METODI E TERRENI COLTURALI PER L'ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI

1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Lo scopo della preparazione di un campione per un'analisi microbiologica è quello di omogeneizzare il prodotto mediante l'utilizzo di un diluente senza danneggiare le forme microbiche presenti e che si vogliono determinare. Si deve operare in sterilità al fine di evitare contaminazioni esterne che potrebbero invalidare l'analisi. Le modalità di preparazione sono diverse a seconda della natura del prodotto.

- **PRODOTTI SOLIDI**

Pesare sterilmente una quantità sufficientemente rappresentativa del campione in esame (10-25 g) in un sacchetto sterile, aggiungere in ragione 1:10 diluente sterile, quindi omogeneizzare. L'omogeneizzazione viene effettuata con Stomacher, un apparecchio che grazie alla presenza di pedali che si muovono in senso rototraslatorio schiaccia il campione e ne determina lo sfibramento; la durata dell'omogeneizzazione sarà stabilita in base alla durezza e alla consistenza del campione. L'analisi deve essere eseguita subito, se ciò non fosse possibile, conservare in frigorifero (4°C) il campione diluito (figura 1). In alcuni prodotti quali semi, leguminose ecc., i microrganismi si dispongono sulla superficie esterna per tanto, per questi prodotti, non è necessario l'utilizzo dello stomacher, ma è sufficiente lasciarli a contatto con il diluente per un tempo non superiore a 10 minuti, meglio se in frigorifero, al fine di permettere il distacco dei microrganismi dalla superficie, ma non la loro moltiplicazione.

- **PRODOTTI LIQUIDI**

Non richiedono alcuna preparazione, ma si utilizzano direttamente tal quali (figura 2).

Figura 1 - Preparazione di un campione solido per l'analisi microbiologica

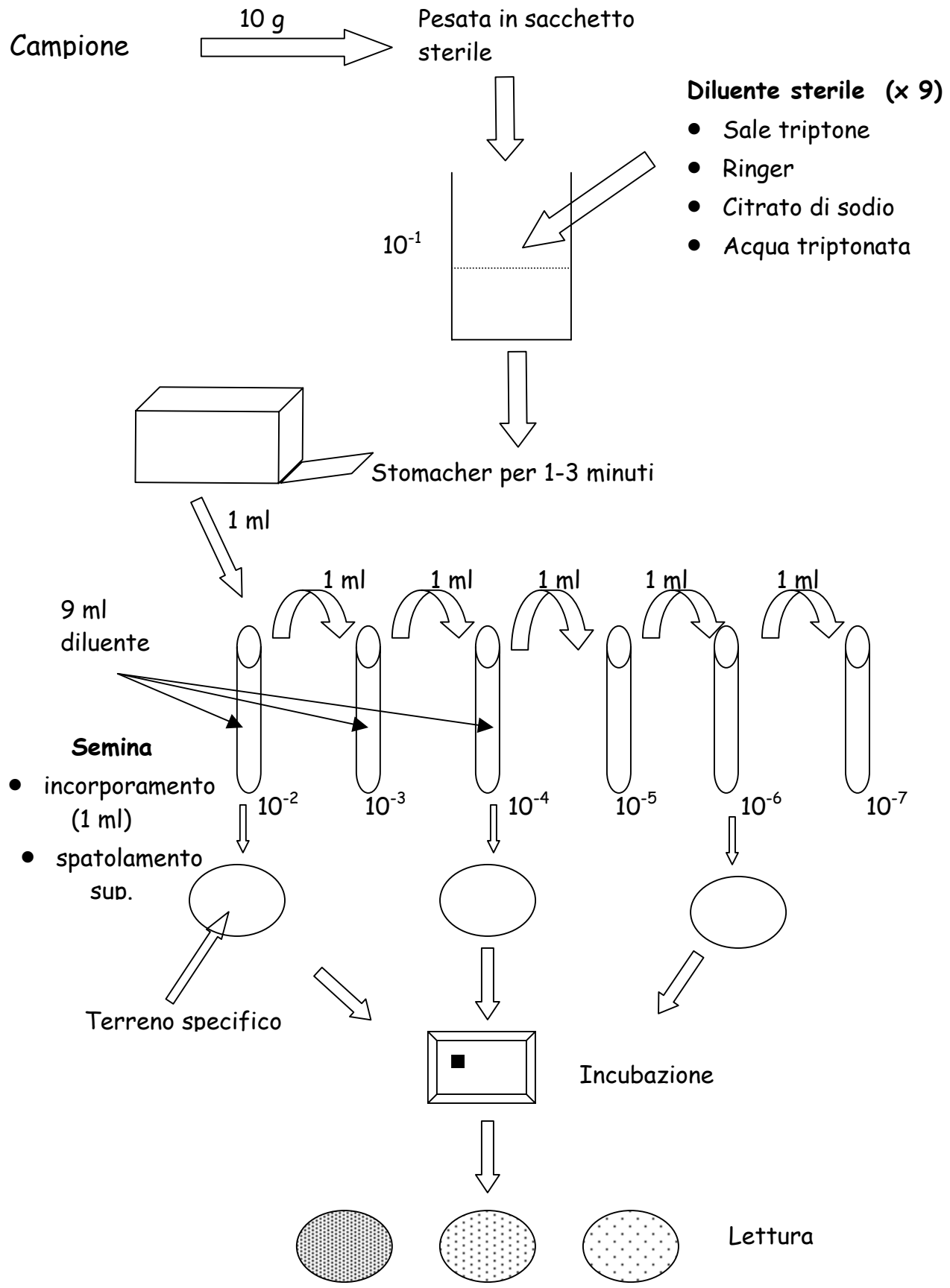
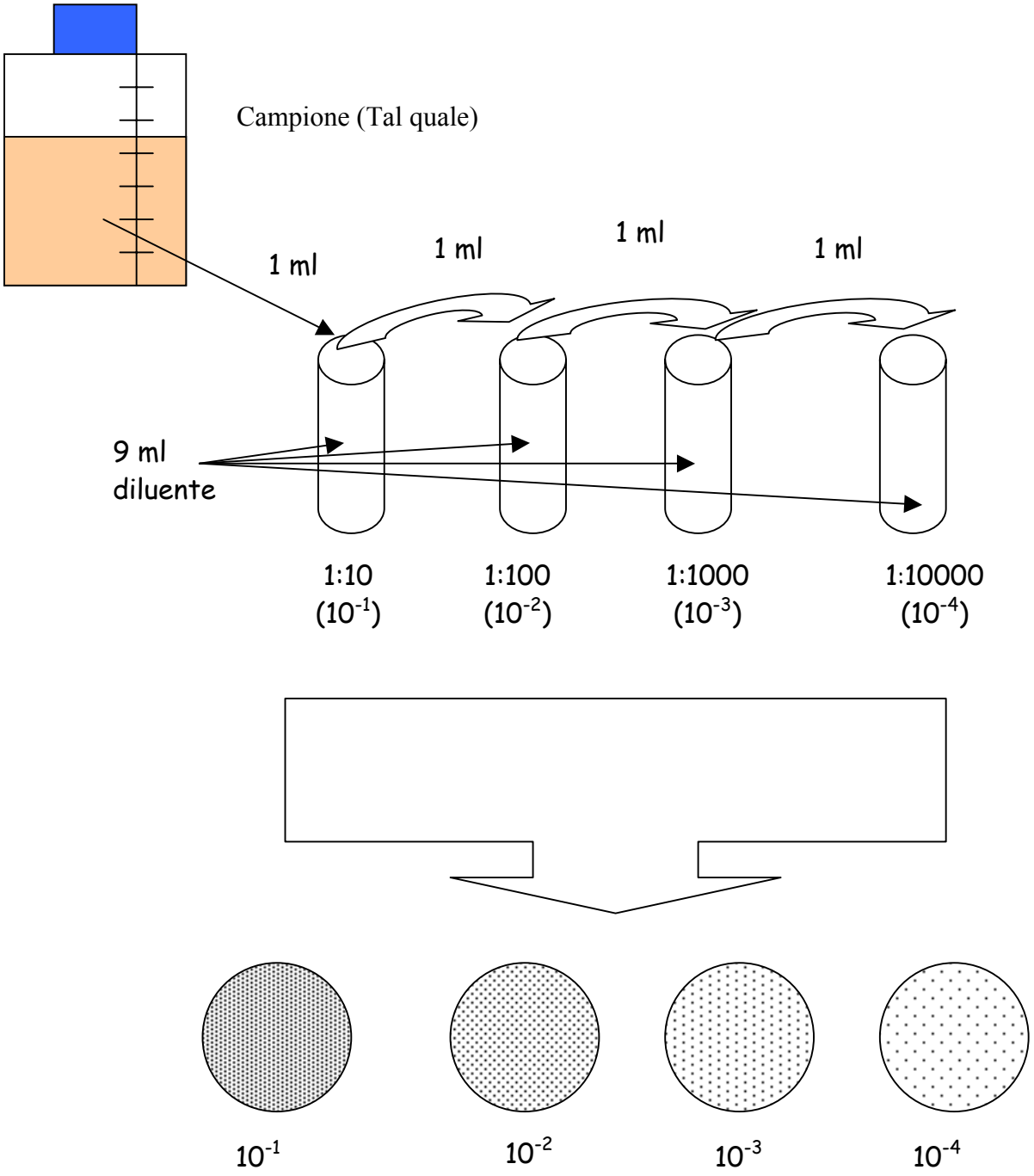


