IV gamma
- succhi non pastorizzati

# Metodi di analisi microbiologica

<b><i>Metodi ufficiali</i></b>	Sono pubblicati su bollettini normativi a livello nazionale e comunitario
<b>Metodi di riferimento</b>	Validati da organismi internazionali quali ISO , AOAC, IDF, CEE, ecc.
<b>Metodi di routine</b>	Metodi riconosciuti, ma rispetto a quelli di riferimento sono di più rapida esecuzione

# Metodi di analisi microbiologica

## *metodi non ufficiali*

<b>Metodi di routine</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mancanza di metodi ufficiali</li><li>• Semplificazione dei metodi di riferimento</li></ul>
<b>Metodi di <i>screening</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• differiscono dai metodi di riferimento</li><li>• risultati di massima</li><li>• semplici ed economici</li></ul>
<b>Metodi interni</b>	Metodi elaborati all' interno di un laboratorio. E' necessario conservare documentazione e fonti bibliografiche

# Metodi di analisi di riferimento

Microrganismo/tossina	Metodo di analisi
Aerobi totali	ISO 4833
Enterobatteriacee	ISO 21528-1
Salmonella	EN/ISO 6579
<i>E.coli</i>	ISO 16649-1 o 2
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ISO/TS 22964
<i>Listeria monocytogenes</i>	EN/ISO 11290-1 o 2
Stafilococchi coagulasi +	EN/ISO 6888-1 o 2
Enterotossine stafilococciche	<b>Metodo europeo di screening per gli stafilococchi coagulasi +</b>
<i>Bacillus cereus</i>	EN/ISO 7932

## Carica batterica totale (aerobi mesofili)

Per una valutazione della qualità globale del prodotto  
(Indice di qualità)

- **Plate Count Agar (PCA)**

Tryptone 5,0 g

Estratto di lievito 2,5 g

Destrosio 1,0 g

H<sub>2</sub>O distillata 1000 ml

Agar 20,0 g - pH = 7

Semina per incorporamento

incubazione a 30°C per 48- 72 ore

Si contano tutte le colonie cresciute.

# Carica batterica totale – metodi ISO

- **PLATE COUNT AGAR (APHA) ISO 4833: 2004**

Terreno per determinare la carica batterica nei prodotti alimentari e nelle acque. Conta a 30°C

- **MILK PLATE COUNT AGAR**

ISO/DIS 6610 – DIN 10192 - ISO 4833: 2004

Terreno per la determinazione della carica batterica totale nei prodotti lattiero-caseari

- **GELATIN PEPTONE AGAR (AGAR GELISATO)**

Terreno per il conteggio batterico totale

**ISO 4833: 2004**

# Carica eumicetica totale

- Sabouraud dextrose agar
- Agar malto
- Agar patata
- YGC (Yeast glucose chloramphenicol)

pH = 5,5

Semina per spatolamento superficiale

Incubazione a 25-28°C per 3-5 gg

# Carica eumicetica totale

- LIEVITI E MUFFE

## **YEAST GLUCOSE CHLORAMPHENICOL AGAR (ISO 7954: 1987)**

Terreno per la ricerca e il conteggio di lieviti e muffe nei prodotti lattiero-caseari e altri alimenti.



# ***Enterobacteriaceae* – metodi ISO**

- ISO 21528-1:2004 - Metodi orizzontali per la ricerca e la conta  
Parte 1: ricerca e conta attraverso l'uso del MPN con pre-arricchimento
- ISO 21528-2:2004 - Metodi orizzontali per la ricerca e la conta  
Parte 2: metodo della conta delle colonie.

