

LA COLTIVAZIONE DEI BATTERI

I TERRENI DI COLTURA

La coltivazione dei batteri in laboratorio richiede l'impiego dei cosiddetti "terreni" o "mezzi di coltura", con i quali si cerca di riprodurre artificialmente un ambiente in grado di soddisfare le esigenze metaboliche del microrganismo che si desidera coltivare. Il terreno, prima della semina, deve essere sterile e contenuto in recipienti sterili dotati di un sistema di chiusura che garantisca la sterilità del contenuto. Tutte le operazioni relative alla semina devono essere condotte osservando precauzioni necessarie a evitare la contaminazione del terreno ad opera dei batteri presenti nell'ambiente.

Gli impieghi dei terreni di coltura sono numerosi:

-) conteggio dei microrganismi che contaminano alimenti e superfici;
-) isolamento dei microrganismi;
-) mantenimento in coltura;
-) identificazione e studio delle caratteristiche biochimiche;
-) coltivazione per la produzione di antibiotici, enzimi, tossine, antisieri, vaccini, colture starter;
-) valutazione dell'attività di preparati farmacologicamente attivi (per es.: antibiotici; ricerca sostanze inibenti).

Componenti dei terreni di coltura

I componenti dei terreni di coltura devono soddisfare le esigenze nutritive dei microrganismi che per moltiplicarsi hanno bisogno di fonti di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, sodio, magnesio, fosforo, zolfo, potassio, manganese, ferro. I componenti dei terreni di coltura sono suddivisibili nelle seguenti classi: peptoni, carboidrati, indicatori, sali minerali, agenti selettivi, agenti solidificanti, ingredienti aggiuntivi¹. La composizione chimica dei terreni di coltura è differente in relazione alle necessità nutrizionali della specie che si desidera coltivare. Per la maggior parte dei batteri è possibile allestire terreni di coltura sintetici, di composizione definita, nei quali sono presenti, in quantità ben definite, le singole sostanze di cui necessita il germe in

¹Vengono anche chiamati "arricchimenti" traducendo dall'inglese la parola "enrichment", tuttavia questo termine potrebbe venire confuso con "terreno di arricchimento" che è invece un terreno estremamente povero di sostanze nutritive.

esame. Tuttavia, nella routine diagnostica si ricorre a terreni complessi contenenti sostanze naturali chimicamente non ben definite (peptoni, siero, sangue, estratto di lievito). Questi terreni derivano dai tradizionali "brodi" e hanno il vantaggio di essere economici e di garantire una maggiore rispondenza alle esigenze dei batteri patogeni nel corso del loro isolamento.

Peptoni

Le fonti di azoto possono derivare da alimenti quali latte, uova, infusi di carne, patate, pomodori, anche se oramai vi è una enorme disponibilità di prodotti industriali altamente affidabili e che garantiscono un'elevata riproducibilità delle loro caratteristiche fondamentali. Si tratta di idrolizzati di proteine di origine biologica detti **peptoni**. I materiali di base per la loro produzione sono la carne, la caseina, la soia, le cellule di lievito, la gelatina. I peptoni sono costituiti da amminoacidi liberi e polimerizzati in catene di lunghezza variabile in rapporto al tipo di idrolisi subita. Comunemente vengono impiegati due tipi di idrolisi: l'**idrolisi enzimatica** (con enzimi quali la tripsina, la pepsina ed enzimi estratti dalla papaia) e l'**idrolisi acida** (con acidi inorganici forti quali l'acido cloridrico e l'acido solforico). Con l'idrolisi enzimatica è possibile agire in punti precisi della proteina e preservare l'integrità degli amminoacidi e delle vitamine presenti nel materiale di partenza; con l'idrolisi acida vengono rotti tutti i legami peptidici e si producono amminoacidi liberi.

Simili ai peptoni sono gli infusi e gli estratti di carne ottenuti per coagulazione delle proteine con il calore.

Carboidrati

Gli zuccheri costituiscono un elemento nutritivo fondamentale. Sono fonte di carbonio e vengono utilizzati anche come substrati fermentabili per la differenziazione dei microrganismi. I più utilizzati sono il **glucosio**, il **lattosio**, il **mannitolo** e il **saccarosio**.

Indicatori

In microbiologia ve ne sono fondamentalmente tre tipi: indicatori di pH, di ossidoriduzione e di idrogeno solforato.

Tra gli **indicatori di pH** vanno ricordati il rosso fenolo, il rosso neutro, il blu di bromotimolo e il porpora di bromocresolo (c.d. bromocresol-porpora). Il tornasole e l'indicatore di Andrade sono in disuso, ma in certe formulazioni sono ancora presenti. Gli indicatori di pH hanno

lo scopo di evidenziare la formazione di acidi a partire dai carboidrati e la formazione di basi (ioni ammonio) a partire da peptoni, singoli amminoacidi o ammine. Tra questi, il **rosso fenolo** è il più sensibile in quanto reagisce anche a minime variazioni di pH nel terreno. Il **rosso neutro** trova impiego nei terreni per l'evidenziazione degli enterobatteri (per es.: terreno di Mac Conkey).

Gli **indicatori di ossidoriduzione** più utilizzati sono il **blu di metilene** (da incolore a blu, se ossidato) e la **resazzurrina** (da incolore a rosa, se ossidata).

Gli **indicatori di H₂S**, sono costituiti da sali di ferro (citrato ferrico, solfato ferroso, ferro ammonio solfato, ferro ammonio citrato). L'idrogeno solforato, prodotto dai batteri a partire da sodio tiosolfato, reagisce con i sali di ferro dando luogo a ferro solfuro nero. Questa reazione è sfruttata sia nei terreni di coltura solidi (caratteristiche colonie con parte centrale nera), che in quelli liquidi ponendo cartine imbevute di acetato di piombo all'estremità delle provette (l'acetato di piombo viene trasformato dall'idrogeno solforato in solfuro di piombo, nero).

Sali

Hanno tre funzioni fondamentali: fornire i metalli necessari alla crescita microbica (Mg, Mn, Fe, Ca, Zn, Cu), fornire un'azione tampone al terreno (KH₂PO₄ e K₂HPO₄) e mantenere una adeguata osmolarità al mezzo di coltura (con il NaCl).

Agenti selettivi

Gli agenti selettivi consentono l'isolamento di una specie batterica inibendo le altre. I primi agenti selettivi utilizzati in microbiologia sono stati i coloranti, che ancora oggi vengono inseriti in molte preparazioni. I più noti sono il **cristalvioletto** e il **verde brillante**, impiegati in alcuni terreni per enterobatteri. Tra le sostanze di origine biologica vanno ricordati i **sali biliari** che trovano impiego nei terreni per l'isolamento dei patogeni intestinali, avendo la capacità di inibire la crescita dei Gram negativi. Altri agenti selettivi sono gli **antibiotici**, che permettono di selezionare in maniera mirata le specie microbiche da isolare. Infine, i **sali organici e inorganici**: tra gli altri vanno citati il cloruro di sodio (che ad alte concentrazioni inibisce sia la flora Gram negativa che quella Gram positiva, eccezion fatta per gli stafilococchi), la sodio azide (che consente l'isolamento selettivo di streptococchi e di enterococchi), il

La coltivazione dei batteri

I terreni di coltura 4

sodio selenito, il sodio citrato, il sodio tellurito e il trifenil tetrazolio cloruro.

E4

Agenti solidificanti

L'**agar-agar** è l'ingrediente fondamentale per la preparazione della quasi totalità dei terreni solidi. Fu introdotto alla fine del 1800 da un medico tedesco (Walther Hesse) e il suo utilizzo venne poi perfezionato da Robert Koch. È una sostanza estratta dalle alghe rosse del genere *Gelidium*, frequenti nei mari tropicali, e ha una struttura polisaccaridica contenente agarosio (70%) e agaropectina (30%). L'agar disciolto a caldo (temperature superiori a 80°C) in un liquido, nella proporzione dell'1-2%, ne provoca la gelificazione durante il raffreddamento.

Liquido + agar →	agar solubilizzato →	gel
	80°C-45°C	<45°C

L'agar solubilizzato ha la caratteristica di fondere a 100°C e, raffreddandosi, di solidificare (quando la temperatura è inferiore a 45°C). Allo stato solido forma una massa gelatinosa polimerizzata che non viene utilizzata dai batteri a scopo nutritivo. L'agar non è tossico per i batteri e solo pochissimi possiedono enzimi (esoenzimi) in grado di attaccarlo (depolimerizzarlo), liquefacendo il terreno. La superficie di un terreno gelificato con l'1-2% di agar è sufficientemente solida da consentire di operarvi agevolmente, e con umidità tale da consentire la crescita dei batteri ma da non permetterne il movimento (nel caso di batteri provvisti di flagelli, anche se certi germi, quali *Proteus spp.*, riescono a migrare anche in agar all'1-2%). Vi sono alcuni terreni per la valutazione della mobilità che contengono minori concentrazioni di agar (0,2-0,5%). Il reticolo tridimensionale del gel lascia passare le macromolecole ma, in genere, non permette che batteri seminati in superficie riescano ad approfondarsi tra le maglie. La caratteristica dell'agar di rimanere liquido (o meglio "la caratteristica del liquido in cui l'agar è disciolto di non trasformarsi in gel") fino a temperature di 45°C e quella dei batteri di sopportare brevi esposizioni a queste temperature (45-50°C) è alla base di un metodo di semina cosiddetto "agar batteri" (detto anche "semina per inclusione" o "per incorporazione" o "per dispersione"). Si tratta di disperdere i batteri nel terreno ancora liquido. In conseguenza della gelificazione che accompagna il raffreddamento, i singoli batteri restano inglobati nelle maglie del gel dove possono moltiplicarsi senza possibilità di diffusione. Questo tipo di

La coltivazione dei
batteri

I terreni di coltura 5

coltura è utilizzato per l'enumerazione dei batteri presenti negli alimenti.

