



LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE BIOLOGICHE

Insegnamento di Laboratorio di Biochimica e Igiene degli alimenti

Modulo Igiene degli alimenti

Prof.ssa Elisabetta Fea, Dott.ssa Marta Gea

ESERCITAZIONI 2022 – 2023

Analisi microbiologica del latte

CONTENUTI DELLA LEZIONE

- **Analisi Microbiologica del latte**
 - Preparare il terreno di coltura
 - Preparare le diluizioni
 - Seminare il campione
 - Analizzare il risultato ottenuto

- **Esercizi finali**

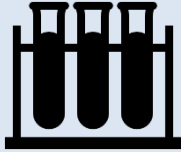


Esercizi



Domande

ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI



ALIMENTO:

- Latte Crudo
- Latte Pastorizzato (72°C x 15 secondi*)
- Latte UHT (135°C x 1 secondo*)

PARAMETRI ANALIZZATI – Conta di:

- Microrganismi Aerobi Mesofili
- Coliformi
- Stafilococchi Coagulasi Positivi

Obiettivo dell'analisi = stimare la concentrazione di microrganismi presenti nell'alimento

*o combinazioni termicamente equivalenti

ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI



FASI:

1. Preparare il terreno di coltura
2. Preparare le diluizioni
3. Seminare il campione
4. Analizzare il risultato ottenuto

ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI



FASI:

1. Preparare il terreno di coltura

2. Preparare le diluizioni

3. Seminare il campione

4. Analizzare il risultato ottenuto

ESERCITAZIONI

ESERCITAZIONI

1. PREPARARE IL TERRENO DI COLTURA



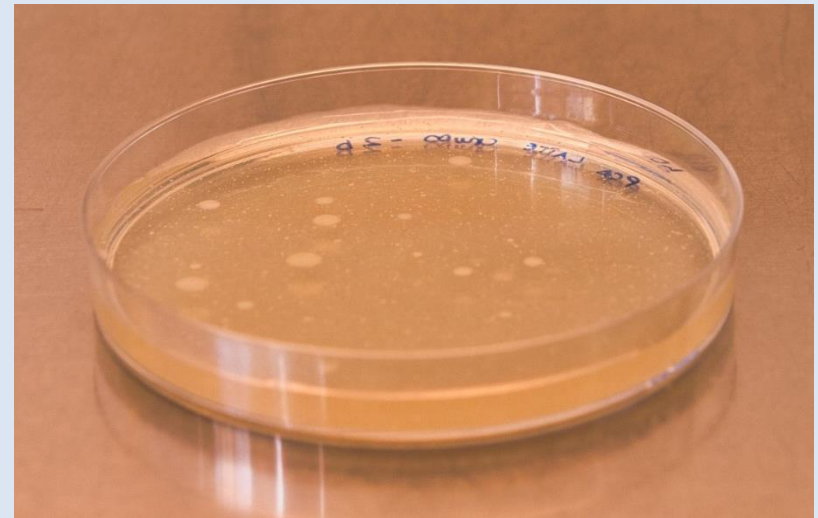
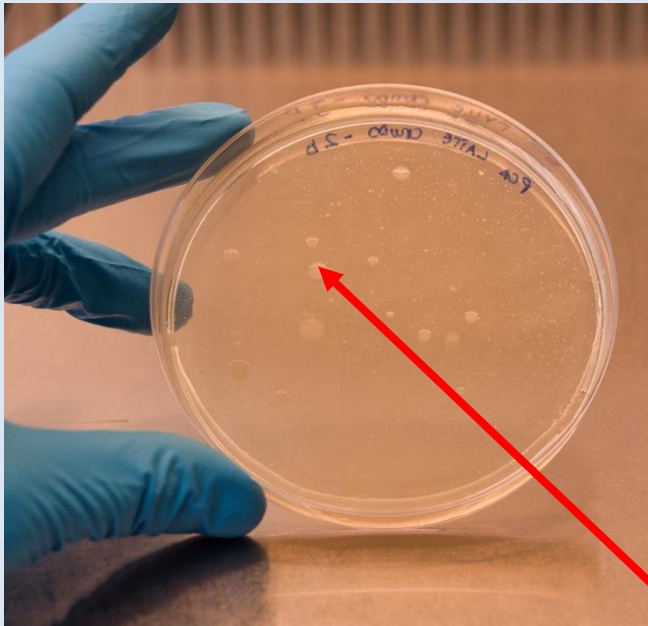
Terreni di coltura:

- Microrganismi Aerobi Mesofili → Plate Count Agar (PCA)
- Coliformi → Violet Red Bile Lactose (VRBL) Agar
- Stafilococchi Coagulasi Positivi → Baird Parker (BP) Agar

1. PREPARARE IL TERRENO DI COLTURA

Plate Count Agar (PCA)

- Utilizzato per la conta di batteri in acqua, acque reflue, alimenti e prodotti lattiero-caseari.
- Terreno ricco di nutrienti.
- Privo di sostanze selettive.
- Consente la crescita della maggior parte dei microrganismi aerobi.