# ***Enterobacteriaceae***

Enterobatteri totali	Violet Red bile glucose agar
Coliformi totali	Violet Red Bile Lactose agar o brodo Brodo laurilsolfato
Coliformi totali (ISS) Terreno solido	Violet Red Bile Lactose Agar 30°C X 24 ore
Coliformi totali (ISS) Terreno liquido (MPN)	Brodo bile laurilsolfato triptosio Brodo Bile verde brillante 30°C X 24-48 ore

# Coliformi – metodi ISO

## *Conta dei coliformi*

- ISO-4831:2006 – Conta dei coliformi con la tecnica del MPN
- ISO-4832:2006 – Conta dei coliformi a 30°C in piastra Petri

Preparare il campione secondo quanto previsto dall' International Standard ISO 4831:2006

# ***Escherichia coli***

- ***E.coli* 0157: H7**  
(ISO/DIS 16654: 1999)
- ***E.coli* beta-glucuronidasi +**  
(ISO 10980: 2002 / ISO 16649-2:2001)
- **Coliformi totali**  
(UNI EN ISO 9308-1: 2002)(acque)

# ***Listeria monocytogenes* – metodi ISO**

Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di

## ***Listeria monocytogenes***

Parte 1: Metodo di ricerca

ISO 11290-1:1996/Amd 1:2005

Parte 2: Metodo di conta

ISO 11290-2:1998/Amd 1:2005

- **LISTERIA SELECTIVE MEDIUM (PALCAM)**  
(ISO 11290: 2005) terreno selettivo per l'isolamento
- **LISTERIA CHROMOGENIC MEDIUM**  
(ISO 11290: 2004) Terreno selettivo cromogenico per l'isolamento di *Listeria monocytogenes* negli alimenti

# Microbiologia degli alimenti – metodi ISO

- Metodo orizzontale per la ricerca di ***Bacillus cereus***
  - Tecnica del *Most probable number* e metodo di riconoscimento ISO 21871 (2006)
- Metodo orizzontale per la ricerca di ***Campylobacter*** spp.
  - Parte 1: Metodo di ricerca ISO 10272 – 1 (2006)

# Microbiologia degli alimenti – metodi ISO

- **Stafilococchi coagulasi +**

UNI EN ISO 6888-1: 2004

BAIRD PARKER MEDIA Terreno selettivo per l'isolamento di *Staphylococcus aureus* negli alimenti.

- ***Salmonella* spp.** (ISO 6579: 2004)

- **Enterococchi** (UNI EN ISO 7899-2: 2003)

- ***Pseudomonas*** (UNI EN ISO 12780: 2002)

# Metodi microbiologici (ISS)

Microrganismi mesofili	Plate Count Agar 25°-30°C per 72 ore
Lieviti e muffe	Yeast dextrose cloramphenicol agar 25°C X 3 gg
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird Parker Agar 37°C X 24-48 ore
<i>Staphylococcus aureus</i> (MPN)	TSB ➡ Baird Parker Agar 37°C X 24-48 ore



# **Primo riconoscimento dei microrganismi**

# Caratteri colturali

- Uno dei primi caratteri da considerare è l'aspetto che assumono le colonie dei microrganismi dopo essere cresciute sui terreni.

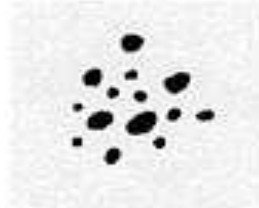
(aspetto macroscopico o colturale)

- I caratteri colturali forniscono indizi utili per l'identificazione.