E5

Ingredienti aggiuntivi

Per migliorare le caratteristiche di fertilità dei terreni di coltura e per la coltivazione di microrganismi esigenti si aggiungono, dopo sterilizzazione in autoclave e raffreddamento a 45-50°C, diversi ingredienti. Il sangue e il siero sono quelli più comunemente impiegati, ma in rapporto al tipo di ricerca da eseguire si ricorre anche all'emoglobina, all'albumina, al rosso d'uovo e a uova intere.

Classificazione dei terreni di coltura

E6

In rapporto allo stato fisico

I terreni di coltura si distinguono in liquidi e solidi, differenziandosi esclusivamente per lo stato fisico.

Terreni liquidi- Il più diffuso era il brodo di carne. Si tratta di un terreno utile per la pratica corrente in quanto consente lo sviluppo di quasi tutti i batteri, la sua composizione esatta non è nota, né ripetibile (oggi è sostituito dai vari brodi nutritivi a formulazione nota). Anche il latte e l'acqua peptonata sono utili in certe occasioni (diluizioni, prearricchimento, crescita di batteri lattici).

Terreni solidi- I più antichi sono il siero di sangue coagulato e la patata (patata glicerinata per i micobatteri). Oggi si ricorre all'aggiunta dell'agar. I terreni solidi sono indispensabili per l'isolamento di colture batteriche pure.

In rapporto alla costituzione chimica

Terreni minimi: servono alla coltivazione di stipiti auxotrofi per determinate sostanze. Si tratta di terreni in cui il fattore limitante la crescita batterica è aggiunto in quantità minime. (Es. Minimal Glucose Medium per gli stipiti auxotrofi per l'istidina del "Test di Ames").

Terreni comuni o normali: servono alla coltivazione di batteri senza particolari esigenze nutritive (Es. "brodo normale", o "brodo semplice"; "brodo normale solidificato con agar" o "agar semplice"). Di uso comune sono il "brodo nutritivo" e l'"agar nutritivo". Contengono peptoni, (0,5%); estratto di carne, NaCl e tampone fosfato (pH \approx 7,0).

Terreni sintetici: la costituzione è nota in quanto i singoli costituenti (organici e inorganici) sono stati aggiunti nelle quantità volute. Si utilizzano quando si conoscono tutti i fattori di crescita del germe in esame. Si possono quindi allestire dei terreni che contengono soltanto le sostanze di cui il germe necessita.

Terreni complessi: si tratta di terreni ricchi di substrati organici (i c.d. terreni animalizzati) nei quali non tutti i costituenti o le loro quantità sono noti. Estratti di carne, di organo (brodo fegato per anaerobi), succhi di embrione, siero di sangue sono fra i componenti più frequenti.

In rapporto alla funzione

Terreni comuni: vedi sopra.

Terreni selettivi:

Terreni di arricchimento: terreni poveri che consentendo la sopravvivenza ai germi di una sola specie, di fatto ne *arricchiscono* la popolazione a scapito di altre.

Terreni differenziali: in questi terreni la presenza di particolari indicatori consente di riconoscere le singole specie batteriche dalle caratteristiche macroscopiche delle colonie.

E7

Prima parte - LUNEDI

Anno accademico

Data

E8**LA COLTIVAZIONE DEI BATTERI****LA PREPARAZIONE DEI TERRENI DI CULTURA.**

Le fasi della preparazione dei terreni di coltura prevedono la scelta dei componenti e la loro solubilizzazione, sterilizzazione e conservazione. Generalmente si impiegano terreni di coltura disidratati che già contengono i singoli ingredienti nelle proporzioni desiderate, altre volte si ricorre alla pesatura dei singoli ingredienti. Nel caso dei terreni commerciali, sull'etichetta di ogni confezione sono riportate, tra le altre, le seguenti importanti informazioni: a) ingredienti, b) data di scadenza, c) numero del lotto (fondamentale per la riproducibilità delle caratteristiche), d) modalità di preparazione.

*Pesatura delle polveri e dissoluzione***Necessario:**

Spatole e cucchiari da laboratorio
Bilancia con approssimazione a 0,01 grammi
Beute (da 100, 200, 500, 1000, 2000 millilitri)
Palloni tarati
Becher² (da 25, 50, 100, 200, 500 millilitri)
Carta per pesatura
Agitatore riscaldabile con barrette magnetiche
Sistema per ebollizione a bagnomaria
Flaconi (da 100, 200, 500 millilitri)
Cotone idrofobo, tappi, fogli di alluminio
Provette
Piastre Petri

- 1) Pesare accuratamente in una beuta la quantità desiderata. Va posta particolare attenzione a maneggiare con cura le confezioni e le spatole: molti terreni disidratati contengono polveri finissime (quasi impalpabili) che possono essere inalate con facilità (in alcuni laboratori è fatto obbligo ai tecnici di indossare mascherine protettive).
- 2) Aggiungere un volume di acqua distillata pari alla metà della quantità richiesta.
- 3) Agitare fino a completa dissoluzione degli ingredienti e portare a volume avendo cura di non lasciare tracce di terreno non disciolto sulle pareti della beuta.

² si può trovare scritto anche *beaker* (inglese), *becker* o *beker*, ma il termine riportato nei vocabolari di italiano è *becher* (dal tedesco: bicchiere).

4) Trasferire in bottiglie o in provette con tappi di cotone idrofobo, di metallo o a vite (allentati di mezzo giro) e sterilizzare. **E9**

Sia per la reidratazione del terreno che per la sua sterilizzazione vanno usati contenitori di volume doppio rispetto a quello della soluzione. I componenti dei terreni liquidi sono solubili in acqua a temperatura ambiente, mentre quelli contenenti agar devono essere portati all'ebollizione per permetterne una completa solubilizzazione (indicata dalla perfetta trasparenza). Per limitare la denaturazione dei componenti il terreno va posto in agitazione continua o a bagnomaria.

Sterilizzazione dei terreni

In autoclave

I terreni di coltura i cui componenti sopportano temperature superiori a 100°C vanno sterilizzati in autoclave (vapore sotto pressione). La relazione pressione di vapore saturo-temperatura all'interno dell'autoclave è la seguente:

Pressione (atmosfere) ₃	Temperatura (°C)
+0,0	100
+0,5	112
+0,6	115
+1,0	121
+1,5	128
+2,0	134

Per volumi inferiori a un litro il tempo di sterilizzazione (a 121°C) è di 15 minuti. Infatti per una completa sterilizzazione, l'intero volume va esposto per 15 minuti. Per volumi superiori i tempi vanno aumentati, soprattutto per i terreni con agar nei quali il calore penetra più lentamente. È consigliabile sterilizzare i terreni in piccole aliquote e in recipienti mai contenenti più di 1/2 o 1/3 del loro volume.

Per filtrazione

Alcuni terreni di coltura, le soluzioni di zuccheri, di antibiotici e tutte le sostanze termolabili in genere non possono essere sterilizzate in autoclave. Vi sono dei filtri di cellulosa, di vetro compresso e di porcellana che vengono montati su siringhe o su speciali dispositivi di acciaio per la filtrazione sotto vuoto.

³è indicata la differenza di pressione rispetto a quella atmosferica (≈ 1 atm.)

*Distribuzione dei terreni di coltura***E10**

Il principio fondamentale è quello di mantenere sterile il terreno durante tutte le operazioni successive alla sterilizzazione.

Terreni liquidi: possono essere sterilizzati in bottiglie, qualora se ne preveda l'utilizzo in grandi quantità (Es.: terreni di arricchimento), o direttamente in provetta. In questo secondo caso, dopo la sterilizzazione, sono pronti per l'uso.

Terreni solidi: qualora siano stati sterilizzati in bottiglie, al momento dell'utilizzo vanno disciolti (bagnomaria o forno a microonde), eventualmente addizionati dei componenti aggiuntivi e versati in provette o in piastre Petri. Se il terreno non richiede aggiunta di ingredienti termolabili, le provette possono essere riempite prima della sterilizzazione. Le provette vengono poste a solidificare su supporti appositi (in verticale o su piano inclinato, per terreno cosiddetto a "becco di clarino"), le piastre su superfici la cui planarità è stata verificata con una livella

Conservazione dei terreni di coltura

Nel determinare il quantitativo di piastre e provette da approntare, va tenuto conto dei limiti di tempo entro i quali è possibile usare il prodotto. Per i terreni di uso più comune vengono osservate le seguenti indicazioni:

piastre conservate a +4°C	2 settimane
piastre conservate a +4°C in sacchetti di plastica	8-10 settimane
provette con tappo conservate a +4°C	3-4 settimane
provette con tappo conservate a temperatura ambiente	1-2 settimane
flaconi con tappo a vite conservati a +4°C	3-6 mesi

Prima parte - LUNEDI

Anno accademico

Data

E11

CONTEGGIO DEI MICRORGANISMI NEGLI
ALIMENTI

ESAME BATTERIOLOGICO

Campionamento

L'analisi di un piccolo campione prelevato da una massa di grandi dimensioni ha senso soltanto se il campione è rappresentativo di tutta la massa e ne rispecchia quindi la composizione media. Nelle operazioni di prelievo dei campioni occorre quindi attenersi a norme che rispecchino il *probabilismo* del campionamento. Vi sono leggi, decreti e ordinanze ministeriali che stabiliscono le quantità da prelevare e il numero di contenitori di una stessa partita da saggiare (Es.: Legge 30 aprile 1962, numero 283; Ordinanza Ministeriale 11 ottobre 1978 G.U. n. 346 del 13/12/1978; Decreto Ministeriale 21 aprile 1986, G.U. n. 229 del 2/10/1986). Per maggiori dettagli fare riferimento ai capitoli sull'esame batteriologico dei singoli alimenti.