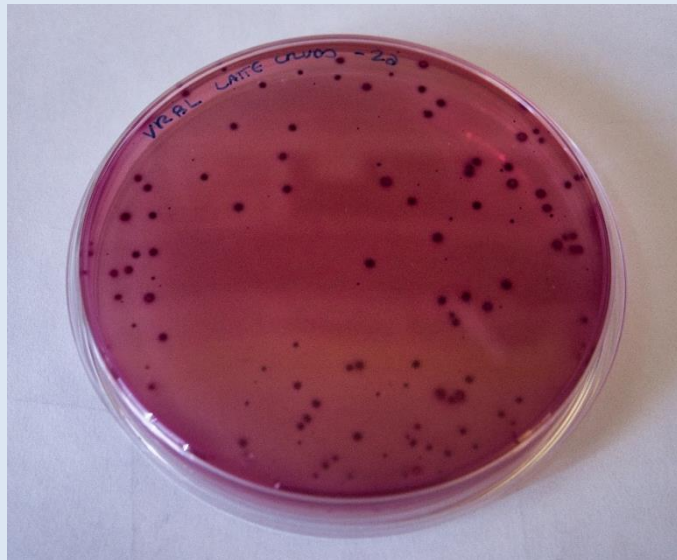
UFC=UNITA' FORMANTI COLONIA

Gruppi di cellule batteriche che crescono su un terreno di coltura solido, ciascuno derivante dalla moltiplicazione di una singola cellula batterica.

1. PREPARARE IL TERRENO DI COLTURA

Violet Red Bile Lactose (VRBL) Agar

- Utilizzato per isolamento e conta di Coliformi da prodotti alimentari quali latte, prodotti caseari ed altri alimenti.
- Lattosio: Coliformi sono lattosio-fermentanti.
- E' un terreno selettivo.
- Sali biliari e cristal violetto: agenti selettivi, inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi.
- Rosso neutro: formazione di colonie rosso-viola (lattosio fermentanti).



1. PREPARARE IL TERRENO DI COLTURA

Baird Parker (BP) Agar:

- Utilizzato per la conta degli Stafilococchi Coagulasi Positivi nei prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione animale ed in altri campioni.
- È un terreno selettivo: litio cloruro e potassio tellurito sono inibenti per la crescita di altri microrganismi.
- Glicina e sodio piruvato facilitano lo sviluppo degli Stafilococchi.
- È addizionato con il supplemento Egg Yolk (tuorlo d'uovo).
- La riduzione del tellurito a tellurio (nero) e la chiarificazione del tuorlo d'uovo permettono l'identificazione delle colonie.
- Gli Stafilococchi Coagulasi Positivi formano colonie nere o grigie circondate da un alone.