# Descrizione delle colonie

## *dimensioni e forma*

punctiform



under 1mm in diameter

circular



filamentous



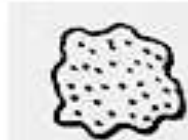
long, irregular, interwoven threads

rhizoid



irregular, branched

irregular



# Descrizione delle colonie *profilo*

effuse



very thin, spreading

flat



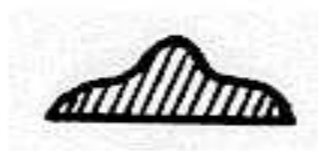
raised



convex



umbonate



# Descrizione delle colonie *superficie*

smooth



contoured



undulating

radiate



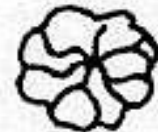
radiating rings

concentric



concentric rings

rugose



wrinkled

# Descrizione delle colonie *marginie*

entire



undulate



erose



filamentous



curled



# Primo riconoscimento dei microrganismi

## *aspetto macroscopico della colonia*

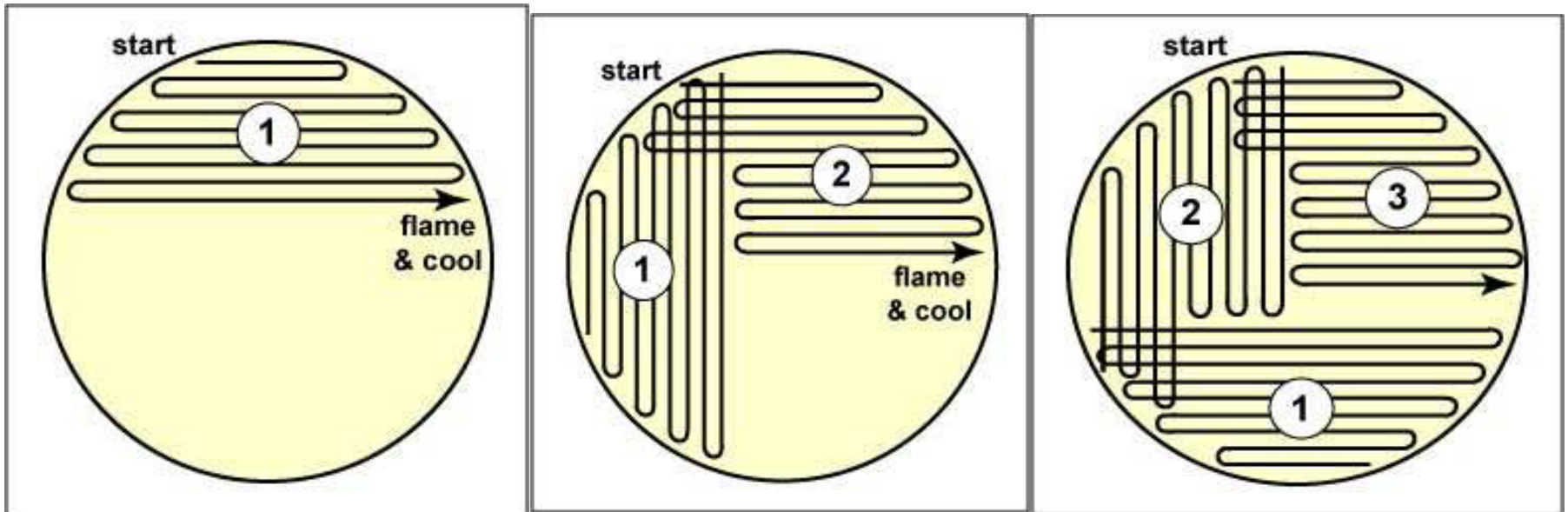
- forma
- dimensioni
- margine
- profilo
- superficie
- consistenza
- pigmentazione
- odore