Prelievo

Questo paragrafo fornisce indicazioni generali, valide in laboratorio, sulle modalità di prelievo dell'aliquota da analizzare. Anche in questo caso, per maggiori dettagli, fare riferimento ai capitoli sull'esame batteriologico dei singoli alimenti.

Alimenti liquidi

Necessario:

Pipette,
cilindri graduati,
siringhe.

Il contenitore va agitato per ovviare alla possibile stratificazione dei vari componenti. Dopo *flambage* dell'apertura del contenitore si preleva sterilmente con pipetta sterile la quantità necessaria per l'esecuzione dell'analisi e la si trasferisce in contenitore sterile adeguato. I risultati verranno espressi in UFC (unità formanti colonia) per unità di volume (generalmente il millilitro).

Alimenti solidi

Necessario:

Tamponi, spatole, pinze, forbici.
--

E12

I batteri possono essere ricercati sulla superficie [carica batterica superficiale: risultati espressi in UFC per unità di superficie (generalmente cm²)] o nella profondità [carica batterica profonda: risultati espressi in UFC per unità di peso (generalmente grammi)]. Per la carica batterica superficiale si ricorre all'uso di tamponi sterili, di apparecchi appositi che effettuano il lavaggio della superficie (l'esame viene condotto sul liquido di lavaggio) o al prelievo di una sottile striscia di alimento. Nel caso della carica batterica profonda occorre cauterizzare la superficie e mediante pinza e forbici sterili, prelevare la quantità di alimento necessaria all'analisi e trasferirla in contenitori sterili per l'omogeneizzazione.

Tutte le operazioni suddette vanno condotte in condizioni di sterilità operando nei pressi della fiamma.

Omogeneizzazione

Con mixer

Sul mercato ne esistono numerosi modelli. Il prodotto è omogeneizzato finemente con lame multiple mosse da un motorino elettrico che impone loro un movimento rotativo molto rapido. Maggiore è la velocità, maggiore l'omogeneizzazione.

Con stomacher

Negli ultimi 10-15 anni si è diffuso l'utilizzo di strumenti che consentono l'utilizzo di buste di plastica in luogo dei contenitori di vetro. L'apparecchio è dotato di due pale che, con moto alterno, schiacciano il contenuto della busta contro una parete.

Metodo	Pro	Contro
Mixer	ottima omogeneizzazione, economico, contenitori riutilizzabili	uso poco pratico, il coperchio e il vasetto devono garantire una chiusura ermetica, aumento (anche >5°C) della temperatura del contenuto
<i>Stomacher</i>	praticità d'uso, non c'è aumento della temperatura del contenuto	omogeneizzazione non sufficiente con alimenti di consistenza duro-elastica, scarto di materiale plastico, costo iniziale elevato, costo delle buste di plastica elevato

Diluizione

Poiché gli alimenti contengono enormi quantità di batteri (10^6 - 10^{10} /g o ml) si rende necessaria la diluizione del campione per poter gestire numeri più piccoli (30-300/g o ml).

La natura del diluente è fondamentale. Va scelto un liquido che assicuri una perfetta dispersione batterica e che non ne inibisca lo sviluppo. Lo stesso liquido può essere utilizzato per favorire l'omogeneizzazione di alimenti solidi.

Acqua peptonata (con sistema tampone)

peptoneg	20,0
NaClg	5,0
Na ₂ PO ₄g	9,0
K ₂ PO ₄g	1,5

Allestimento delle diluizioni

Si ipotizzi di voler raggiungere la diluizione 1:10.000.000 (cioè $1:10^7$).

Necessario:

Pipette da ml 1,
Provette da batteriologia o flaconcini con
ml 9 di diluente,
Acqua peptonata con sistema tampone

1. Se il campione non può essere analizzato entro un'ora dall'arrivo al laboratorio, va conservato a 0-5°C.

2. Omogeneizzare 15 grammi di alimento in 135 millilitri di acqua peptonata (diluizione finale 1:10) e lasciare riposare per 15 minuti per rivitalizzare i batteri. Attenzione: tempi superiori comportano la moltiplicazione dei batteri e i risultati non sono più attendibili. In acqua peptonata il tempo di latenza è di circa 1 ora.

3. Trasferire 1 ml dall'omogeneizzatore alla prima provetta della serie; agitare accuratamente. Si è ottenuta una diluizione del materiale iniziale di 1:100. Proseguire fino alla 6^a provetta (diluizione 1:10.000.000).

Semina

Per inclusione

1. Contrassegnare le piastre con matita vetrografica o pennarello per vetro (data, n. del campione, tipo di terreno, diluizione).

2. Trasferire da ciascuna provetta 1 ml del contenuto in ciascuna piastra.

3. Versare in ogni piastra 10-15 ml di terreno allo stato liquido ($\approx 45^{\circ}\text{C}$) e miscelare con movimenti di va e vieni perpendicolari e rotatori.

E14

4. Lasciare solidificare l'agar.

In superficie

1. Trasferire da ciascuna provetta 0,1 ml del contenuto in piastre con terreno solido pronto all'uso.
2. Distribuire uniformemente sulla superficie del terreno con l'ausilio di bacchette di vetro o di plastica ricurve.
3. Lasciare assorbire.

E15

Incubazione

L'ambiente in cui si pone il terreno è fondamentale affinché la coltivazione abbia successo. In particolare i parametri che è possibile variare sono la **temperatura**, la **concentrazione di CO₂**, la **disponibilità di ossigeno** per gli anaerobi e sua eliminazione per gli anaerobi (per es. immettendo azoto inerte).

Le piastre vanno poste a incubare capovolte per evitare che eventuali tracce di condensazione formatesi sotto al coperchio cadano sul terreno.

Seconda parte - MERCOLEDI Anno accademico

Data

CONTEGGIO DEI MICRORGANISMI NEGLI
ALIMENTI

E16

ESAME BATTERIOLOGICO

Lettura dei risultati

Sono considerate le piastre con un numero di colonie compreso tra 30 e 300.

$$M = \frac{n}{V} \cdot F$$

dove: M = numero dei microrganismi/ml
n = numero di colonie cresciute
V = volume inoculato
F = fattore di diluizione

Se vengono utilizzate più piastre per ogni diluizione la formula è la seguente:

$$M = (\sum n/V \cdot F)/x$$

dove: M = numero dei microrganismi/ml
 $\sum n$ = sommatoria del numero di colonie cresciute in tutte le piastre considerate
V = volume inoculato
F = fattore di diluizione
x = numero in cui la stessa cifra (che corrisponde al numero delle piastre seminate per ciascuna diluizione) è ripetuta tante volte quante sono le piastre considerate (Es.: 3 piastre per ciascuna diluizione, 4 diluizioni: il numero è 3333).

Di seguito vengono fornite le indicazioni dei terreni di coltura più comunemente impiegati in *batteriologia degli alimenti*.

Carica microbica totale

E 17

Plate Count Agar Standard (APHA)

AGAR STANDARD PER LA CONTA SU PIASTRE

Codice – Polvere CM463/10525
Comprese CM464/11390

FORMULA

Estratto di lievito	2.5	g/l
Digerito pancreatico di caseina	5	
Glucosio	1	
Agar	15	

pH 7.0

ISTRUZIONI

Polvere: sospendere 23.5 g in 1 litro di acqua distillata. Portare all'ebollizione fino a soluzione completa. Distribuire in flaconi e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Comprese: aggiungere 1 compressa a 10 ml di acqua distillata e lasciar sciogliere per 5 minuti. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

DESCRIZIONE

Il terreno Oxoid CM463 corrisponde allo Standard Methods Agar, descritto negli «Standard Methods for the Examination of Dairy Products», XI ed. (1960).

È la stessa formulazione indicata per il Plate Count Agar (Agar al lievito, glucosio e triptone) negli «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater», A.P.H.A., XI ed. 1960. È anche la stessa formula del Tryptone Glucose Yeast Agar (U.S.P. XVI e A.O.A.C., X edizione, 1965).

I componenti del terreno Oxoid CM463 sono conformi alle specifiche indicate negli «Standard Methods for the Examination of Dairy Products», A.P.H.A., ed. XII, 1967, pagine 232-233.

Gli standard fisici del terreno corrispondono alla specifica descritta dall'A.P.H.A. XII ed. 1967 pagina 233 e la produzione del terreno viene controllata secondo le prove descritte nella citata pubblicazione (pp. 234-242).

Il terreno Oxoid CM463 può venir usato anche nell'esame microbiologico di alimenti, come indicato dall'Association of Official Agricultural Chemists, IX ed., 1960 e nei «Recommended Methods for Microbiological Examination of Foods» A.P.H.A., 1958.