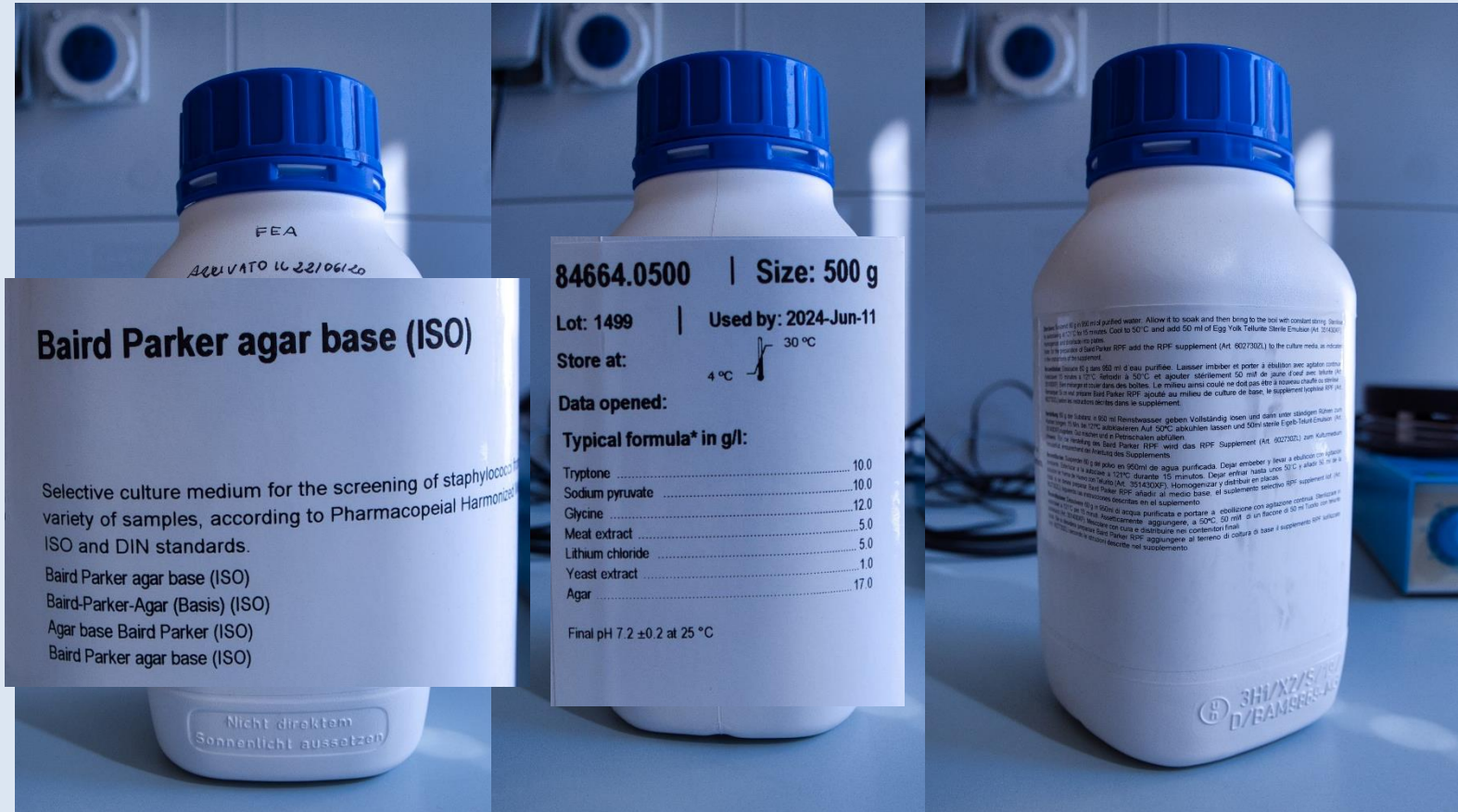
Alone



1. PREPARARE IL TERRENO DI COLTURA

Come preparare il terreno di coltura

Consultare le informazioni riportate in Etichetta



Tipo di terreno

Composizione
e scadenza

Modalità di
preparazione

1. PREPARARE IL TERRENO DI COLTURA

Come preparare il terreno di coltura

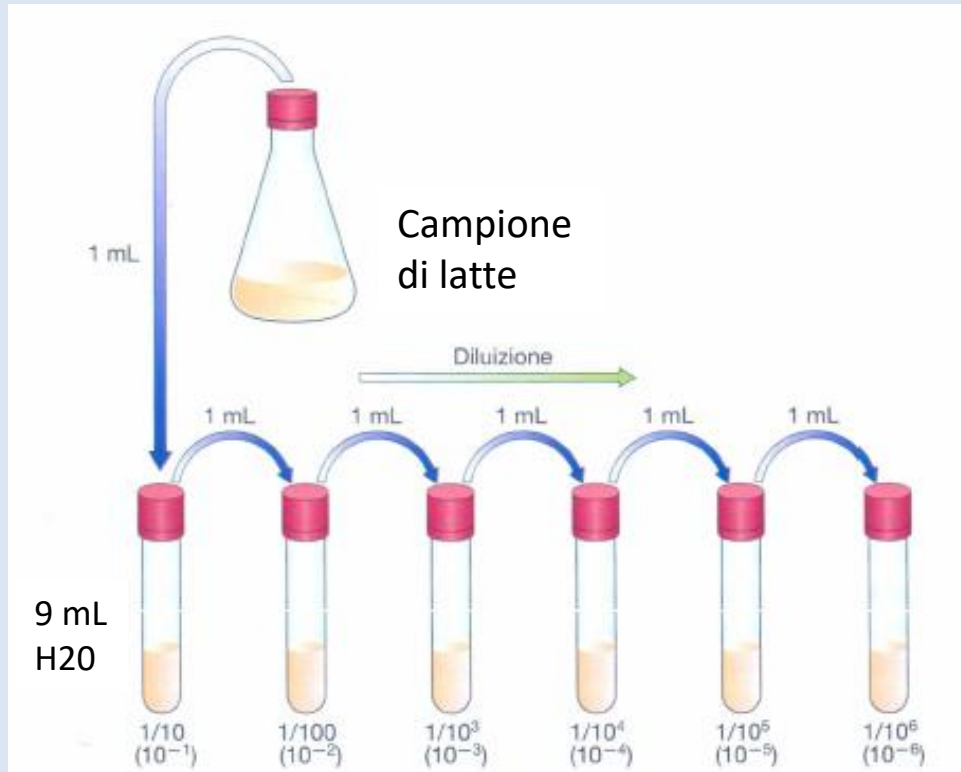
- Pesare il quantitativo di terreno in polvere necessario
- Trasferirlo in una bottiglia di vetro
- Aggiungere un'ancoretta magnetica
- Aggiungere il quantitativo di acqua deionizzata necessaria
- Sciogliere il terreno mettendolo in agitazione su una piastra magnetica
- Sterilizzare il terreno in autoclave (PCA, BP) o portare ad ebollizione (VRBL)
- Equilibrare la temperatura del terreno a 50 °C (bagnetto termostatico)
- Aggiungere eventuali supplementi termolabili (es. Egg Yolk nel BP)



2. PREPARARE LE DILUIZIONI

Preparare le diluizioni seriali del campione da analizzare (il latte).

Obiettivo: **diluire il campione in modo che su qualche piastra cresca un numero di Unità Formanti Colonia che è possibile contare (30 - 300 UFC/piastra).**



- Preparare delle provette sterili contenenti 9 mL di diluente (acqua deionizzata sterile)
- Prelevare 1 mL di campione e aggiungerlo alla prima provetta 10⁻¹
- Mescolare
- Prelevare 1 mL dalla provetta 10⁻¹ e aggiungerlo alla seconda provetta 10⁻²
- Mescolare
- E così di seguito....

Cambiare il puntale se si passa da un campione più concentrato a uno meno concentrato.

2. PREPARARE LE DILUIZIONI