# Isolamento in coltura pura

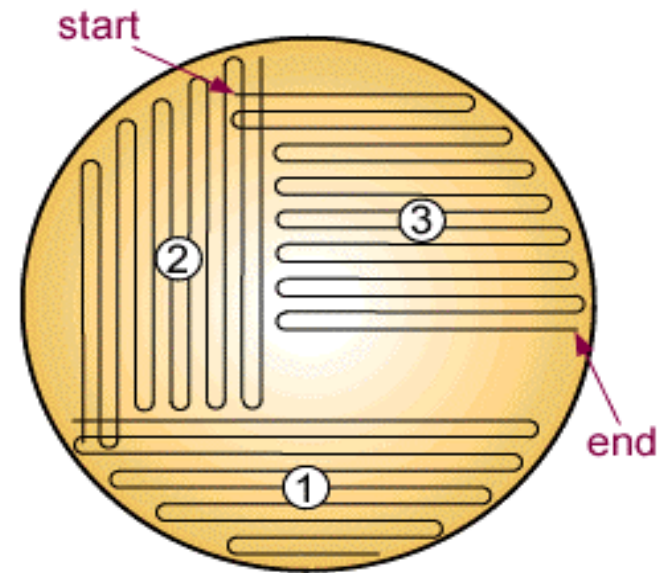
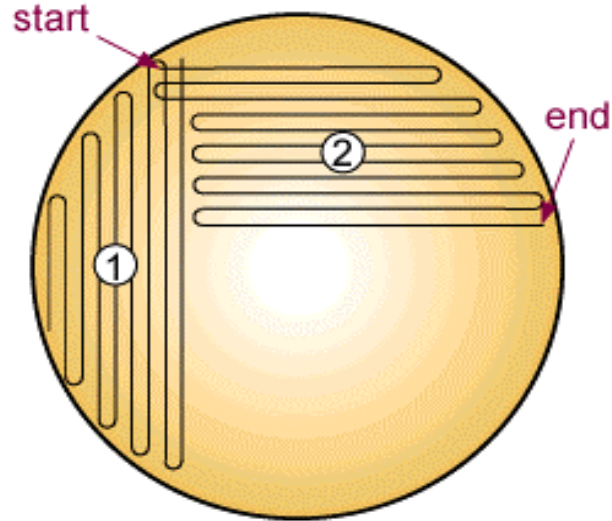
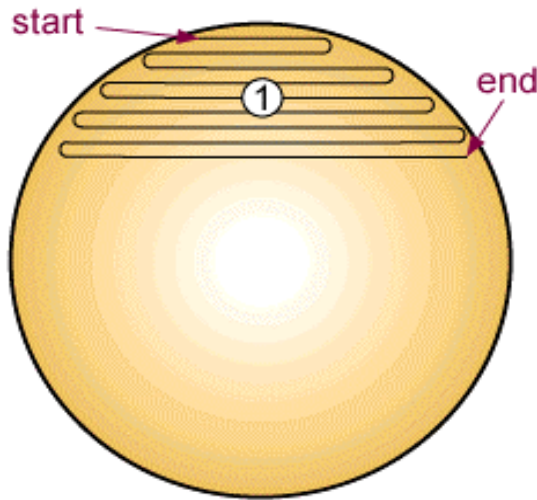
- Scegliere una colonia separata su una piastra
- Strisciarla con un'ansa su un terreno nutritivo
- Incubare alla temperatura opportuna



# Isolamento in coltura pura



# Isolamento in coltura pura



# Caratteristiche visive della crescita in brodo

- 1. *Intorbidamento***: formazione di una opacità più o meno densa
- 2. *pellicola***: una piccola quantità di cellule forma un velo sulla superficie del terreno.
- 3. *sedimento***: le cellule si depositano sul fondo del brodo, ma si risospendono se la provetta viene agitata.
- 4. *Mucosità***: le cellule formano aggregati quando si agita la provetta
- 5. *Presenza di gas disciolto***: produzione di bolle o schiuma quando la provetta viene agitata o viene inserita un'ansa calda.