Enterobatteri

E 18

Brilliant Green Bile (2%) Broth

BRODO ALLA BILE (2%) E VERDE BRILLANTE

Codice — polvere: CM31/10080
 — compresse: CM32/11050

FORMULA

Peptone	10	g/l
Lattosio	10	
Bile di bue (purificata)	20	
Verde brillante	0.0133	

pH 7.4

ISTRUZIONI

Polvere: mettere 40 g in 1 litro di acqua distillata.
Mescolare bene, distribuire in contenitori ai quali possano venire applicate campanule di Durham e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Comprese: aggiungere 1 compressa a 10 ml di acqua distillata ed inserire la campanula di Durham. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

DESCRIZIONE

Questo terreno viene usato per individuare o confermare la presenza di membri del gruppo di organismi coli-aerogenes. Il Brodo alla bile e al verde brillante è basato sullo stesso principio del brodo di MacConkey, ma Mackenzie ed altri (1) hanno trovato che il verde brillante contenutovi inibisce efficacemente i microrganismi anaerobi fermentanti il lattosio, quali *Clostridium perfringens* (*Cl. welchii*) che davano reazioni falsamente positive a 44 °C. Usando *Cl. perfringens* quale organismo indicatore, il verde brillante contenuto nel terreno Oxoid è titolato in modo da provocare in misura ottimale l'inibizione di microrganismi sporigeni senza interferire con l'isolamento di *Escherichia coli*. Il brodo alla bile e al verde brillante è consigliato negli "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (2) quando si vuol avere una conferma del test presuntivo per i coliformi; mentre negli "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (3) questo terreno è raccomandato per il test presuntivo per gli organismi coliformi. Labots & Gelesloot (4) hanno trovato che il brodo alla bile e al verde brillante Oxoid, incubato a 30 °C, era adatto per il riconoscimento dei coliformi nel latte.

TECNICA

Nella versione del metodo Mackenzie suggerita da Windle Taylor (5) provette di brodo MacConkey ritenute positive sono state trapiantate in brodo alla bile e al verde brillante e acqua peptonata. Ambedue le provette sono state poste ad incubare a 44 °C. Dopo 6 ore e dopo 24 ore l'acqua peptonata è stata esaminata per la presenza di indolo, mentre il brodo alla bile e al verde brillante è stato esaminato per la torbidità e la produzione di gas; quest'ultima è indicata dall'effervescenza se la provetta col terreno è tappata e da bolle di gas nella campanula di Durham (cioè: reazione positiva).
Taluni organismi coliformi ad eccezione dell'*E. coli* 1, danno risultato positivo con brodo alla bile e al verde brillante, cosicché la prova coll'indolo è necessaria per differenziarli: risultati positivi col verde brillante e coll'indolo, indicano la presenza di *E. coli* 1; risultati positivi col verde brillante e negativi coll'indolo indicano tipi II o VI irregolari.
Grazie all'alto contenuto in triptofano, Tryptone Water CM 87 è migliore del Peptone Water CM 9 per la coltura di organismi che devono essere

saggiati per la produzione di indolo. Nei metodi americani, le provette di brodo alla bile e al verde brillante inoculate vengono poste in termostato per 48 ore a 35 °C per il test presuntivo; gli inoculi sono costituiti da diluizioni del campione originale. Se viene usato quale terreno di conferma, il brodo è inocolato a partire da provette di fermentazione primaria (brodo con lattosio o brodo con lauril-triptosio) che presentano sviluppo di gas dopo 24 o 48 ore. Nei procedimenti australiani, Lightbody (6) ha trovato che il brodo alla bile e al verde brillante o il brodo di MacConkey, forniscono migliori risultati per il test presuntivo dei coliformi su prodotti caseari, se incubati a 32 °C.

E19

BIBLIOGRAFIA

1. Mackenzie, E.F.W., Windle Taylor, E., Gilbert, W.E. (1948) *J. gen. Microbiol.* **2**, 197-204.
2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution control Federation (1965) *Standard Methods for the Examination of Water, Wastewater* 12th APHA Inc., New York, pp. 596-597.
3. American Public Health Association (1967) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* 12th ed., APHA Inc., New York, pp. 54, 57, 59-64.
4. Labots, H. and Galesloot, Th. E. (1960) *Rapp. Ned. Inst. Zuivelonderz.* **25**.
5. Windle Taylor, E. (1958) *The Examination of Waters and Water Supplies* 7th ed., Churchill Ltd., London, pp. 439-440.
6. Lighthody, Lorna G. (1963) *Aust. J. Dairy Tech.* **18** (4), 202-203.

Violet Red Bile (Lactose) Agar

E20

AGAR CON CRISTAL VIOLETTO, ROSSO NEUTRO, BILE E LATTOSIO

Codice – Polvere CM107/10715
Comprese CM108/11620

FORMULA

Estratto di lievito	3	g/l
Peptone	7	
Sodio cloruro	5	
Sali biliari	1.5	
Lattosio	10	
Rosso neutro	0.03	
Cristal violetto	0.002	
Agar	12	

pH 7.4

ISTRUZIONI

Polvere: sospendere 38.5 g in 1 litro di acqua distillata. Portare all'ebollizione sino a soluzione completa. Non è né richiesto né consigliato di sterilizzare successivamente. Mescolare bene prima di versare.

Comprese: aggiungere 1 compressa a 5 ml di acqua distillata, lasciar sciogliere per 5 minuti. Portare ad ebollizione fino a sciogliere completamente il terreno. Non è necessaria ulteriore sterilizzazione.

DESCRIZIONE

L'agar con cristal violetto, rosso neutro e bile è un terreno selettivo per l'evidenziazione e per la conta di microrganismi coliformi. Il terreno ha trovato impiego per la determinazione dei *coli-aerogenes* contenuti nell'acqua, nel latte e in altri prodotti caseari, nelle attrezzature dell'industria casearia e nei prodotti alimentari, ecc. Per la prova indiziaria di organismi coliformi nei prodotti caseari (usando terreni solidi), i metodi che impiegano Violet Red Bile Agar sono stati consigliati da Davis (1) e dall'APHA (2). Druce e coll. (3) hanno trovato che questo terreno era un indicatore dei batteri *coli-aerogenes* nel latte altrettanto efficace che il brodo di McConkey, e che il terreno Oxoid era idoneo per la determinazione del contenuto di *coli-aerogenes* del latte.

TECNICA

Druce e coll. hanno consigliato i seguenti procedimenti: per la determinazione routinaria del contenuto di *coli-aerogenes* del latte crudo, preparare piastre di agar-germi contenenti 1.0 0.1 e 0.01 ml del campione, in Violet Red Bile Agar ed incubare a 37 °C per 20-24 ore. Per la conta di *coli-aerogenes* nel latte pastorizzato, adoperare 4 piastre di Violet Red Bile Agar CM107, inoculate per inglobamento. Ripartire 10 ml del campione fra tre delle piastre e mettere 1 ml del campione sulla restante piastra. Incubare per 20-24 ore a 30 °C. Analogamente l'esame di acque di lavaggio e di tamponi prelevati dalle apparecchiature e dagli impianti caseari, deve comprendere l'inoculo di 3 piastre con 10 ml di soluzione ciascuna ed 1 ml sulla piastra rimanente. I coliformi sviluppano colonie di 1-2 mm di solito circondate da un alone rossastro. Occasionalmente i *coli-aerogenes* si presentano notevolmente più piccoli (meno di 0.5 mm di diametro).

BIBLIOGRAFIA

1. Davis J. G. (1951) «Milk Testing», Dairy Industries Ltd., London, pp. 131.

Violet Red Bile Glucose Agar

E 21

AGAR CON CRISTAL VIOLETTO, ROSSO NEUTRO, BILE E
GLUCOSIO

Codice CM485/10720

FORMULA

Estratto di lievito	3	g/l
Peptone	7	
Sodio cloruro	5	
Sali biliari n. 3	1.5	
Glucosio	10	
Rosso neutro	0.03	
Cristal violetto	0.002	
Agar	12	

pH 7.4

ISTRUZIONI

Sospendere 38.5 grammi in 1 litro di acqua distillata. Far bollire per disciogliere completamente il terreno. Una ulteriore sterilizzazione non è né richiesta né consigliata. Mescolare bene e distribuire in provette o in capsule.

DESCRIZIONE

È stata consigliata, nell'esame di derrate alimentari, la determinazione di un gruppo più definito di microrganismi, le enterobatteriacee, che fermentano il glucosio producendo acido e/o gas. Oltre ai coliformi, questo gruppo comprende salmonelle e shigelle che non fermentano il lattosio ed *E. coli*, enteropatogeno. Esso comprende anche microrganismi quali *Klebsiella* e *Citrobacter* che sono più resistenti al calore dei coliformi e pertanto sono indicatori migliori di un eventuale insuccesso dei trattamenti termici sterilizzanti. Le difficoltà di misurare il contenuto totale di enterobatteriacee in derrate alimentari sono state studiate da Mossel e coll. (3) i quali hanno trovato che l'aggiunta di destrosio ad un terreno esistente per la evidenziazione di coliformi ne migliora il rendimento. Essi hanno aggiunto 10 grammi di destrosio per litro a Violet Red Bile Agar (CM107) ed a questa formulazione modificata hanno dato il nome di agar di MacConkey, modificato con destrosio.

In un successivo lavoro Mossel ed altri (4) hanno dimostrato che il lattosio

può essere tralasciato, pervenendo alla formulazione del Violet Red Bile Glucose Agar CM485.

I terreni che contengono sali biliari posseggono una tossicità intrinseca nei confronti delle enterobatteriacee, anche verso quelle cellule che non sono state sottoposte a stress (5), (6), (7), (8), (9), (10). Sono state riscontrate notevoli differenze tra sei preparazioni commerciali di Violet Red Bile Agar (4) per quanto concerne la capacità di crescita delle enterobatteriacee e l'intensità del loro metabolismo. L'Autore ha perciò delineato il seguente capitolato:

- I. I terreni devono essere limpidi e fornire colonie di dimensioni soddisfacenti. Essi devono dare conte riproducibili di colonie tipiche di enterobatteriacee.
- II. Nel saggio della tossicità intrinseca, usando un ceppo di *Yersinia enterocolitica* (Sierotipo 03) quale indicatore sensibile, i terreni devono favorire adeguate crescite, formazione di acidi e, se richiesto, un'opportuna liberazione di gas.
- III. I terreni devono soddisfare il tasso di conferma di colonie tipiche, cioè il numero di colonie comprovate quali enterobatteriacee diviso per il numero delle colonie saggiate.