	LATTE CRUDO	LATTE PASTORIZZATO	LATTE UHT
Microrganismi Aerobi Mesofili	6 (Tq, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5})	3 (Tq, 10^{-1} , 10^{-2})	3 (Tq, 10^{-1} , 10^{-2})
Coliformi	5 (Tq, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})	2 (Tq, 10^{-1})	2 (Tq, 10^{-1})
Stafilococchi Coagulasi Positivi	4 (Tq, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})	2 (Tq, 10^{-1})	2 (Tq, 10^{-1})



Tq= Tal quale, viene seminato il campione
puro (latte)

2. PREPARARE LE DILUIZIONI

	Carica (Conta) Batterica Totale (CBT) o Microrganismi Aerobi Mesofili	Enterobatteri o Escherichia coli o Coliformi	Stafilococchi coagulasi positivi
latte crudo	100.000 ufc/ml	10.000 ufc/ml	100 ufc/ml
latte pastorizzato	< 100 ufc/ml	≤ 10 ufc/ml	assenti
latte UHT	< 110 ufc/ml	assenti	assenti

in grassetto i riferimenti legislativi derivati Reg. CE 2073/2005 e s.m.i. Regione Piemonte aggiornati al 2016

	Carica (Conta) Batterica Totale (CBT) o Microrganismi Aerobi Mesofili	Enterobatteri o Escherichia coli o Coliformi	Stafilococchi coagulasi positivi
latte crudo	100.000 ufc/ml 6 (Tq, 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵)	10.000 ufc/ml 5 (Tq, 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴)	100 ufc/ml 4 (Tq, 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³)
latte pastorizzato	< 100 ufc/ml 3 (Tq, 10 ⁻¹ , 10 ⁻²)	≤ 10 ufc/ml 2 (Tq, 10 ⁻¹)	assenti 2 (Tq, 10 ⁻¹)
latte UHT	< 110 ufc/ml 3 (Tq, 10 ⁻¹ , 10 ⁻²)	assenti 2 (Tq, 10 ⁻¹)	assenti 2 (Tq, 10 ⁻¹)