# Tecniche microscopiche

- **Microscopio ottico**

sistema di lenti e sorgente luminosa

➔ Ingrandimento 1000 X

- **Microscopio elettronico**

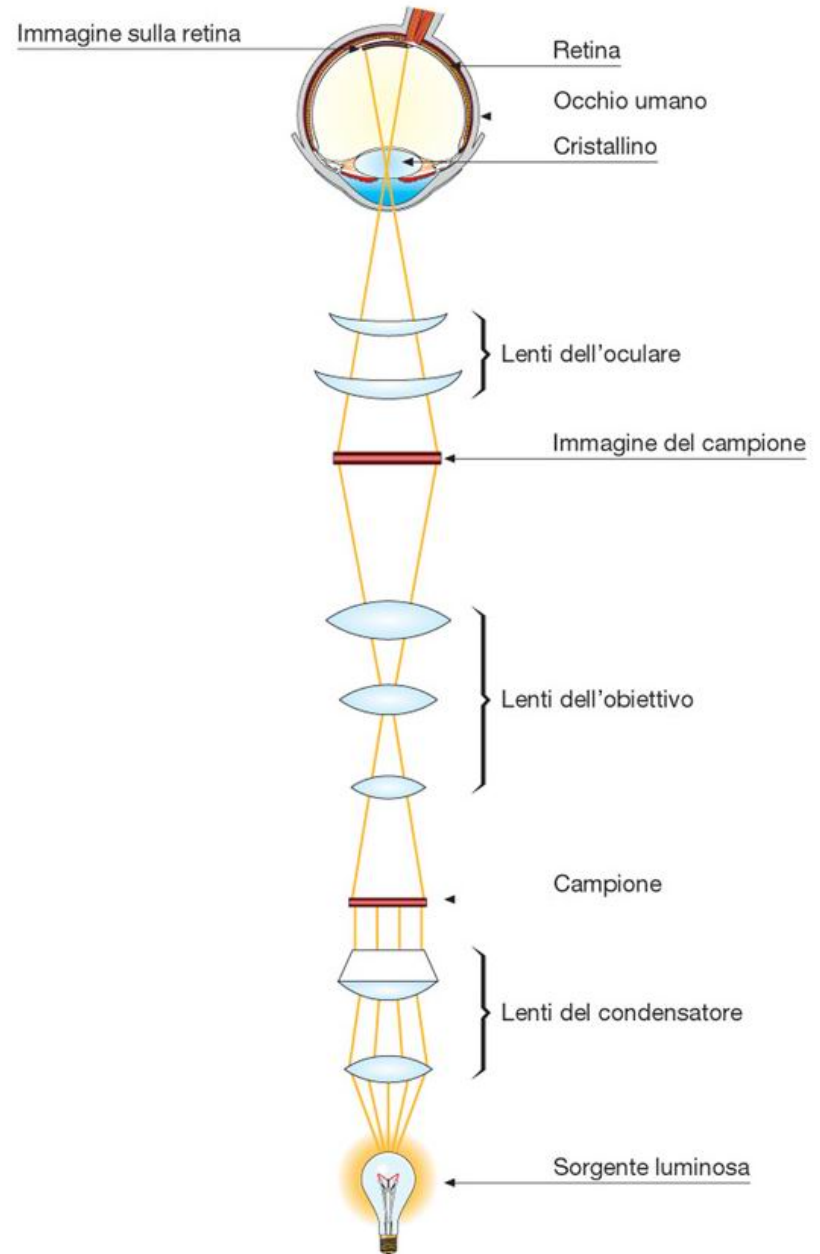
fascio di elettroni invece di sorgente di luce

➔ Ingrandimento  $10^8 X$

- a scansione (per superfici)
- a trasmissione

# **Il microscopio ottico**

# Il microscopio ottico



# Il microscopio ottico

- ✓ In campo chiaro
  - a fresco
  - con colorazioni
  - a immersione
- ✓ In campo scuro
- ✓ A contrasto di fase
- ✓ A interferenza differenziale
- ✓ A fluorescenza