Il Violet Red Bile Glucose Agar Oxoid CM485 è stato messo a punto per soddisfare tutti questi criteri.

TECNICA

Preparare una serie di diluizioni di campioni in modo che ve ne sia compresa almeno una che produca 100-200 colonie da un'aliquota di 1 ml. Trasferire aliquote di 1 ml di ciascuna diluizione in piastre, usando due piastre per ciascuna diluizione. Aggiungere 15 ml di terreno, raffreddato a 47 °C. Mescolare delicatamente. Dopo che il terreno si è solidificato, ricoprire con 10 ml dello stesso terreno e lasciare che solidifichi. Capovolgere le capsule e incubare per un'intera notte a 30 o 37 °C.

Il rivestimento di agar garantisce condizioni anaerobiche che eliminano la crescita di batteri Gram-negativi non fermentanti. Esso agevola anche la fermentazione del glucosio, il quale favorisce la formazione di colonie purpuree chiaramente visibili, circondate da un alone di color porpora.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO Technical Report Series N. 598 (1976) Geneva, p. 51.
2. Mossel D. A. A. (1958) *Zbl. Bakt. I. Ref.* **166**, 421-432.
3. Mossel D. A. A., Mengerink W. H. J. and Scholts H. H. (1962) *J. Bacteriol.* **84**, 381.
4. Mossel D. A. A., Edelink I., Koopmans M. and van Rossen F. (1978) *Lab. Practice* **27**, No. 12, 1049-1050.
5. Mossel D. A. A. (1978) *Food Technol. Austral.* **30**, 212-219.
6. Kroninger D. L. and Banwart G. J. (1978) *J. Food Sci.* **43**, 1328-1329.
7. Bridson E. Y. (1978) *Antonie van Leeuwenhoek* **44**, in the press.
8. Burman N. P. (1955) *Proc. Soc. Water Treatm. Exam.* **4**, 10-20.
9. Mossel D. A. A. and Harrewijn G. A. (1972) *Alimenta* **11**, 29-30.
10. Mossel D. A. A., Harrewijn G. A. and Nesselroy-van Zadelhoff C. F. M. (1974) *Health Labor. Sci.* **11**, 260-267.
11. Mossel D. A. A. (1971) *Miscell. Papers Agricult. University Wageningen, The Netherlands* **9**, 29-39.
12. Mossel D. A. A., Eelderink I. and Sutherland J. P. (1977) *Zbl. Bakt. I. Orig. A* **238**, 66-79.

Stafilococchi

E 23

Baird-Parker Medium

Codice CM275/10035

FORMULA

Triptone	10	g/l
Lab-Lemco (estratto di carne)	5	
Estratto di lievito	1	
Sodio Piruvato	10	
Glicina	12	
Litio Cloruro	5	
Agar	20	

pH 6.8

SUPPLEMENTO

Egg Yolk Tellurite Emulsion

Codice SR54/54140

FORMULA

Potassio tellurito	0.1	g/l
Emulsione di tuorlo d'uovo	50	ml/l

ISTRUZIONI

Sospendere 63 g di Baird-Parker Medium CM275 in 1 litro di acqua distillata e far bollire sino a completa dissoluzione del terreno. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 50 °C. Agitare il supplemento SR54 prima dell'uso. Aggiungere 50 ml del supplemento a 1 litro di terreno di base sterile mantenuto a 50 °C. Mescolare bene e distribuire in piastra.

N.B. Le piastre preparate devono essere conservate a + 4 °C.

DESCRIZIONE

Il Baird-Parker Medium è un terreno altamente specifico, diagnostico e selettivo, idoneo per l'isolamento e la conta degli stafilococchi coagulasi-positivi negli alimenti. Il terreno è stato messo a punto per l'isolamento dello *Staphylococcus aureus* e perché si sentiva la necessità di un terreno specifico sul quale questo organismo potesse venir isolato entro 24 ore. Il terreno a base di glicerina-tellurito di Zebovitz ed altri (2) venne modificato da Baird-Parker il quale ha aggiunto piruvato di sodio quale stimolante selettivo della crescita ed emulsione concentrata di rosso d'uovo quale agente diagnostico. Il terreno Baird-Parker non inibisce lo *Staphylococcus aureus* e tuttavia è abbastanza selettivo da arrestare lo sviluppo della maggior parte degli altri batteri che si trovano negli alimenti. I pochi organismi che occasionalmente vi possono crescere (es. *Staphylococcus saprophyticus*) danno colonie caratteristiche che non possono dare origine a confusione. Gli stafilococchi mostrano due caratteristiche diagnostiche sul terreno opaco: in primo luogo essi possono produrre aloni chiari a causa della proteolisi; in secondo luogo possono apparire aloni opachi dentro zone chiare (probabilmente causati da una lipasi). *Staphylococcus aureus* e alcuni altri ceppi di *Staphylococcus saprophyticus* (3), possono dar luogo a tutte e due le caratteristiche, ma essi sono facilmente riconoscibili l'uno dall'altro per i diversi tempi durante i quali si sviluppa l'opacità. Il terreno permette l'evidenziazione di quantità molto piccole di *Staphylococcus aureus* ed ha dimostrato una correlazione molto maggiore con il test della coagulasi che altri terreni pubblicati. Baird-Parker (1), ed altri autori (4) hanno trovato che piastre con terreni Baird-Parker resistevano più a lungo alla conservazione se il piruvato veniva aggiunto subito prima dell'uso.

L'emulsione all'uovo-tellurito Oxoid SR54/54140 elimina questo problema e le piastre preparate possono venir conservate a 4 °C fino a quattro settimane.

Sharpe ed altri (5) hanno confrontato il terreno Baird-Parker con altri

terreni per l'isolamento di stafilococchi da latte crudo e da formaggio.

Su agar salato al mannitolo, soltanto il 49.9% delle colonie di tutti i campioni erano coagulasi-positivo. Su agar con fosfato di fenolfaleina, il 54.9% di colonie fosfatasi-positivo erano anche coagulasi-positivo. Col terreno Baird-Parker l'85.2% degli stafilococchi presunti coagulasi-positivi si dimostrarono tali anche al test.

Quando uno sperimentatore esperto riscontra colonie che presentano un aspetto tipico su terreno Baird-Parker, è raramente necessario confermare il risultato con un effettivo test di coagulasi.

Smith e Baird-Parker (6) hanno trovato che l'aggiunta di 50 µg/ml di solfometazina, inibisce la crescita e l'invasione di *Proteus*. Piccole quantità di *Staphylococcus aureus* possono essere determinate in campioni con *Proteus*.

Baird-Parker e Davenport (7) hanno dimostrato che il ritrovamento di stafilococchi danneggiati era maggiore su terreno Baird-Parker che su altri terreni d'isolamento saggiati. Broeke (8) e de Waart e altri (9) hanno trovato il terreno Baird-Parker molto utile negli studi su alimenti sospetti per casi di enterotossicosi stafilococcica: il 97,5% di 522 ceppi di *Staphylococcus aureus* saggiati, isolati da campioni di origine umana ed alimentare, si svilupparono sul terreno Baird-Parker.

TECNICA

- 1) Far asciugare la superficie delle piastre preparate.
- 2) Con una spatola di vetro distribuire 0,1-1,0 ml di varie diluizioni dell'alimento (macerato in Peptone Water CM9/10495, all'1%) sulla superficie di ciascuna piastra ben asciutta.
- 3) Lasciare 24-26 ore a 37 °C e procedere all'esame. Lasciare incubare per altre 24 ore se non si sono osservate colonie di *Staphylococcus aureus*.

ASPETTO DELLE COLONIE

- *Staphylococcus aureus* — dopo 24 ore: nere, brillanti, convesse, con diametro di 1,0-1,5 mm, margine biancastro continuo, circondato da un alone chiaro largo 2-5 mm. Alcuni ceppi mostrano questi aloni chiari ben definiti soltanto dopo 36 ore. Si possono produrre larghi aloni opachi che si estendono all'interno del terreno chiarificato, ma soltanto dopo 48 ore o più. Gli stafilococchi coagulasi-negativi crescono occasionalmente ma raramente producono la chiarificazione.
- *Staphylococcus saprophyticus* — può produrre la chiarificazione, ma le colonie sono più irregolari di quelle dello *Staphylococcus aureus*. Ampie zone opache si estendono dentro il terreno chiarificato dopo 24 ore.
- Micrococchi — occasionalmente vi crescono; minuti, con sfumature variabili dal marrone al nero, senza chiarificazione.
- Lieviti — crescono occasionalmente; di colore bianco senza chiarificazione.
- *Bacillus* — compaiono occasionalmente e rendono talvolta il terreno chiaro dopo 48 ore, ma presentano colonie di color bruno scuro opaco.