3. SEMINARE IL CAMPIONE

Tecniche di semina

Inclusione

Spatolamento

1. Pipettare il campione in una piastra sterile

2. Aggiungere al campione il terreno di coltura liquido

3. Miscelare e lasciare solidificare il terreno

4. Incubare le piastre (le colonie crescono all'interno del terreno di coltura e sulla superficie)



1.0 or 0.1 ml

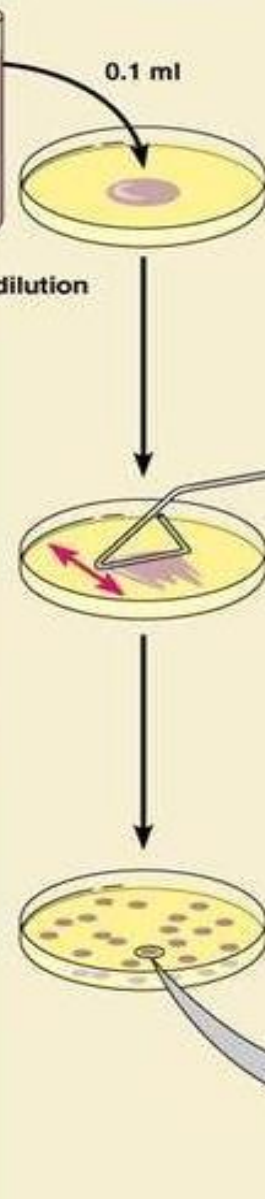
0.1 ml

Bacterial dilution

1. Pipettare il campione in una piastra sterile contenente terreno di coltura solido

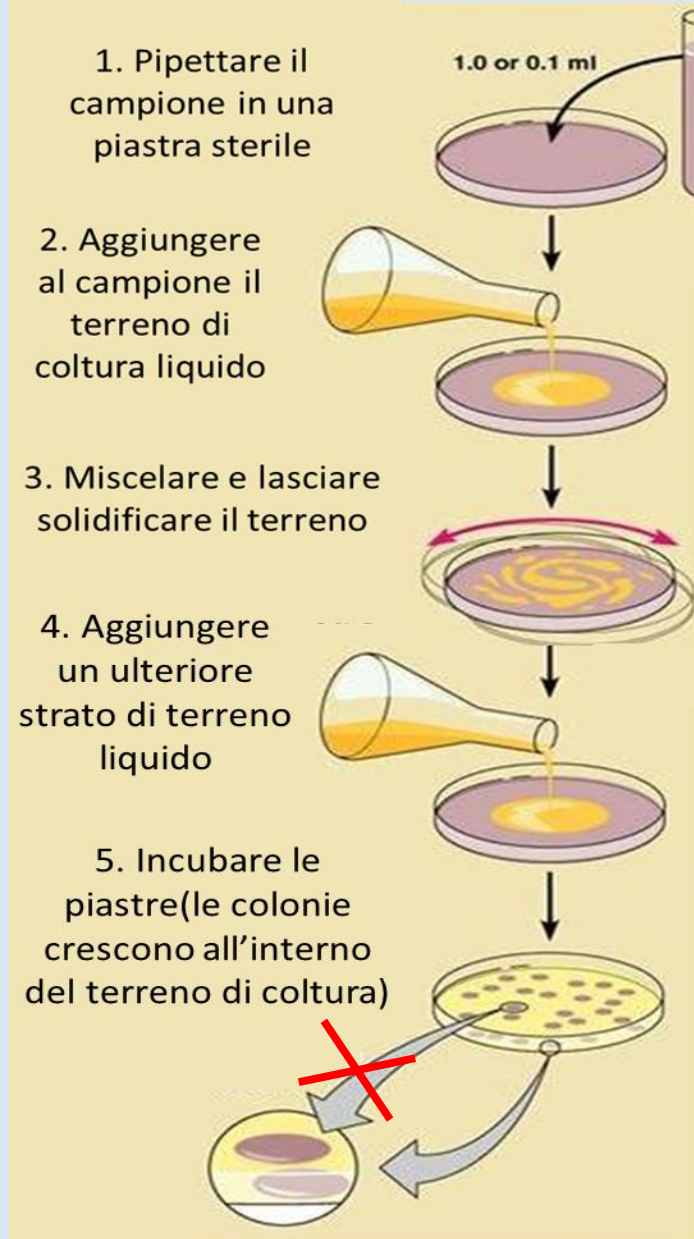
2. Distribuire il campione sulla superficie con una spatola