# Batteri al microscopio



cocco



bacillo



vibrione



spirillo

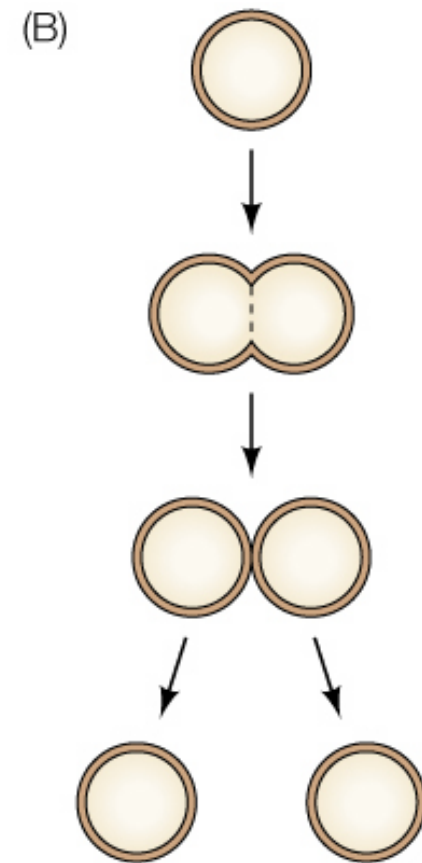
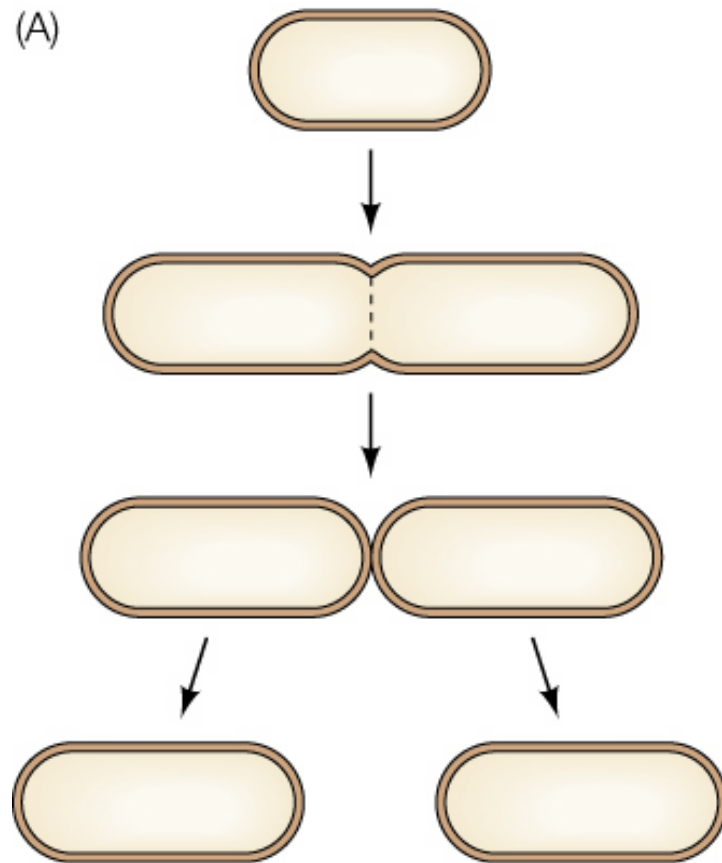