Figura 2 - Modalità di semina di un prodotto liquido



2. TECNICHE DI SEMINA

- **SEMINA PER INCORPORAMENTO**

Si procede, ponendo 1 ml di un'opportuna diluizione del campione in piastre Petri sterili del diametro di 9 cm quindi il terreno, preparato in precedenza e sciolto mediante ebollizione, una volta raggiunta la temperatura di 45-50°C, è versato in ciascuna delle piastre seminate in ragione di 10-12 ml. Quindi, al fine di distribuire la sospensione microbica nel modo più omogeneo possibile in tutto il terreno addizionato, si effettuano delicati movimenti rotatori, orizzontali e verticali della piastra.
Questo sistema può essere utilizzato per tutti i microrganismi

- **SEMINA PER SPATOLAMENTO SUPERFICIALE**

Preparare il terreno specifico e dopo sterilizzazione versarlo nelle piastre e lasciare solidificare. Seminare quindi 0.1 ml della diluizione del campione, precedente a quella prescelta, al centro di una piastra di Petri da 9 cm di diametro, contenente il terreno ben asciutto, preferibilmente preparato 24 ore prima. La sospensione microbica è quindi distribuita su tutta la superficie mediante l'aiuto di una spatola sterile a L, avendo cura di cambiare spatola per ogni diluizione oppure, iniziando a spatolare dalla diluizione più alta per evitare di trascinare microrganismi da una piastra all'altra. Per aumentare la possibilità di recupero microbico (campioni con cariche molto basse) si consiglia un aumento del volume da piastrare, quindi seminare 1 ml in una piastra di 14 cm di diametro.
Questo tecnica di semina è suggerita per i microrganismi aerobi stretti oppure quando si vuole evidenziare la morfologia delle colonie.

- **SEMINA IN DOPPIO STRATO**

Seminare 1 ml di un'opportuna diluizione in piastre di Petri sterili. Il terreno, preparato in precedenza, è sciolto mediante ebollizione e, raggiunta la temperatura di 45-50°C, è distribuito in ciascuna delle piastre seminate in ragione di 10-12 ml; una volta dispersa la sospensione microbica e, solidificazione del terreno, si procede all'aggiunta di un secondo strato di terreno, circa 8 ml, e si lascia solidificare. Questo sistema è abitualmente utilizzato per i microrganismi anaerobi facoltativi.

- **SEMINA PER INFISSIONE**

Prelevare con ago di platino sterilizzato una minima quantità di patina microbica da una coltura fresca e perforare il terreno debolmente agarizzato e solidificato che si intende seminare. Questa tecnica è utilizzata per seminare microrganismi anaerobi facoltativi o quando, a fini tassonomici, si

intende conoscere il metabolismo del microrganismo. Può essere effettuata sia in provetta che in piastra.

- **SEMINA IN ALTO STRATO**

Sciogliere per ebollizione il terreno agarizzato distribuito in provette, lasciar raffreddare sino a 50°C quindi, prima che il terreno si solidifichi nuovamente, seminare immergendo totalmente la pipetta nel terreno per tutta la sua altezza e lasciare cadere il contenuto, mentre la pipetta stessa viene estratta. Si evita in questo modo di introdurre aria. Lasciare quindi solidificare e coprire con un tappo di paraffina sterile solida o di agar doppio al fine di creare le condizioni di anaerobiosi. Questa tecnica si utilizza per i microrganismi anaerobi.

- **TECNICA DELLO STRISCIO**

La sospensione o la patina microbica, prelevata sterilmente con un'ansa calibrata, è distribuita sopra un terreno agarizzato, facendo passare delicatamente per tutta la superficie l'ansa. La semina può essere effettuata in provetta (becco di clarino o slant) quando lo scopo è di conservare il ceppo microbico oppure in piastre di Petri quando si vogliono differenziare le singole colonie.

3. TECNICHE DI CONTA

- **CONTA IN PIASTRA**

Sono considerate solamente le piastre che contengono un numero di colonie non superiore a 150 e comunque non inferiore a 10.

Il numero dei microrganismi in 1 ml di prodotto, o in 1 g, nel caso dei prodotti solidi, è dato dalla formula:

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

dove:

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

n_1 : rappresenta in numero di piastre utilizzate per la prima diluizione

n_2 : rappresenta in numero di piastre utilizzate per la seconda diluizione

d: è il fattore di diluizione relativo ai primi conteggi effettuati

Arrotondare il risultato a due cifre significative; il valore finale sarà quindi espresso come numero compreso tra 1.0 e 9.9 moltiplicato per l'opportuna potenza di dieci (diluizione considerata).