3. Incubare le piastre (le colonie crescono sulla superficie del terreno di coltura)



3. SEMINARE IL CAMPIONE

Tecniche di semina: Inclusione in doppio strato

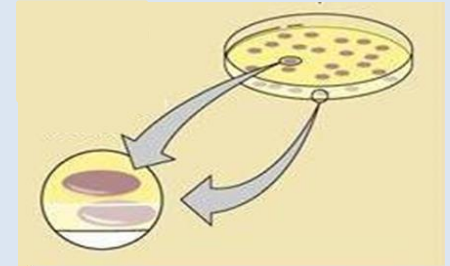


L'inclusione in doppio strato viene effettuata per favorire la crescita di microrganismi anaerobi facoltativi.

3. SEMINARE IL CAMPIONE

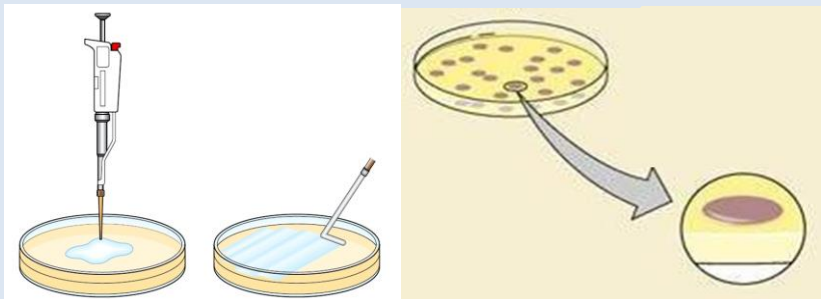
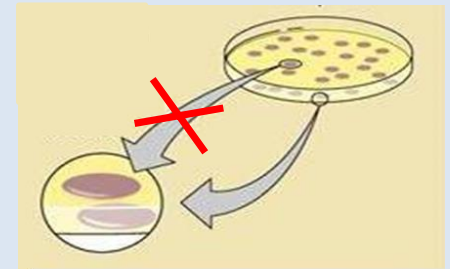
Metodo/tecnica:

- Microrganismi Aerobi Mesofili →
Inclusione/incorporamento (1 mL di campione/piastra)



- Coliformi → Inclusione/incorporamento in doppio strato (1 mL di campione/piastra)

Per favorire la crescita dei m.o. **anaerobi facoltativi**



- Stafilococchi Coagulasi Positivi →
Spatolamento (0,1 mL di campione/piastra)

3. SEMINARE IL CAMPIONE



Le piastre vengono incubate capovolte:

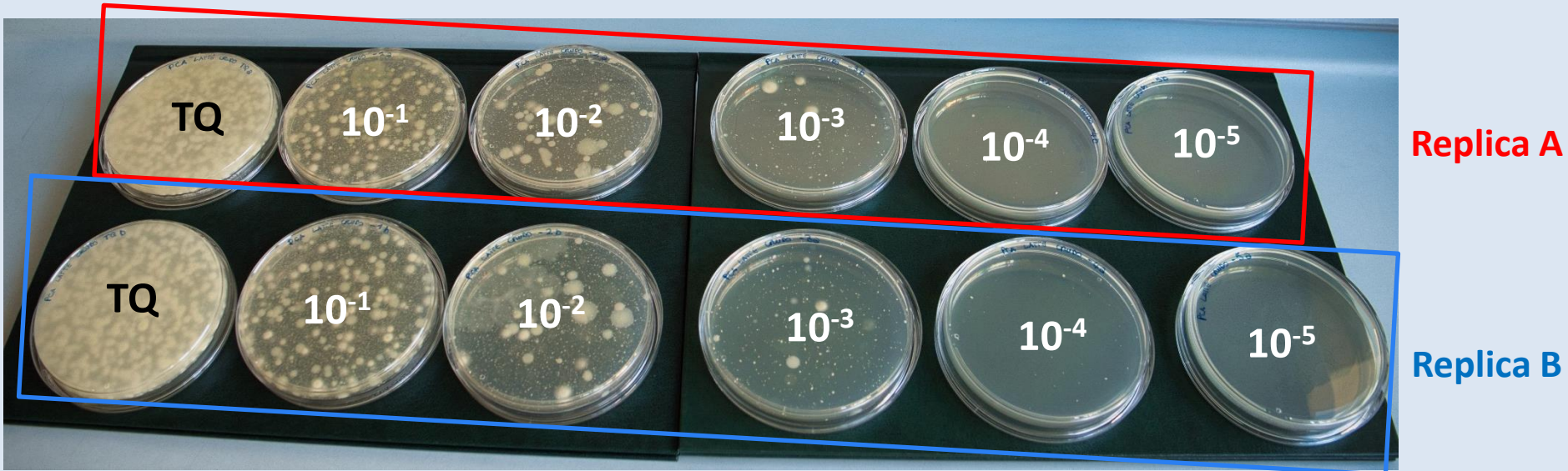
- Microrganismi Aerobi Mesofili → a 30°C per 24/48/72 h
- Coliformi → a 37°C per 24/48 h
- Stafilococchi Coagulasi Positivi → a 37°C per 24/48 h