spirocheta

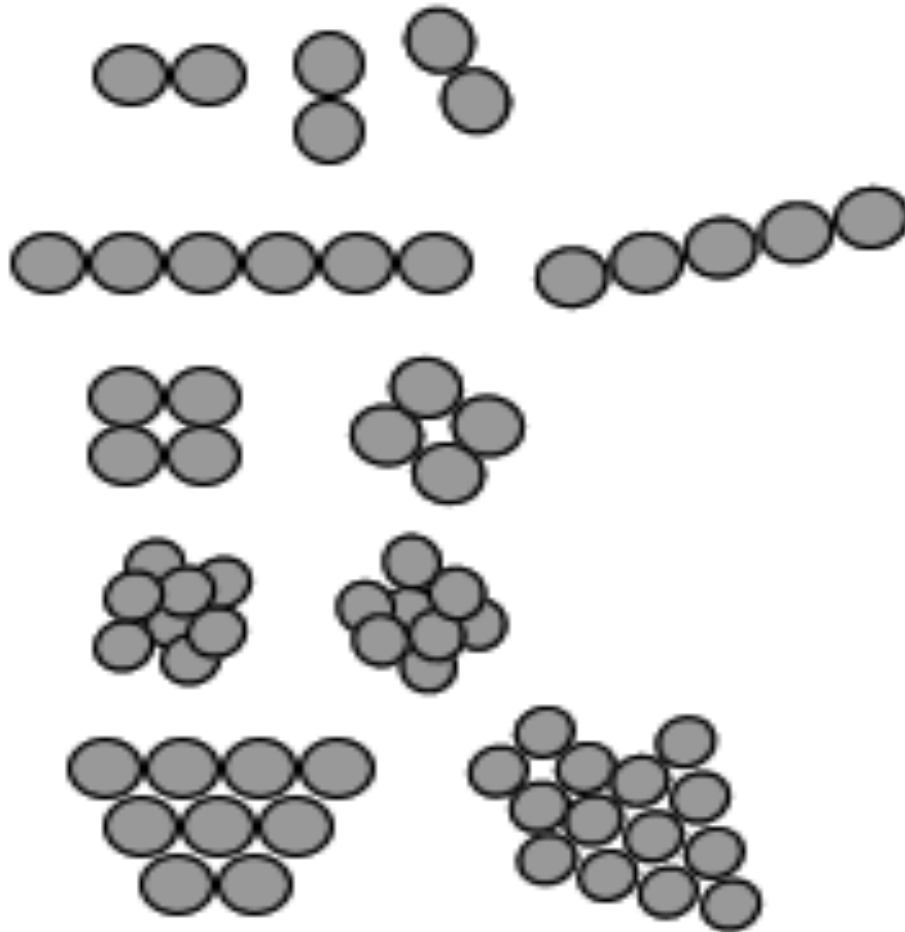
---



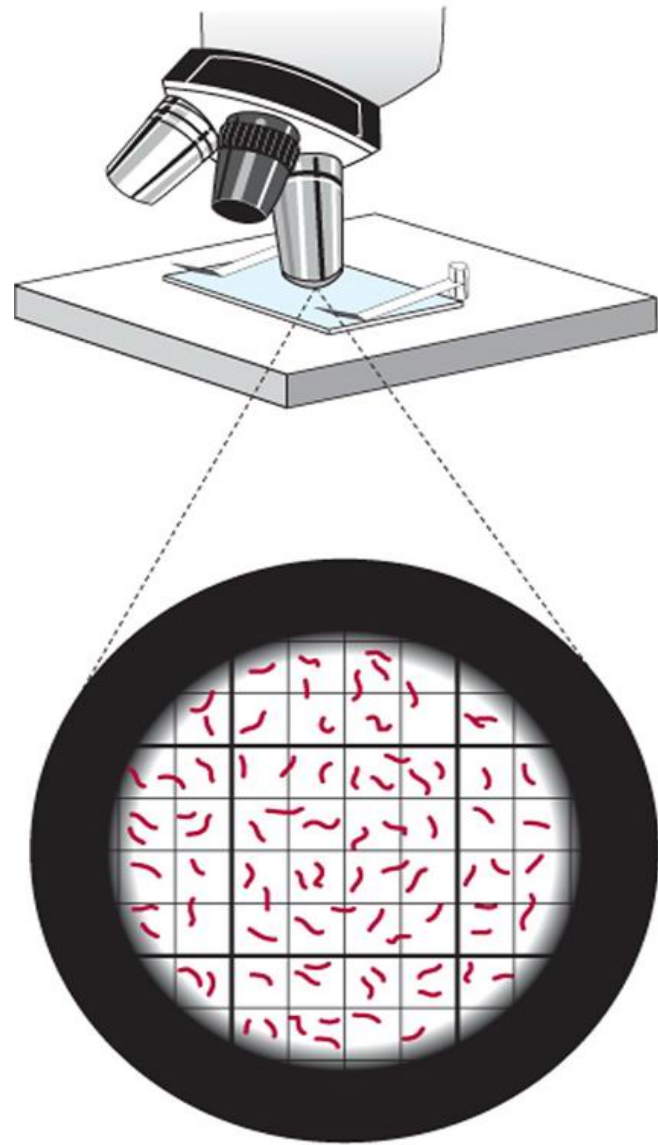
# Batteri al microscopio



# Aggregazione delle cellule batteriche: cocchi



# La conta al microscopio



# **Valutazione della carica microbica ambientale**

**Aria**  
**Superfici**  
**Tessuti**  
**operatori**

# Contaminazione microbica aeroportata

## Scelta dei punti di campionamento

### *Ambienti industriali e artigianali*

- ◆ campionamento a centro-ambiente  
tenendo presente l'ubicazione di porte e finestre e flussi d'aria
- ◆ per ambienti di superficie  $> 30 \text{ m}^2$   
effettuare due prelievi lungo la diagonale  
o 4 prelievi agli angoli

# Monitoraggio della contaminazione aeroportata

- ✓ Campionamento passivo
- ✓ Campionamento attivo

**aspirazione di un volume noto di aria  
in un determinato intervallo di tempo**

*SURFACE AIR SYSTEM (sas)*

# Monitoraggio della contaminazione aeroportata

- *Muffe e Lieviti*
- *Schizomiceti aerobi totali*
- *Batteri sporigeni*  
(*Bacillus, Clostridium*)
- *Legionella pneumophila*