Nel caso in cui tutte le conte della colonie risultassero inferiori a dieci, esprimere il numero di microrganismi per grammo o ml come "meno di 10 x 1/d", dove d è il valore corrispondente alla prima diluizione piastrata.

Se tutte le conte fossero superiori a 150, esprimere il risultato come numero presuntivo di colonie, stimandolo in base al numero di colonie identificabili nella piastra più diluita.

Ad esempio:

Sono state seminate le piastre in doppio e dalla conta delle colonie si sono ottenuti i seguenti valori:

- nella prima diluizione (10^{-2}): 83 e 97 colonie
- nella seconda (10^{-3}): 13 e 10 colonie

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0{,}1 \cdot n_2) \cdot d} = \frac{83 + 97 + 13 + 10}{[2 + (0.1 \cdot 2)] \cdot 10^{-2}} = \frac{203}{0.022} = 9136$$

Il risultato sarà quindi espresso sulla base dell'approssimazione consigliata come 9.1 x 10^3

- **TECNICA DEL MUST PROBABLE NUMBER**

Ciascuna diluizione viene seminata in triplo, quindi per la lettura, si considerano le ultime tre diluizioni in cui si è verificata crescita e, per ciascuna diluizione si riporta il numero di provette positive, si ottiene così un numero caratteristico. Si ricerca sulle tavole di Mc Rady (tabella 1) questo numero che corrisponderà ad un certo quantitativo di microrganismi, tale numero deve essere moltiplicato per il reciproco della prima diluizione considerata nella lettura. Il valore ottenuto sarà il numero di microrganismi per g o ml di prodotto. La figura 3 riporta un esempio di lettura.

Figura 3 - Esempio di lettura con MUST PROBABLE NUMBER

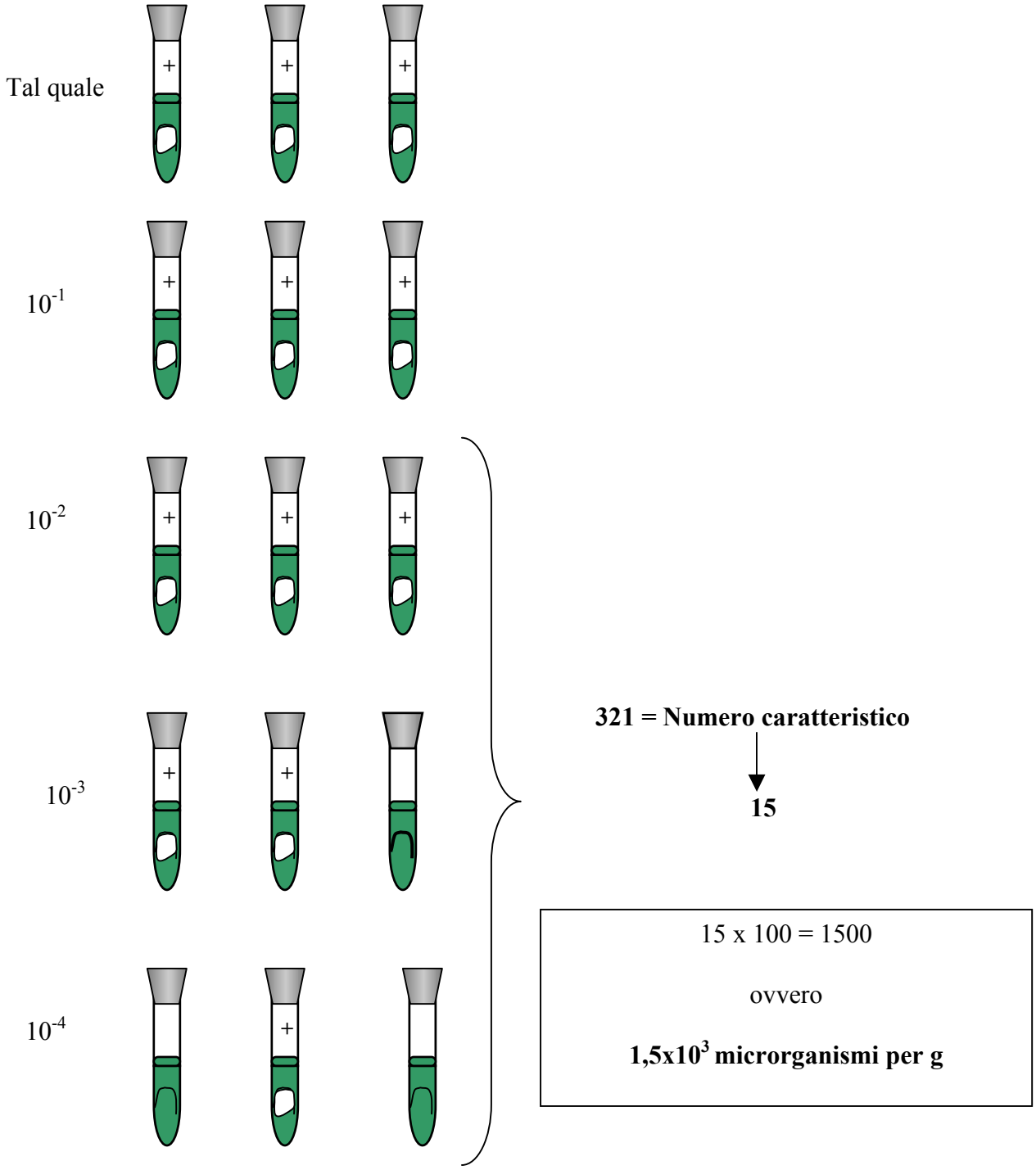


Tabella 1 - Tabella di Mc. Rady

Numero caratteristico	Numero di microbi	Numero caratteristico	Numero di microbi
000	0.0	**222**	3.5
001	0.3	**223**	4.0
010	0.3	**230**	3.0
011	0.6	**231**	3.5
020	0.6	**232**	4.0
100	0.4	**300**	2.5
101	0.7	**301**	4.0
102	1.1	**302**	6.5
110	0.7	**310**	4.5
111	1.1	**311**	7.5
120	1.1	**312**	11.5
121	1.5	**313**	16.0
130	1.6	**320**	9.5
200	0.9	**321**	15.0
201	1.4	**322**	20.0
202	2.0	**323**	30.0
210	1.5	**330**	25.0
211	2.0	**331**	45.0
212	3.0	**332**	110.0
220	2.0	**333**	140.0
221	3.0		

Tutti i terreni colturali, a meno che non siano particolarmente selettivi, devono venire sterilizzati in autoclave prima dell'uso e quando non specificato, le condizioni di sterilizzazione sono 121°C per 15 minuti. Gli ingredienti sono sempre sciolti in acqua distillata, solamente in casi particolari si utilizza acqua di fonte, ma è esplicitamente dichiarato. Tutti i terreni possono essere preparati sia in solido che in liquido: la solidificazione si ottiene, aggiungendo agar in ragione di 15-18g/l.