BIBLIOGRAFIA

1. Baird-Parker, A.C. (1962) *J. appl. Bact.* **25** (1), 12-19.
2. Zebovitz, E., Evans, J.B. and Nien, C.F. (Jr) 1955) *J. Bact.* **70**, 686.
3. Shaw, Costance, Slitt, Jennifer M. and Cowan, S.T. (1951) *J. gen. Microbiol.* **5** (5), 1010-1023.
4. Holbrook, R., Anderson, Judy M. and Baird-Parker, A.C. (1969) *J. appl. Bact.* **32**, 187-192.
5. Sharpe, M., Elizabeth, Neave, F.K. and Reitern, B. (1962) *J. appl. Bact.* **25** (3), 403-415.
6. Smith, B.A. and Baird-Parker, A.C. (1964) *J. appl. Bact.* **27**, (1) 78-82.
7. Baird-Parker, A.C. and Davenport, E. (1965) *J. appl. Bact.* **28**, 390-402.
8. Broeke, R. Ten (1967) *Antoine van Leeuwenhoek* **33**, 220.
9. Waart, J. de Moussel, D.A.A., Broeke, H. Tenand Moosdijk, A. van de (1966) *J. appl. Bact.* **31**, 276-285.

Enterococchi

E25

BARNES BASAL MEDIUM

Formula (grammi per litro)

Peptone Bios D	10
Yeast Extract	10
Thallium Acetate	1
Glucose	10
Agar Bios LL	14

Preparazione

Sciogliere 45 g di polvere in 1000 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in frazioni di 100 ml ed autoclavare a 118°C per 15 minuti. Raffreddare in bagnomaria termoregolato a 50°C ed aggiungere, con le cautele dell'asepsi, 1 ml di una soluzione, sterilizzata per filtrazione di 2, 3, 5 trifeniltetrazolio cloruro (TTC) all'1% (p/v). Mescolare accuratamente, versare in piastre sterili e far asciugare la superficie dell'agar per circa 2 ore in termostato a 50°C. pH finale 6.0 ± 0.1.

Impiego

Barnes Basal Medium è un terreno selettivo e diagnostico per gli streptococchi di gruppo D.

L'effetto selettivo è dovuto principalmente al tallio acetato, che con meccanismo non ancora chiarito inibisce di preferenza le specie catalasi positive, e, in via secondaria, al pH relativamente basso.

L'incorporazione del TTC nel terreno permette una diagnosi presuntiva di specie: Barnes ha infatti osservato che, in presenza di abbondante glucosio ed a pH 6,0, il TTC viene rapidamente ridotto a formazan rosso solo da alcune specie di streptococchi. Sul terreno di Barnes gli streptococchi possono dare origine a tre tipi di colonie:

- 1) bianche o rosa molto chiaro, caratteristiche delle specie con scarsa attività riducente: *Streptococcus faecium*, *Streptococcus bovis*
- 2) con centro rosso intenso e orlo bianco: *Streptococcus faecalis* e varietà
- 3) uniformemente rosse: *Streptococcus lactis* e specie non identificate di gruppo N.

Il terreno può essere usato per l'isolamento diretto: inoculare il materiale da esaminare, opportunamente diluito, sulla superficie di piastre ben asciutte ed incubare a 37°C per 24 ore. Se si suppone che il materiale contenga anche numerosi streptococchi lattici, incubare a 45°C in modo che coltivino solo le specie fecali. Viene consigliato un periodo di incubazione piuttosto breve in modo che non si sviluppino anche le altre specie tallio tolleranti (es. *Lactobacillus* spp.).

ICMSF non suggerisce un limite di tolleranza per gli streptococchi fecali negli alimenti poiché per interpretare correttamente il significato di un dato numero in un dato alimento, è indispensabile fondare il giudizio sulla pregressa esperienza specifica.

Afferma però che un numero abbondante di streptococchi D in un alimento è indice di scarsa qualità microbiologica (a meno che non sia stato introdotto un ceppo specifico nell'alimento per fermentarlo) perché implica o inadeguate pratiche igieniche di pulizia e disinfezione, o esposizione dell'alimento a condizioni ambientali che possono permettere anche abbondante sviluppo di altre specie batteriche.

Bibliografia

- Barnes, E.M. (1956) - Methods for the isolation of faecal streptococci (Lancefield group D) from bacon factories. J. Appl. Bact., 19, 193-203.
- Barnes, E.M. (1956) - Tetrazolium reduction as a mean differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. J. Gen. Microbiol., 14, 57-68.
- Barnes, E.M. (1959) - Differential and selective media for the faecal streptococci. J. Sci. Food Agric., 10, 656-662.
- ICMSF (1978) - Microorganisms in Foods: their Significance and Methods of Enumeration. 2nd ed.

Seconda parte - MERCOLEDI

Anno accademico

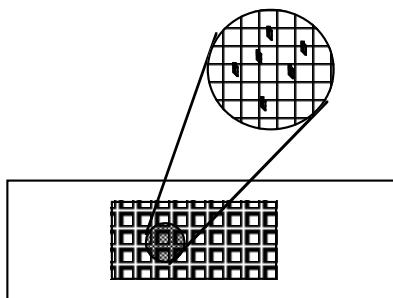
Data

E26**CONTEGGIO DEI MICRORGANISMI NEGLI
ALIMENTI****METODI DIVERSI DALL'ESAME BATTERIOLOGICO**

Una sospensione batterica che appaia leggermente torbida a occhio nudo contiene approssimativamente 10 milioni di batteri (10^7) per millilitro.

Conteggio cellulare*Microscopia*

Il numero di microrganismi può essere stabilito per osservazione diretta al microscopio grazie all'impiego di particolari camere di conteggio, ossia di vetrini portaoggetti su cui è impresso un reticolo costituito da una serie di quadratini il cui lato misura $50 \mu\text{m}$. I bordi del reticolo sono leggermente rialzati, in modo tale che, una volta deposta la goccia della sospensione batterica in esame e ricoperto il tutto con un sottile vetrino coprioggetto, l'altezza della camera, cioè la distanza tra la superficie del reticolo e quella del coprioggetto, corrisponda esattamente a $20 \mu\text{m}$. Le sole cellule batteriche che vengono contate sono quelle che si osservano all'interno dei vari quadratini del reticolo; il numero ottenuto viene rapportato al valore volumetrico della camera e, se il campione della sospensione batterica è stato diluito prima di essere stato esaminato, viene moltiplicato per il relativo fattore di diluizione. La camera di conteggio che viene di solito impiegata in batteriologia è detta **camera di Petroff-Häuser**. Tale tecnica non consente di distinguere le cellule batteriche morte da quelle vive e fornisce quindi valori di conte totali.



Camera di Petroff-Häuser per il conteggio delle cellule batteriche. Le dimensioni di ciascuno dei quadratini che costituiscono il reticolo sono: $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 20 \mu\text{m}$; il volume corrisponde a $50.000 \mu\text{m}^3$. Il numero dei batteri contati sull'intera area del reticolo (quadrato grande) viene moltiplicato per il valore volumetrico e per il fattore di diluizione della sospensione batterica, qualora una tale diluizione si sia resa necessaria prima di procedere al conteggio. (da Boyd, *Microbiologia generale*, Medical Books).

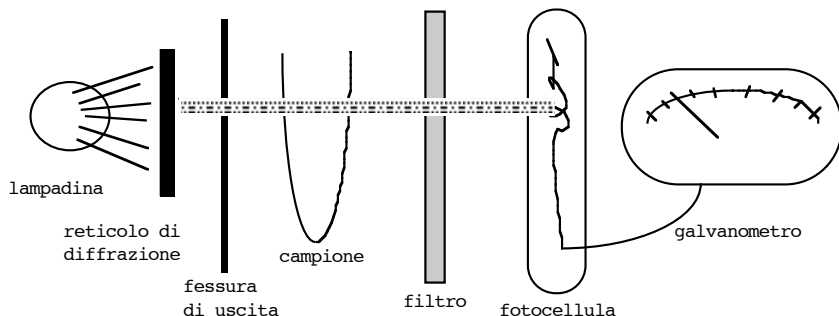
Resistenza elettrica

E27

Le cellule sono dei cattivi conduttori di elettricità e oppongono resistenza al passaggio della corrente elettrica. Il **contatore Coulter** è una apparecchiatura in cui una sospensione cellulare viene fatta passare attraverso una sottilissima fessura su entrambi i lati della quale sono posti degli elettrodi. Una cellula batterica che si frapponga tra i due elettrodi impedisce il passaggio della corrente e determina una caduta di voltaggio che viene registrata sotto forma di un impulso la cui altezza è proporzionale al volume della cellula. Contando gli impulsi e la loro forma, tale sistema consente di determinare il numero e le dimensioni delle cellule presenti in una data sospensione. Anche in questo caso non si distinguono le cellule vive da quella morte e i valori sono quindi riferiti a conte totali. Una possibile fonte di errore è la presenza nella sospensione batterica di particelle di pulviscolo o di fibre.

Densità cellulare

I sistemi **fotometrici** sono quelli maggiormente impiegati per determinare la concentrazione di una sospensione batterica. il raggio di luce che viene diretto sulla sospensione batterica subisce una deviazione quando colpisce la parete cellulare. Nella tecnica detta **turbidometria** si valuta l'intensità della luce non deviata (luce trasmessa); nella tecnica detta **nefelometria** si valuta l'intensità della luce deviata. Per le determinazioni nel campo della crescita batterica si ricorre quasi esclusivamente alle tecniche turbidometriche.



Rappresentazione schematica dello spettrofotometro impiegato per determinare la torbidità di una sospensione batterica. La luce bianca emessa da un filamento di tungsteno, colpendo un reticolo di diffrazione produce uno spettro di fotoni di differente lunghezza d'onda. Solo quei fotoni che passano attraverso la fessura di uscita raggiungono il campione (modificando la fessura di uscita si può selezionare la lunghezza d'onda desiderata). I fotoni che passano attraverso il campione vanno a eccitare una fotocellula che è collegata a un galvanometro il quale misura l'intensità luminosa. Quanto minore è la concentrazione cellulare del campione tanto maggiore è la quantità di luce emessa e viceversa. (da Boyd, Microbiologia generale, Medical Books).