3. ANALIZZARE IL RISULTATO OTTENUTO

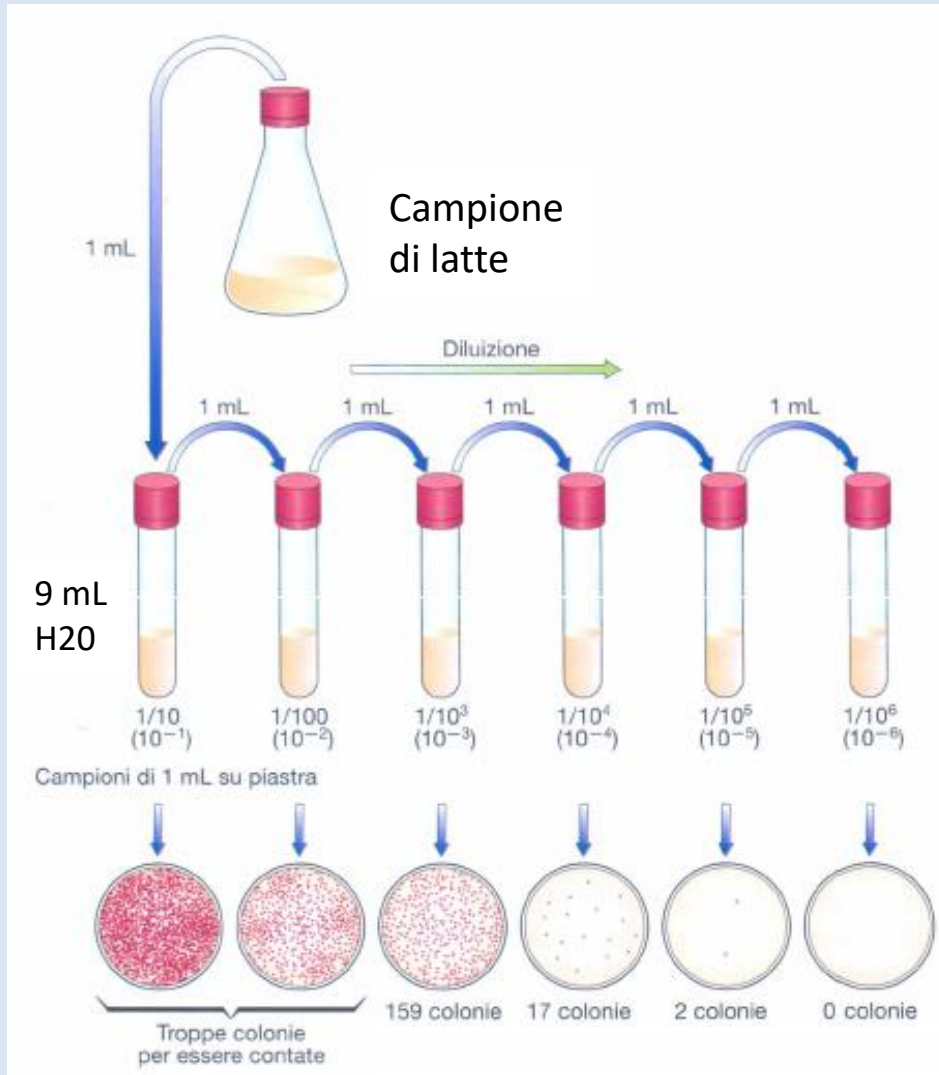
*Riferimenti legislativi

PCA – Microrganismi Aerobi Mesofili
Latte crudo

100.000 ufc/ml*



3. ANALIZZARE IL RISULTATO OTTENUTO



Al termine dell'incubazione:

➤ Conteggio delle Unità Formanti Colonia (UFC).