4. DILUENTI

Sono utilizzati per l'allestimento delle diluizioni decimali, quelli più comuni per l'analisi dei prodotti alimentari sono:

a) SOLUZIONE FISIOLOGICA

NaCl	8,5 g
H_2O	1000 ml
pH = 7	

b) SALE PEPTONE O SALE TRIPTONE

Peptone (o triptone)	1,0 g
NaCl	8,5 g
H_2O	1000 ml
pH = 7	

c) SOLUZIONE DI RINGER 1:4

Sciogliere in 500 ml di acqua distillata una compressa che contiene i seguenti sali:

Na Cl, KCl, $CaCl_2$, $NaHCO_3$ pH = 6,9 ± 7

d) CITRATO DI SODIO AL 2%

E' utilizzato per l'allestimento della prima diluizione e per l'analisi dei formaggi

5. TERRENI COLTURALI

5.1. DETERMINAZIONE DELLA CARICA BATTERICA TOTALE

E' una determinazione che permette di effettuare un valutazione della qualità globale del prodotto (Indice di qualità) e fornisce indicazioni generali sul tempo di conservazione di un dato alimento.

TERRENO AGAR PLATE COUNT (APC)

Triptone	5,0 g	Agar	20,0 g
Estratto di levito	2,5 g	H_2O distillata	1000 ml
Destrosio	1,0 g	pH = 7	

Semina per incorporamento ed incubazione a 30°C per 48 ore. Si contano tutte le colonie cresciute.

5.2. RICERCA DI BATTERI ACETICI

a) TERRENO LIQUIDO DI GAROGLIO

Brodo Malto addizionato di acido acetico glaciale 1% ed alcool etilico buon gusto al 3%. Può essere utilizzato anche come terreno di arricchimento. Incubazione a 28°C in agitazione per 3-4 giorni.

b) TERRENO AL $CaCO_3$

Estratto di lievito	50,0 g	Agar	20,0 g
$CaCO_3$	20,0 g	H_2O distillata	1000 ml

Dopo la sterilizzazione, al momento dell'uso aggiungere a 130 ml di terreno fuso e portato a 45°C, 20 ml di etanolo al 15 %, filtrato sterilmente. Distribuire nelle piastre, mantenendo in agitazione, semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 28-30°C per 5 giorni.

Le colonie di batteri acetici crescono circondate da un alone limpido che rimane tale se si tratta di *Gluconobacter,* mentre nel caso di *Acetobacter,* a seguito della ri-precipitazione del carbonato di calcio intorno alla colonia scompare.

c) TERRENO AL VERDE BROMOCRESOLO

Estratto di lievito	30,0 g	Verde di bromocresolo	10 ml (sol. 2,2%)
Agar	20,0 g	H_2O distillata	1000 ml

Dopo sterilizzazione, al momento dell'uso aggiungere a 65 ml di terreno fuso e portato a 45°C, 10 ml di etanolo al 15 %, filtrato sterilmente. Distribuire nelle piastre, mantenendo in agitazione, semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 28-30°C per 5 giorni. Le colonie di

Gluconobacter fanno virare in modo permanente il colore del terreno da blu a verde o giallo, quelle di *Acetobacter* fanno successivamente ritornare il terreno al colore originario.

d) TERRENO AL LATTATO DI CALCIO

Estratto di lievito	20,0 g	Agar	20,0 g
Lattato di calcio	20,0 g	H_2O distillata	1000 ml

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 25-30°C per 4-5 giorni. Le colonie di *Acetobacter* vengono circondate da un alone di carbonato di calcio insolubile, quelle di *Gluconobacter* invece rimangono sempre senza alone.

5.3. RICERCA DI ENTEROBACTERIACEAE

Si utilizza il tererno Violet Red Bile Destrosio Agar contenente il glucosio come fonte di carbonio, che viene utilizzato da tutte le Enterobacteriaceae.

Estratto di lievito	3,0 g	Destrosio	10,0 g
Peptone	7,0 g	Sali bile n. 3	1,5 g
Rosso neutro	0,03 g	Cristal violetto	0,002 g
NaCl	5,0 g	Agar	15,0 g

pH finale = 7,4

Questo terreno non richiede sterilizzazione, si prepara al momento dell'uso. Semina per incorporamento in doppio strato, incubazione a 37°C per 24 ore.

5.4.1 RICERCA DEI COLIFORMI

La ricerca dei coliformi (indici di qualità e di igiene) negli alimenti può essere effettuata sia in solido che in liquido. Come terreno solido si utilizza il Violet Red Bile Agar, mentre come terreno liquido si utilizza il Brodo Verde Brillante Lattosio Bile 2%.

a) TERRENO VIOLET RED BILE AGAR (VRB agar)

Estratto di lievito	3,0 g	Lattosio	10,0 g	**sostanza differenziale**
Peptone	7,0 g	Sali bile n. 3	1,5 g	**agente selettivo**
Rosso neutro	0,03 g	Cristal violetto	0,002 g	**inibitore altri Gram -**
NaCl	5,0 g	Agar	15,0 g	

pH finale = 7,4

Questo terreno non richiede sterilizzazione e si prepara al momento dell'uso. La semina avviene per incorporamento con doppio strato in Agar VRB e l'incubazione viene effettuata a 37°C per i coliformi totali (indici di pulizia) o a 44°C (indici di contaminazione fecale) per 24 ore. La presenza dei sali di bile (agente selettivo) crea l'ambiente ideale per la crescita di questi microrganismi di origine intestinale, mentre il cristal violetto inibisce la crescita degli altri Gram -. Sono considerati appartenenti ai coliformi solo le colonie che crescono tra i due strati di agar di colore rosso-viola (fermentazione del lattosio e viraggio del rosso-neutro) circondate da un alone violaceo e con un diametro non inferiore a 2 mm.

b) BRODO VERDE BRILLANTE BILE LATTOSIO 2%

Peptone	10,0 g	Verde brillante	0,0139 g
Bile bovina essiccata	20,0 g	Lattosio	10,0 g
H_2O distillata	1000 ml	pH = 7,2	

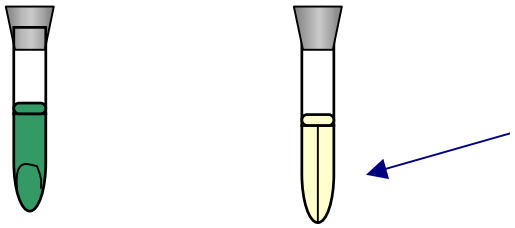
Il terreno è distribuito in ragione di 10 ml in provette contenenti campanella di Durhams, la semina viene effettuata in triplo e l'incubazione avviene con le medesime modalità del VRB. Sono considerate positive le provette dove si osserva intorbidamento e produzione di gas, evidenziata dall'innalzamento della campanella a seguito della fuoriuscita del liquido e l'entrata del gas (CO_2). La lettura si esegue secondo la tecnica del Must Probable Number (MPN).