Gli strumenti utilizzati per misurare la luce assorbita sono detti **fotometri** o **spettrofotometri**. La teoria su cui si basa

l'impiego di queste apparecchiature fa riferimento alla legge di Beer-Lambert per i soluti che stabilisce l'esistenza di una relazione lineare tra l'assorbanza (detta anche densità ottica) di una soluzione e la concentrazione del soluto. Una sospensione batterica può essere considerata analoga a un soluto ed esiste un relazione lineare tra la sua densità ottica e il numero di cellule per millilitro.

E28

Massa cellulare

Si può misurare la massa cellulare determinando il peso secco o quello umido di una popolazione batterica. Per determinare il peso secco, la sospensione batterica viene centrifugata e lavata ripetutamente. Dopo questo trattamento il campione viene raccolto in un contenitore e posto in un forno a 100°C o sotto vuoto a 80°C per essere essiccato. Le determinazioni del peso umido vengono effettuate facendo adsorbire le cellule batteriche su di un filtro precedentemente essiccato (e di peso noto), e ponendo poi il tutto sotto vuoto a 40°C per eliminare l'acqua extracellulare. La determinazione della massa cellulare è un procedimento laborioso che richiede tempo e ci si ricorre solo in determinate occasioni e per particolari esigenze sperimentali, ad esempio quando si lavora con microrganismi che generano in coltura forme filamentose o che tendono ad aggregarsi.

Metodi chimici

Diversi componenti cellulari di natura chimica possono essere facilmente analizzati tramite sistemi colorimetrici. Si può determinare il contenuto in RNA, DNA o proteine di una sospensione batterica trattando le cellule con agenti che idrolizzano queste macromolecole con formazione di derivati in grado di interagire con specifici reagenti. In genere si producono complessi colorati la cui concentrazione può essere misurata allo spettrofotometro. Anche la quantità totale di ATP che viene prodotta dà un indice della carica batterica.

Assunzione di fattori nutritivi-produzione di metaboliti

In condizioni ambientali standardizzate, la crescita cellulare può essere correlata al consumo di ossigeno da parte di un microrganismo, alla secrezione o alla assunzione di alcuni metaboliti, nonché alla quantità di acidi prodotti in seguito alla fermentazione degli zuccheri.

Seconda parte - MERCOLEDI

Anno accademico

Data

E29**STUDIO DEI MICRORGANISMI****CARATTERI MORFOLOGICI****Forma del corpo microbico**

Forma bastoncellare, sferica, a virgola, a spirale.

A fresco

Deporre una goccia di brodocoltura o di sospensione batterica su un vetrino portaoggetti, porvi sopra un vetrino coprioggetti. Schiacciare i due vetrini fra loro in modo da lasciare un sottile strato di liquido.

A goccia pendente

Si veda al paragrafo "Mobilità".

Previa colorazione

Si veda al paragrafo "Affinità tintoriali".

Disposizione tra gli elementi

I batteri possono trovarsi disposti ad elementi singoli, a coppia, a tetradi, in ammassi irregolari, in catenelle, a palizzata, a V, a L. Per la valutazione si allestiscono preparati come sopra.

Presenza delle ciglia/mobilità*Evidenziazione delle ciglia*

Vi sono diverse colorazioni che permettono l'evidenziazione delle ciglia. Si rimanda ai testi di microbiologia.

*Mobilità*Esame a goccia pendente

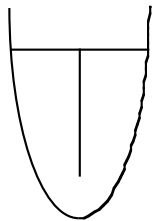
-) porre una goccia di brodocoltura o di sospensione batterica al centro di un vetrino coprioggetti;
-) capovolgere il vetrino portaoggetti (preventivamente cosparso di vaselina fluida per farvi aderire il vetrino coprioggetti) sul vetrino coprioggetti, in modo che la goccia si trovi al centro della cella;
-) capovolgere il tutto e osservare al microscopio.

E30Prova in terreni semisolidi*Terreno per il test della mobilità*

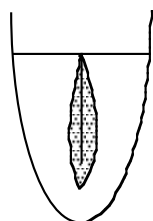
Triptone.....g	10
NaCl.....g	5
Agar.....g	5
acqua distillata....ml	1.000

Sciogliere gli ingredienti a caldo, aggiustare il pH a 7,2 e distribuire in tubi. Sterilizzare a 121°C per 15'.

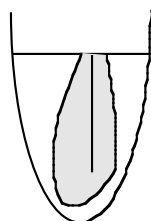
-) seminare con filo di platino per infissione. Durante la semina avere cura di produrre un solo canale di infissione;
-) incubare;
-) lettura:



immobile



poco mobile



mobile

Entità della sostanza capsulareColorazione di Duguid

-) porre una goccia di inchiostro di china su un vetrino portaoggetti;
-) mescolarvi una goccia di brodocoltura o di sospensione batterica;
-) deporre sopra a questa mescolanza un vetrino coprioggetti;
-) osservare al microscopio.

Le capsule appaiono come piccole zone chiare che avvolgono il corpo batterico su fondo scuro.

E31**Presenza, forma e disposizione della spora**

Colorazione di Bartholomew (da Tiecco, Microbiologia degli Alimenti di O.A., Edagricole).

-) strisciare con ansa una goccia di brodocoltura o di sospensione batterica su un vetrino portaoggetti e far asciugare all'aria;
-) fissare il preparato alla fiamma;
-) versare sul preparato alcuni ml di una soluzione satura di verde di malachite e lasciar agire per 10";
- lavare con acqua di fonte per 10";
- versare alcuni ml di una soluzione di safranina allo 0,25% e lasciare agire per 15";
-) lavare con acqua di fonte;
- osservare al microscopio.

Le spore risultano colorate in verde e il soma in rosso.

Forma: sporangio rotondo, ovale, ellissoidale

Posizione: centrale, sub-terminale, terminale

Deformazione o meno del soma batterico

Affinità tintoriali*Colorazione di Gram*

- 1) Distendere, seccare, fissare.
 - 2) 3'-5' **violetto di genziana** (ml 10 soluzione alcoolica madre⁴ + ml 90 di acido fenico al 2% in acqua distillata).
 - 3) Lavare con acqua di fonte.
 - 4) 3'-5' **liquido di Lugol** (iodio 1 parte, ioduro di potassio 2 parti, acqua distillata 300 parti).
 - 5) Versare il liquido di Lugol e decolorare con **alcol-acetone** (alcol 95° 80 parti, acetone 20 parti) fino a che si osserva cessione di colore.
 - 6) Lavare con acqua di fonte.
 - 7) 30"-1' **fucsina basica** (10%).
- I germi Gram positivi risultano colorati in violetto mentre quelli Gram negativi in rosso.

E32*Colorazione di Ziehl-Nielsen*

- 1) Distendere, seccare, fissare.
 - 2) fuxina fenicata (soluzione alcoolica madre di fucsina ml 10, acido fenico 5% ml 90) a caldo fino a emissione dei primi vapori, ripetere dopo 3-4'. Eliminare il colorante dopo 5-7' dal primo riscaldamento;
 - 3) lavare con acqua di fonte;
 - 4) decolorare con soluzione alcol-acido (acido cloridrico concentrato ml 3, etanolo 95° ml 97) fino a che si osserva cessione di colore;
 - 5) lavare con acqua di fonte;
 - 6) colorazione di contrasto (bleu di metilene al 3% o bleu di Löffler [soluzione alcoolica madre di bleu di metilene ml 30, soluzione acquosa di KOH all'1% ml 1, acqua distillata ml 99]) per 2-3'.
 - 7) Lavare e asciugare.
- I germi acido resistenti risultano colorati in rosso mentre quelli non acido resistenti in bleu.

⁴le **soluzioni alcoliche madri** si preparano aggiungendo a 1 parte di colorante in polvere 9 parti di alcol 95°.

Seconda parte - MERCOLEDI Anno accademico

Data

STUDIO DEI MICRORGANISMI

E33

CARATTERI COLTURALI.

Lo sviluppo in terreni liquidi

In genere si assiste a un intorbidamento del terreno che, a seconda della specie batterica, può avere aspetto diverso (uniforme, a fiocchi, a granuli, diffuso, in superficie).

Aspetto della crescita in terreno liquido

-) *quantità*: nulla, scarsa, modesta, abbondante.
-) *torbidità*: assente o presente (debole, moderata, densa; uniforme, granulare, fioccosa).
-) *deposito* (sedimento): assente o presente (quantità, aspetto [polverulento, granulare, fioccoso, viscoso]; annotare se si forma una sospensione agitando).
-) *sviluppo in superficie*: assente o presente (anello o pellicola; comportamento dopo agitazione).

Lo sviluppo in terreni solidi

I batteri possono crescere formando una *patina* o *colonie isolate*.

Caratteri della colonia

-) *forma*: circolare, irregolare;
-) *grandezza*: in mm.;
-) *elevazione*: piatta, sopraelevata, convessa, ombelicata;
-) *superficie*: liscia, rugosa, brillante;
-) *margini*: lisci, lobati, dentati;
-) *opacità*: trasparente, traslucida, opaca;
-) *consistenza*: burrosa, viscosa, granulare;
-) *emulsione in acqua*: facile o difficile, si forma una sospensione uniformemente torbida, granulare, non si emulsiona;
-) *odore*: presente, assente;
-) *cromogenesi*: colore del pigmento e sua diffusione nel terreno.