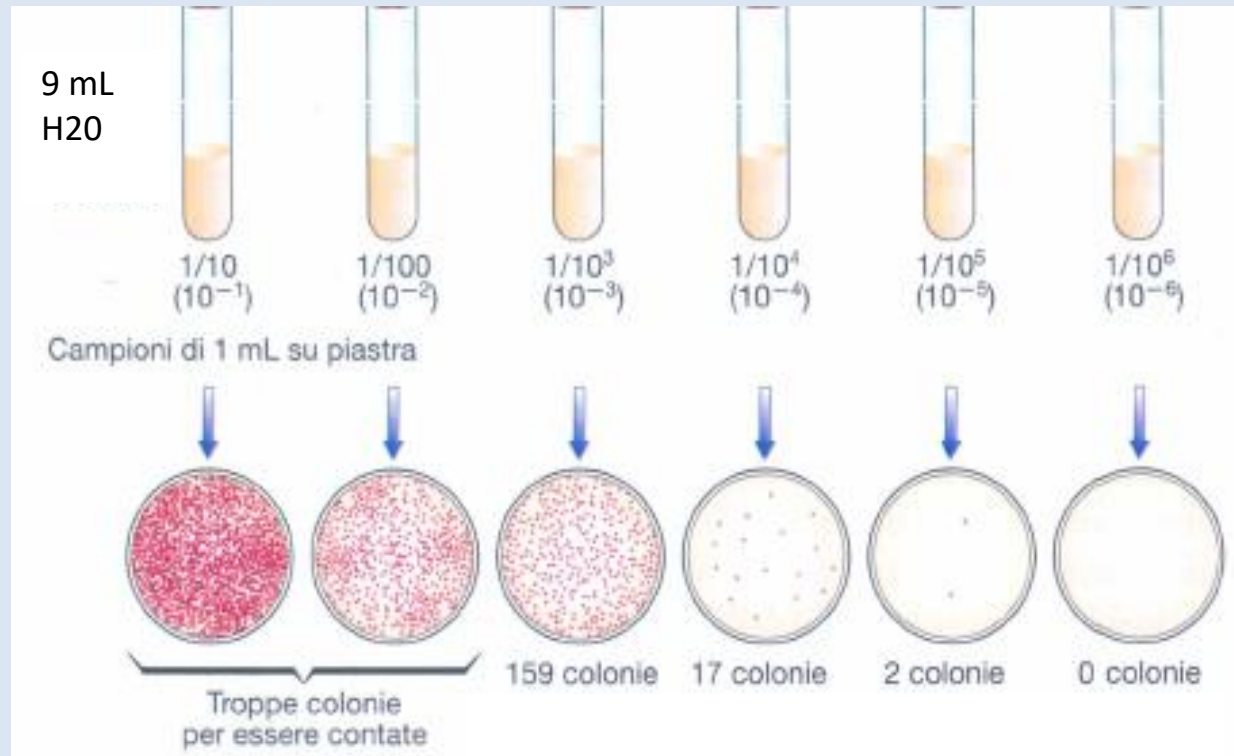
UFC=Gruppi di cellule batteriche che crescono su un terreno di coltura solido, ciascuno derivante dalla moltiplicazione di una singola cellula batterica.

➤ Espressione del risultato come UFC/mL, tenendo conto del fattore di diluzione applicato (TQ, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ o 10⁻⁵) e del quantitativo di campione posto in ogni piastra (1 mL o 0,1 mL).

➤ Considerate soltanto le piastre che contengono da 30 a 300 UFC.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} UFC}{\text{fattore di diluizione} \times \text{volume piastrato in mL}}$$

3. ANALIZZARE IL RISULTATO OTTENUTO



- Quale/quali piastre utilizzereste per stimare il numero di UFC/mL?
- Quante UFC/mL stimate nel campione?

ESERCIZIO



Sulla piastra A è stato seminato 0,1 mL di latte crudo diluito 1/1000 (diluizione 10^{-3}). Al termine dell'incubazione, su questa piastra sono state contate 50 unità formanti colonia. Calcolare la concentrazione di microrganismi presenti nel campione di latte crudo esprimendola in UFC/mL