5.4.2 TEST DI MC. KENZIE

E' un test rapido e semplice per stabilire la presenza di *E. coli*, tipico indice di contaminazione fecale, in un alimento. Dopo che si è osservata crescita in Verde brillante o in VRB trasferire una ansata o una colonia rispettivamente in una provetta di brodo verde brillante bile lattosio 2% contente la campanella di Durham sul fondo ed in una provetta di acqua peptonata, quindi incubare entrambe a 44°C per 24 - 48 ore. *E. coli* crescerà con produzione di gas nella provetta di verde brillante e di indolo (decarbossilazione del triptofano) in acqua peptonata. Qualsiasi altra combinazione di risposta è da ritenere negativa.

La produzione di indolo è evidenziata dalla formazione di un anello rosso-rosa in seguito all'aggiunta di poche gocce del reattivo di Kovacs (Figura 4).

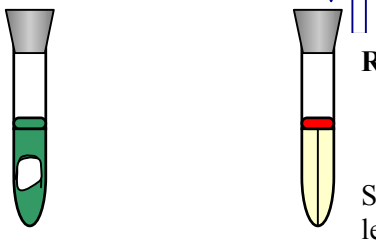
Figura 4 - schema del Test di Mc Kenzie



ACQUA PEPTONATA

Peptone	10,0 g
NaCl	5,0 g
H_20 distillata	1000 ml
pH = 7,2	

44°C per 24 ore



REATTIVO DI KOVAC'S

Alcool isoamilico	150 ml
p-di-metil-amino-benzaldeide	10 g
HCl concentrato	50 ml

Sciogliere l'aldeide nell'alcool, quindi aggiungere lentamente l'acido.

5.5 RICERCA DI *PSEUDOMONAS* SPP.

a) TERRENO DI KING B

Proteose peptone n.3	20,0 g	Glicerolo	10,0 g
K_2HPO_4	1,5 g	Agar	18,0 g
$MgSO_4*7H_2O$	1,5 g	pH = 7,2	

Dopo la sterilizzazione, al momento dell'uso, come agente selettivo, aggiungere penicillina, in ragione di 20 γ/ ml. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 30°C per 48 ore.

b) TERRENO DI KING A

Simile al precedente, si preferisce per la ricerca di *Ps. aeruginosa*, perché permette l'evidenziazione del pigmento blu piocianina, tipico di questa specie.

Bacto peptone	20,0 g	Agar	15,0 g
Glicerolo	10,0 g	H_2O distillata	1000 ml
K_2SO_4	10,0 g	pH = 7,2	
$MgCl_2$	1,4 g		

Dopo la sterilizzazione, al momento dell'uso, aggiungere penicillina in ragione di 20 γ / ml. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 30°C per 48 ore.

c) Ricerca *Ps. aeruginosa* nelle acque

Filtrazione di 250 ml di acqua attraverso membrana sterile con pori diametro 0,2 μm, deporre quindi il filtro su piastra contenente il terreno agar cetrimide che potenzia la produzione della piocianina. Si considerano solo le colonie blu.

AGAR CETRIMIDE:

Triptosio	20,0 g	Agar	15,0 g
$MgCl_2$	1,4,0 g	H_2O distillata	1000 ml
K_2SO_4	10,0 g	pH = 7,2	
Cetrimide	0,3 g		

Incubazione a 30°C per 48 ore.

Si procede poi con prove di conferma riportate nella seguente tabella:

Crescita a 42°C	+
Ossidasi (*) (Soluzione di dimetil-para-fenilendiammina all'1% in acqua distillata)	+
Ossidazione glucosio	+

(*): porre un po' di patina batterica su carta da filtro e coprire con una goccia del reattivo. Il test è considerato positivo se la patina assume entro pochi secondi una colorazione rosso-violacea. La soluzione utilizzata è particolarmente sensibile alla luce ed instabile, va pertanto protetta da ogni fonte luminosa e deve essere preparata al momento dell'uso, e conservata in frigorifero per non più di 24 ore. Questo test permette evidenziare la presenza dell'enzima citocromo-ossidasi, ultimo enzima coinvolto nella catena di trasporto degli elettroni: i microrganismi che danno risposta positiva sono sicuramente aerobi. Questo test è particolarmente utile per distinguere a livello di famiglie i Gram negativi.

5.6 RICERCA DI BATTERI LATTICI

Si tratta di un gruppo microbico vasto ed eterogeneo. A seconda del tipo di batterio lattico considerato e dell'ambiente di provenienza si possono utilizzare vari tipi di terreni.

GENERE	MORFOLOGIA	HABITAT	TERRENO
Lactobacillus	bastoncino	vari	Man Rogosa Sharpe (M.R.S.) M.R.S. variamente modificato S.D.B.A.
Carnobacterium	bastoncino	prodotti poco acidi	M.R.S. pH = 9
Lactococcus	cocchi	latte	M 17
Streptococccus	cocchi	vari	
Pediococcus	cocchi	vegetali	
Leuconostoc	cocchi	vegetali	Terreno di Mayeux
Enterococcus	cocchi	intestino/vegetali	K.E.A. M-enterococcus

- **MAN ROGOSA SHARPE (M. R. S.)**

Terreno generico che consente il recupero indiscriminato di tutti i batteri lattici, eccetto qualche forma estremamente esigente nutrizionalmente. Non ne permette la differenziazione.

Peptone	10,0 g	Sodio acetato $3H_2O$	5,0 g
Estratto lievito	5,0 g	Citrato diammonico	2,0 g
Estratto carne	10,0 g	Soluzione A*	5 ml
Tween 80	1 ml	Agar	18,0 g
Glucosio	20,0 g	Acqua distillata	1000 ml
K_2HPO_4	2,0 g	pH = 6,6	
(*) **Sol. A:**	$MgSO_4$	11,5 g	
	$MnSO_4*4H_2O$	2,4 g	

Sciogliere a caldo e separatamente ciascun sale, quindi miscelarli.

Semina per incorporamento ed incubazione, se non esplicitamente richiesto, in anaerobiosi, a 30°C per 48-72 ore.

Opportunamente modificato questo terreno può diventare selettivo per alcune specie e generi.

- ***Lactobacillus bulgaricus*** (nello yogurt)

Acidificare il terreno MRS, prima di aggiungere l'agar, sino a pH 5.4. Semina per diffusione ed incubazione a 37°C per 72 ore in anaerobiosi (gas pack). Si contano tutte le colonie cresciute.