E34

Seconda parte - MERCOLEDÌ Anno accademico

Data

STUDIO DEI MICRORGANISMI

PROPRIETÀ METABOLICHE

Di seguito viene fornito un elenco di tutte le categorie di prove impiegate in batteriologia per lo studio delle proprietà metaboliche. Alcune di queste prove verranno di volta in volta trattate nel corso dello studio dei microrganismi causa di alterazione degli alimenti o causa di malattie alimentari.

□ Tipo respiratorio

La determinazione di questo carattere permette di suddividere i microrganismi in tre categorie:

Aerobi obbligati: crescono solo in presenza di aria;

aerobi-anaerobi facoltativi: crescono sia in presenza che in assenza di ossigeno libero;

anaerobi obbligati: crescono solo in assenza di ossigeno⁵.

Nella pratica si ricorre a terreni di coltura solidi (agar) che consentono la crescita dei germi *aerobi* soltanto sulla superficie della provetta; degli *anaerobi* soltanto in profondità e degli *aerobi-anaerobi facoltativi* su tutto il terreno.

⁵In pratica si definiscono *anaerobi obbligati* tutti i batteri che non crescono sulla superficie di terreni di coltura incubati in presenza di aria (20% in peso di O₂) o in presenza di aria addizionata del 10% di CO₂ (18% di O₂). Si dicono *microaerofili* i batteri che non crescono o crescono in maniera stentata in presenza di aria, mentre crescono molto bene in aria addizionata del 10% di CO₂

□ Azione sui carboidrati e sui composti del carbonio*Test di ossidazione/fermentazione**Produzione di CO₂ dal glucosio**Idrolisi dell'amido**Fermentazione dei carboidrati**Produzione di acetoina, prova del rosso metile**Utilizzazione dei citrati come unica fonte di carbonio**Utilizzazione del malonato**Idrolisi dell'esculina**Idrolisi dell'ippurato**Utilizzazione del gluconato***E35****□ Azione sulle proteine e sui composti azotati***Utilizzazione dell'azoto inorganico come unica sorgente di azoto**Idrolisi delle proteine**Idrolisi della gelatina**Idrolisi della caseina**Idrolisi del siero coagulato**Comportamento in latte**Produzione di indolo**Produzione di idrogeno solforato**Utilizzazione dell'urea**Azione sugli amminoacidi**Decarbossilazione degli a.a.**Decarbossilazione della lisina**Produzione di NH₃ dall'arginina**Trasformazione della fenilalanina in acido fenilpiruvico**Riduzione dei nitrati e dei nitriti*

□ Azione sui lipidi*Idrolisi del burro, dell'olio di oliva e della margarina**Idrolisi del Tween 80**Idrolisi della lecitina***E36****□ Ricerche enzimatiche***Catalasi**Ossidasi* *β -galattosidasi**Emolisi**Coagulasi**Fosfatasi***□ Sviluppo in condizioni avverse***Temperatura di crescita**Termoresistenza**Sviluppo a temperature non ottimali**Sviluppo a determinati valori di pH**Inibizione da NaCl**Azione della bile**Azione del tellurito**Inibizione da sostanze coloranti***□ Uso dei cosiddetti micrometodi**

Seconda parte - MERCOLEDI Anno accademico

Data

STUDIO DEI MICRORGANISMI

E 37

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

(da Tiecco G., Microbiologia degli Alimenti di Origine Animale, Edagricole).

Prelievo del campione, allestimento diluizioni e semina: more solito (cfr. esercitazioni #3 e #4).

Terreno: Baird-Parker (vedi pag. 25)

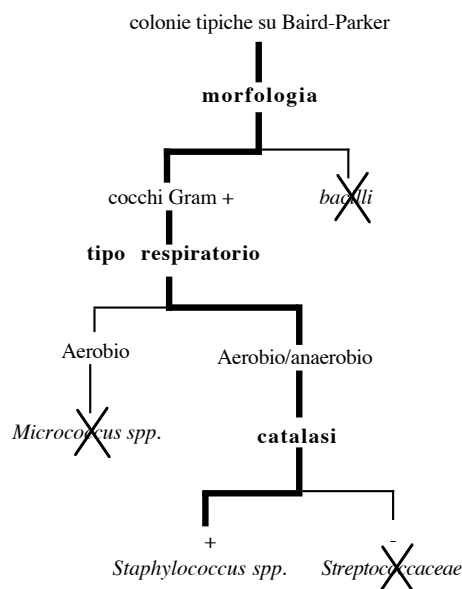
Inoculo: ml 0,1 di omogenato distribuito con spatola sulla superficie dell'agar.

Incubazione: 37°C per 24-48h

Lettura: vedi pag. 32. Tra gli ingredienti va ricordato che il PIRUVATO DI SODIO e la GLICINA hanno un effetto stimolante la crescita degli stafilococchi, che il CLORURO DI LITIO e il TELLURITO DI POTASSIO hanno effetto inibente lo sviluppo di germi di contaminazione. Inoltre la riduzione del TELLURITO DI POTASSIO (incolore) a tellurio metallico (nero) rende le colonie nere mentre la presenza del tuorlo d'uovo svela la presenza di una lipasi (prodotta da alcuni stafilococchi tra cui *S. aureus*) che, scindendo i lipidi dalla lipovitellenina, chiarifica l'agar (il cosiddetto "alone").

Le colonie sospette vengono isolate in terreno liquido per le successive prove di identificazione.

Chiave per i germi Gram positivi cocchi.



Test di ossido-fermentazione del mannitolo.

I micrococchi sono aerobi stretti e il loro metabolismo è esclusivamente di tipo ossidativo. Gli stafilococchi sono anaerobi facoltativi con metabolismo prevalentemente fermentativo. Questo test consente di escludere la presenza dei micrococchi.

Terreno di Mossel

Triptone	g 10,0
Estratto di lievito	g 1,5
Mannitolo o glucosio	g 10,0
Bromocresolporpora	g 0,015
NaCl	g 5,0
Agar	g 15,0
Acqua distillata	ml 1.000

Preparazione: Sciogliere gli ingredienti e aggiustare il pH a 6,9. Distribuire in tubi e sterilizzare a 115°C per 20'.

Semina: sciogliere il terreno a bagnomaria bollente, farlo raffreddare a 45-50°C, distribuire l'inoculo con pipetta Pasteur dal fondo della provetta fino alla superficie del terreno. Far solidificare in posizione verticale.

Incubazione: 37°C per 24-48 ore.

Lettura:

viraggio al giallo di tutto il terreno: fermentazione,
viraggio al giallo del solo anello superficiale: ossidazione

Ricerca della coagulasi

Prova in provetta (coagulasi libera e legata)

metodo

Emulsionare una colonia del germe in esame con 0,3-0,5 ml di plasma di coniglio addizionato di EDTA. Incubare a 37°C e

leggere la reazione ogni ora fino alla 24^a. La comparsa di un coagulo è indice di positività.

metodo II (preferibile)

Mescolare 0,3-0,5 ml di brodocoltura di 24 ore a 0,3-0,5 ml di plasma. Incubazione e lettura come sopra.

E 39

Prova su vetrino (coagulasi legata)

E' una prova presuntiva e il risultato negativo va confermato con la prova in provetta.

Deporre su di un vetrino portaoggetti una goccia di plasma di coniglio e stemperarvi la patina del germe in esame. La comparsa di fiocchi microscopici entro 5" è indice di positività

Ricerca della desossiribonucleasi (DNasi)

Gli stafilococchi patogeni sono in grado di scindere l'acido desossiribonucleico.

Terreno DNasi

DNA	g 2
Trypticase	g 15
Soyase	g 5
NaCl	g 5
Agar	g 15
pH	7,3

Preparazione: : Sciogliere gli ingredienti e aggiustare il pH a 7,3. Distribuire in bottiglie e sterilizzare a 121°C per 20'. Aggiungere 10 g di mannitolo e 0,025 g di blu di bromotimolo sterili e versare in piastra.

Semina: strisciata unica sulla piastra (anche più strisciate parallele, fino a 5).

Incubazione: 37°C per 24 ore.

Lettura: inondare la piastra con acido cloridrico 1N o con una soluzione di blu di toluidina 0,1%

in presenza di HCl:

zona chiara intorno alla strisciata e piastra opaca: germe DNasi+; assenza di zona chiara: germe DNasi-

in presenza di blu di toluidina:

zona rosa intorno alla strisciata e piastra blu: germe DNasi+
assenza di zona rosa: germe DNasi-

Spiegazione: la DNasi rompe i legami fosforici liberando H₃PO₄. L'HCl rende opaco il terreno con DNA integro, se il DNA non è integro non c'è opacamento (ecco spiegato l'alone trasparente). In presenza di H₃PO₄ il blu di toluidina diventa rosa.

Ricerca della termonucleasi (TNasi)

Terreno agar blu di toluidina

Tampone tris (0,05 M; pH 9,0) ml 1.000

DNA	g 0,3
Agar	g 10
soluzione 0,01 M di CaCl ₂	ml 3
NaCl	g 10

E 40

Preparazione: Sciogliere gli ingredienti e aggiungere ml 3 di una soluzione di blu di toluidina 0,1M. Il terreno non va sterilizzato. Al momento dell'uso versare in piastra, lasciare solidificare e asciugare, quindi praticare alcuni pozzetti.

Semina: bollire ml 2-3 di una brodocoltura di 24 ore per 10', e riempire i pozzetti con alcuni μ l della brodocoltura bollita.

Incubazione: 50°C per 2-4 ore.

Lettura: la presenza di un alone rosa intorno al pozzetto indica presenza di termonucleasi.

Spiegazione: come per la DNasi.

#	aspetto colonie	morfologi a	test O/F	coagulas i	DNasi	TNasi

E 41