# Campionamento delle superfici

## *criteri di base*

Monitorare:

- ✓ in parallelo più superfici adibite alle stesse funzioni
- ✓ superfici simili sottoposte a diverso trattamento di sanificazione
- ✓ superfici a monte e a valle di un processo produttivo
- ✓ con controlli periodici le stesse superfici per rilevare eventi accidentali o anomali



# Monitoraggio della contaminazione delle superfici

Analisi di verifica della efficacia delle operazioni di sanificazione:

- ✓ **Batteri aerobi totali**
- ✓ **Muffe e lieviti**
- ✓ **Enterobatteri ed *E.coli***
- ✓ **Stafilococchi coagulasi+**
- ✓ ***Listeria monocytogenes***
- ✓ **patogeni ed alterativi specifici**

## limiti proposti per il settore alimentare \*

Carica batterica totale	<50	UFC/cm <sup>2</sup>	Buono
	50-10 <sup>4</sup>		Accettabile
	> 10 <sup>4</sup>		insufficiente
<i>E.coli</i>	< 1	UFC/cm <sup>2</sup>	Buono
	> 1	UFC/cm <sup>2</sup>	insufficiente
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1	UFC/cm <sup>2</sup>	Buono
	> 1	UFC/cm <sup>2</sup>	insufficiente
Patogeni	Presenza/assenza		assenti

\* Maifreni M: *Metodi e strumenti per il controllo microbiologico delle superfici nel settore alimentare*. Igiene Alimenti . N.12/2010 – Ed. Moedco.

# limiti proposti per il settore alimentare \*

Microrganismi alterativi	< 1 UFC/cm <sup>2</sup>	eccellente
	2 – 10	buono
	11 –100	insufficiente
	101 -1000 e oltre	fuori controllo

\* Maifreni M.

# limiti proposti per il settore ristorazione \*

Microrganismi alterativi	< 100 UFC/100 cm <sup>2</sup> 100 – 500 > 500	ottimo accettabile insufficiente
Microrganismi patogeni	assenti UFC/100 cm <sup>2</sup>	

\* Maifreni M

# linee guida

*limiti cariche microbiche  
per **aria confinata**  
nel settore alimentare*

**Batteri aerobi totali < 500 UFC/m<sup>3</sup>**

**Muffe e Lieviti < 100 spore/m<sup>3</sup>**

# Monitoraggio della contaminazione umana

*Il monitoraggio* della contaminazione portata dal personale deve essere effettuato su

- ✓ **cute scoperta**

mani, avambracci

- ✓ **vestiario**

camici, grembiuli, cappelli, mascherine, guanti, mezzemaniche, scarpe...

# microrganismi di origine animale e umana

<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus</i> spp	Cute, mucose nasali e orofaringee
<i>Salmonella</i> spp. <i>E.coli</i> <i>Vibrio</i> spp	Intestino
<i>Bacillus, Clostridium</i> spp	Intestino
<i>Streptococcus</i> spp	Prime vie aeree e mucose
<i>Candida</i>	Cute e mucose
Virus	Vie aeree e intestino
Parassiti	Intestino

# Monitoraggio microbiologico delle mani

- ➔ consente la verifica dell'adozione di corrette procedure igieniche da parte del personale, per la prevenzione del rischio di contaminazione
- ! effettuare campionamenti prima e dopo il corretto lavaggio delle mani

*strumento formativo per coinvolgere il personale sull'importanza dell'applicazione delle procedure nei luoghi di lavoro*



# Monitoraggio microbiologico di indumenti di lavoro

- ✓ si esegue con la stessa procedura del monitoraggio della contaminazione di superfici
- ✓ prima di essere esaminato, il tessuto deve essere adagiato su una superficie piana, pulita e disinfettata
- ✓ eseguire il campionamento in almeno tre punti

# Analisi di verifica

principali *marcatori* microbici  
dell'igiene del personale

- ✓ *Salmonella* spp
- ✓ Stafilococchi coagulasi +
- ✓ *E.coli*
- ✓ Coliformi

... devono essere sempre assenti !