- ***Lactobacillus acidophilus***

Si prepara un MRS privo di zucchero (MRS identification) e si aggiungono 0,1 g/l di glucosio e 2 g/l di esculina (sciogliere l'esculina in 100 ml di acqua a caldo ed aggiungere a 900 ml di Brodo MRS). Al momento dell'uso aggiungere a 100 ml di terreno fuso e raffreddato a 50°C, 1 ml di una soluzione di citrato ferrico ammonico al 10% sterilizzata per filtrazione.

Semina per incorporamento ed incubazione a 37°C in aerobiosi od anaerobiosi per 48 ore. *L. acidophilus,* essendo in grado di idrolizzare l'esculina, crescerà con caratteristiche colonie lenticolari di color nero.

- ***Lactobacillus casei***

Il terreno MRS identification viene addizionato di gluconato, in ragione di 2g/l, quindi si procede come per *L. acidophilus.*

- ***Carnobacterium* spp.**

Portare, prima dell'aggiunta dell'agar, a pH 9 il terreno MRS. Incubazione in anaerobiosi o anaerobiosi a 30°C per 48 ore.

- ***Bifidobacterium* spp.**

Il terreno MRS agar viene addizionato, al momento dell'uso, una miscela di sostanze inibenti sterilizzata per filtrazione e definita NNL*, in ragione del 5%, Incubazione a 37°C in anaerobiosi per 48 ore.

NNL:	cloruro di litio	6,0 g	
	Acido nalidixico	0,03 g	
	Neomicina solfato	0,2 g	
	Acqua distillata	100 ml	pH = 7,2

- **M 17**

E' utilizzato per il recupero dei cocchi omofermentanti (Streptococchi, Lattococchi e Pediococchi)

Triptone	2,5 g	$MgSO_4*7H_2O$	0,25 g
Peptone	2,5 g	Estratto carne	5,0 g
Peptone di soia	5,0 g	Ac. ascorbico	0,5 g
Estratto lievito	2,5 g	Agar	18,0 g
β-glicerofosfato di Na	19,0 g	Acqua distillata	1000 ml

pH = 7

Al momento dell'uso aggiungere sterilmente, per ogni 100 ml di terreno fuso e tenuto a 50°C, 5 ml di soluzione di lattosio al 10% in acqua (sterilizzata separatamente per filtrazione).
Semina per incorporamento ed incubazione a 30°C per 48 ore.
Per il recupero di *Streptococcus termophilus* l'incubazione è effettuata a 37°C per 48 ore.

- **SOUR DOUGH BACTERIA AGAR (S.D.B.A)**

E' un terreno molto ricco utilizzato per il recupero dei bastoncini lattici dagli impasti acidi, essendo questi molto esigenti nutrizionalmente e particolarmente adattati a questo ambiente.

Maltosio	20, 0 g	Tween 80	0,3 g
Estratto di lievito	3, 0 g	Agar	18,0 g
Triptone	6, 0 g	H_2O fonte	1000 ml
Sol. lievito*	15 ml	pH = 5,6	

(*): sospendere 200 g di lievito compresso in 1 litro di acqua di fonte e sterilizzare a 121°C per 15 minuti; filtrare su carta ed utilizzare il filtrato.
Semina per spatolamento superficiale ed incubazione in anaerobiosi a 37°C per 48-72 ore.

- **TERRENO DI MAYEUX**

Utilizzato per il recupero del genere *Leuconostoc* spp.

Triptone	10,0 g	Gelatina	2,5 g
Estratto di lievito	5 ,0 g	Azide sodio	7,5 ml di una sol all'1%
Saccarosio	100 g	Agar	15,0 g
Citrato di sodio	1,0 g	Acqua distillata	1000 ml
Glucosio	5,0 g		

Piastre per spatolamento superficiale ed incubazione a 20°C per 48 -72 ore.

- **KANAMICINA ESCULINA AZIDE AGAR (KEA)**

E' un terreno utilizzato per il recupero degli enterococchi.

Peptone di caseina	20,0 g	Esculina	1000 ml
Estratto di carne	5,0 g	Citrato triammonico	0,5 g
NaCl	5,0 g	Agar	15,0 g
Kanamicina solfato	0,02 g	pH = 7,1	

Seminare le piastre per spatolamento superficiale ed incubare a 37°C per 48 ore. Considerare solo le colonie nere, circondate da un alone bruno-nero; talvolta giova l'incubazione a 42°C anziché a 37°C.

La ricerca degli Enteroccochi, nelle acque, può essere anche di tipo qualitativo, mediante arricchimento di 100 ml, in tal caso si utilizza il brodo di seguito riportato:

TERRENO DI LITSKY

Triptone	20,0 g	Na azide	0,3 g
Glucosio	5,0 g	Etilvioletto (sol. acq.0,01%)	5 ml
NaCl	5,0 g	H_2O distillata	1000 ml
K_2HPO_4	2,7 g	pH = 7	

Il brodo è preparato a doppia concentrazione e seminato con 100 ml di acqua da analizzare, quindi incubato a 37°C per 48 ore. Se il brodo risulta torbido si prosegue con la prova di conferma che prevede l'utilizzo del seguente terreno solido:

TERRENO DI SLANETZ E BARTLEY

Triptosio	20,0 g	Sodio azide	0,4 g
Estrato lievito	5,0 g	1,2,3 tri-cloruro-trifenil-tetrazolio	0,1 g
Glucosio	2,0 g	Agar	15,0 g
K_2HPO_4	4,0 g	H_2O distillata	1000 ml
pH = 6,6			

Il terreno non richiede sterilizzazione ed è bene prepararlo al momento, deve sempre essere protetto dalla luce. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 37°C per 48 ore.

Su questo terreno gli enterococchi crescono, formando colonie dal rosa al rosso violaceo in funzione della capacità di ridurre l'agente differenziale (1,2,3 tri-cloruro-trifenil-tetrazolio) in esso contenuto.

5.7. RICERCA DI BATTERI MALOLATTICI

- **TERRENO A BASE MOSTO**

Mosto	500 ml	Acqua sino a	1000 ml
Estratto di lievito	5,0 g	Agar	20,0 g
Ac. sorbico o sorbato di K	1,2 g	pH = 4,4-4,8	

a) TERRENO A BASE SUCCO DI POMODORO

Succo di pomodoro*	250 ml	Lattosio	3,0 g
Triptone	20,0 g	Actidione (cicloeximide)	0,1 g
Peptone	5,0 g	H_2O sino a	1000 ml
Estratto di lievito	5,0 g	pH = 5,5	
Glucosio	3,0 g		

Preparazione del succo di pomodoro:

500 ml di pomodoro in scatola vengono aggiunti di 1800 ml di acqua ed il tutto conservato a 4-5°C per 20 ore. Si centrifuga poi a 1000 giri per 10' ed il surnatante si filtra su carta.

b) TERRENO CON ACIDO MALICO

Estratto di lievito	10,0 g	Ac. sorbico o sorbato di K	1,0 g
Peptone	10,0 g	$MgSO_4*7H_2O$	10 mg
Glucosio	5,0 g	NaCl	10 mg
D-L acido malico	10,0 g	$MnSO_4*7H_2O$	10,0 g
Acetato di sodio	10,0 g	$FeSO_4*7H_2O$	0,10 mg
K_2PO_4	10,0 g	pH = 4,3	

Questi terreni così acidi vengono di solito usati liquidi. Nel caso si volessero usare allo stato solido devono venire preparati in concentrazione doppia e solidificati al momento dell'uso con un ugual volume di agar acqua al 4% sterilizzato a parte. L'incubazione di tutti i terreni per malolattici avviene a 25°C per almeno 5 giorni.

5.8. RICERCA DEI CONTAMINANTI NON LATTICI

- **AGAR GELISATO**

Utilizzato per i prodotti caseari (yogurt, formaggi freschi) dove i batteri lattici costituiscono parte della microflora tipica.

Peptone di gelatina	8,0 g
Agar	15, 0 g
Acqua distillata	1000 ml

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 30°C per 48-72 ore

5.9. RICERCA DELLE MICROCOCCACEAE

- **TERRENO DI CHAPMAN**

Estratto di carne	1,0 g	Rosso fenolo	0,025 g
Peptone	10,0 g	Agar	20,0 g
NaCl	75,0 g	H_20 distillata	1000 ml
Mannitolo	10,0 g	pH = 7,4-7,5	

Semina per spatolamento superficiale. Incubazione a 37°C per 48 ore. Su questo terreno le Micrococcaceae formano colonie di colore giallo, a seguito della fermentazione del mannitolo (viraggio del rosso fenolo). Tutti gli altri microrganismi sono inibiti dalla presenza del sale, che invece le Micrococcaceae, essendo osmotolleranti, sopportano bene.

5.10. RICERCA DI STAFILOCOCCHI POTENZIALMENTE PATOGENI

La ricerca può essere effettuata sia mediante arricchimento che per conta diretta.

5.10.1 ARRICCHIMENTO

- **TERRENO DI GIOLITTI E CANTONI**

Triptone	10,0 g	Glicina	1,5 g
Estratto di carne	5,0 g	Sodio piruvato	3,0 g
LiCl inibisce gram-	5,0 g	H_2O distillata.	1000 ml
Mannitolo	20,0 g	pH = 6,5-6,8	
NaCl	5,0 g		

Preparare in doppia concentrazione e distribuire in ragione di 10 ml per provetta. Al momento dell'uso aggiungere 0,3 ml per provetta di terreno di una soluzione acquosa al 3,5% di tellurito di potassio precedentemente sterilizzata per filtrazione; coprire con tappo vaselina dopo la semina ed incubare a 37°C per 48 ore. La semina è effettuata in ragione di 1g (10 ml della diluizione 10^{-1}).
La glicina e il cloruro di litio agiscono da sostanze selettive, perché inibiscono la crescita dei bastoncini gram+, inoltre gli stafilococchi riducono il tellurito di potassio a tellurio, formando un precipitato nero. La conferma è effettuata strisciando un'ansata del brodo annerito su piastre di Petri.

- **TERRENO DI BAIRD-PARKER**

Triptone	10,0 g	Glicina	12,0 g
Estratto di carne	5,0 g	Cloruro di litio	5,0 g
Piruvato di sodio	10,0 g	Agar	20,0 g
Estratto di lievito	1,0 g	pH = 6,8	

Al momento dell'uso aggiungere a 100 ml di terreno 5 ml di una emulsione di rosso d'uovo e di tellurito di potassio opportunamente preparata. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 37°C per 24-48 ore. Gli stafilococchi cresceranno, per gli stessi motivi del precedente terreno, formando colonie nere, inoltre quelli potenzialmente patogeni, in grado di idrolizzare la lecitina formeranno un alone di illimpidimento intorno alla colonia.

5.10.2 CONTA DIRETTA

Si eseguono delle diluizioni decimali del campione sul medesimo terreno utilizzato per la prova di conferma dopo arricchimento in Brodo Giolitti e Cantoni.

5.11. RICERCA DELLE BACILLACEAE

La famiglia delle Bacillaceae comprende il genere aerobio/anaerobio facoltativo *Bacillus* ed il genere anaerobio stretto *Clostridium*: per entrambi è necessario specificare se la ricerca riguarda le forme vegetative oppure le forme sporigene. In questo caso infatti è necessario pastorizzare il prodotto in bagno maria a 80°C per 10 minuti prima di procedere all'analisi.

5.11.1. CONTA DELLE FORME AEROBIE/ANAEROBIE FACOLTATIVE (*Bacillus* spp.)

- **TRYPTIC SOY AGAR (T.S.A.)**

Peptone di caseina	17,0 g	K_2HPO_3	2,5 g
Peptone di soia	3,0 g	Agar	15,0 g
Glucosio	2,5 g	Acqua distillata	1000 ml
NaCl	5,0 g	pH = 7,2	

Semina per incorporamento ed incubazione a 30-37°C per 48 ore.

- **TERRENO PER *BACILLUS CEREUS***

Peptone	1,0 g	KH_2PO_4	0,25 g
Mannitolo	10,0 g	Blubromotimolo	0,12 g
NaCl	2,0 g	Na piruvato	10,0 g
$MgSO_4$	0,1 g	Agar	14,0 g
Na_2HPO_4	2,5 g	pH = 7,2	

aggiungere al terreno fuso e pronto per l'uso, come agente differenziale, 25 ml/l di una emulsione sterile di rosso d'uovo e 2 ml di polimixina B, come agente selettivo. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 37°C per 48 ore. *B*. *cereus*, capace di utilizzare il mannitolo grazie al viraggio del blu bromotimolo, crescerà con colonie blu-turchese con margini sfrangiati ed irregolari.

5.11.2. CONTA DELLE FORME ANAEROBIE

- **REINFORCED CLOSTRIDIAL MEDIUM (R.C.M.)** *Clostridium* spp.

Estratto di lievito	3,0 g	Cisteina cloridrato	0,5 g
Estratto di carne	10,0 g	NaCl	5,0 g
Peptone	1,0 g	Acetato sodio	3,0 g
Amido solubile	1,0 g	Agar	15,0 g
Glucosio	5,0 g	pH = 6,8	

Semina per incorporamento ed incubazione a 30-37°C per 48 ore in anaerobiosi.

In caso di crescita la sicurezza che si tratti proprio di *Clostridium* spp. si può avere verificando la presenza dell'enzima catalasi, assente nei Clostridi anaerobi stretti. A tale scopo le colonie sono bagnate con una goccia di acqua ossigenata al 3%, l'assenza di produzione di bollicine (ossigeno) è indice di risultato negativo.

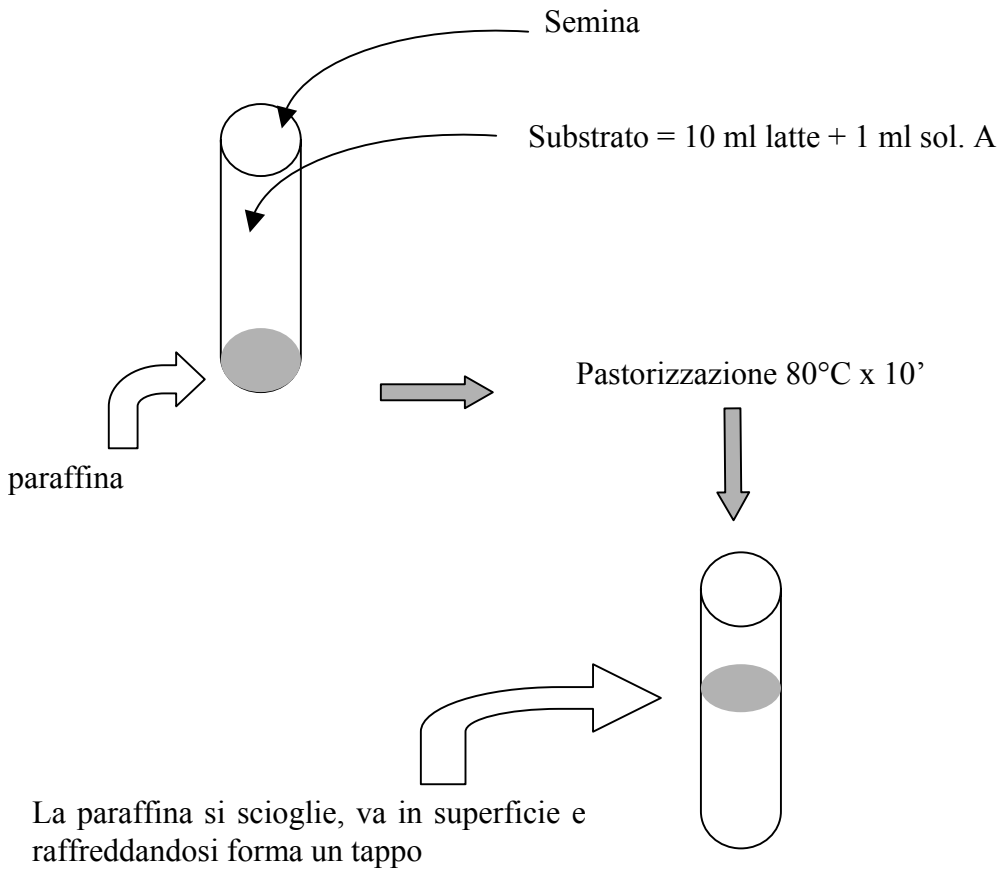
Per evidenziare i clostridi che utilizzano il lattato (Clostridi butirrici) è sufficiente aggiungere al terreno anche 5 g di lattato di sodio, in alternativa si può utilizzare il seguente terreno:

Latte sterile ricostituito 10% + 1 ml di Soluzione A sterile

Soluzione A:	
Lattato di sodio 50%	16.8 ml
Estratto di lievito	5 g
Acetato di sodio	5 g
Acqua distillata	100 ml

Questo brodo è distribuito in ragione di 10 ml in provette precedentemente sterilizzate e contenenti sul fondo un fondello (1-2 ml) di paraffina (6 parti + 1 parte). Le provette sono quindi seminate con le diluizioni scelte e poste a pastorizzare a 80°C per 10 minuti.
Questo trattamento termico permette al fondello di paraffina di sciogliersi e di venire in superficie, l'immediato raffreddamento consente la formazione di un tappo superficiale che creerà anaerobiosi (figura 5).

Figura 5 - Metodo di semina per il recupero di Clostridi butirrici.



- **TERRENO DI ANGELOTTI (S.P.S.)**

Utilizzato per la ricerca e numerazione dei clostridi solfito riduttori

Triptosio	15,0 g	Metabisolfito di sodio	1,0g
Peptone soia	5,0 g	Citrato ferrico ammonico	1,0 g
Estratto carne	5,0 g	Agar	15,0 g
Polimixina B	2 ml (sol 0,1%)	Sulfametazina sodica	0,2 ml (sol.1,2%)

Distribuire in provette in ragione di 10 ml ciascuna e seminare in alto strato; l'anaerobiosi è assicurata da un tappo di paraffina o di agar acqua.

Incubazione a 37°C per 48 ore. Su questo terreno, grazie alla presenza degli agenti selettivi (polimixina e sulfametazina)che inibiscono gli altri gram+, i Clostridi solfito riduttori crescono con colonie nere immerse nell'agar e con produzione di gas, evidenziata da spaccature del terreno e dall'innalzamento del tappo di paraffina. Se l'incubazione avviene a 44°C, le colonie nere con gas appartengono presumibilmente alla specie *Cl. perfringens,* in tal caso si procede con prove di conferma di tipo biochimico.

- **RCM MODIFICATO**

Utilizzato in alternativa al precedente per il recupero dei Clostridi solfito riduttori (senza agar può essere usato come terreno liquido)

Estratto levito	3,0 g	Cisteina cloridrato	0,5 g
Estratto carne	10,0 g	NaCl	5,0 g
Peptone	10,0 g	Sodio acetato	3,0 g
Glucosio	5,0 g	Agar	15,0 g
Amido solubile	1,0 g	pH = 6,8	

Al momento dell'uso aggiungere per ogni 100 ml di terreno sterile fuso e mantenuto a 45°C:

- 10 ml di una soluzione di Na solfito al 6,25% in acqua
- 40 gocce di una soluzione di allume ferrico al 5% in acqua

Semina per incorporamento ed incubazione in anaerobiosi a 37°C per 48 ore.

Nelle acque, la ricerca dei clostridi solfito riduttori (indici di contaminazione fecale) è di tipo qualitativo, presenza o assenza in 100 ml:

Filtrare sterilmente (diametro pori=0,22 μm) 100 ml acqua pastorizzata a 80°C x 10', quindi deporre la membrana su terreno per anaerobi, contenente Na_2SO_4 ed allume ferrico.
Incubazione a 37°C x 18 ore in anaerobiosi. Sono da considerare solo le colonie nere che devono essere isolate e strisciate su terreno di Willis.

5.12. RICERCA DI *SALMONELLA* SPP.

La Ricerca delle Salmonelle negli alimenti non è mai una conta, ma una valutazione di PRESENZA/ASSENZA in una stabilita quantità di alimento (25g o ml).
Il metodo classico (Gazzetta Ufficiale 346 del 13/12/1978) consta di quattro fasi:

1. Fase di prearricchimento
2. Fase di arricchimento selettivo
3. Fase di conferma su terreno selettivo e differenziale
4. Prove di conferma

PREARRICCHIMENTO (37°C per 24 ore).

- Acqua peptonata tamponata a pH 7.
- Latte scremato sterile + verde brillante 0,02% per il cacao e derivati

ARRICCHIMENTO SELETTIVO

Trasferimento di 1 o 0,1 ml di pre-arricchimento in uno o più brodi contenenti sostanze selettive che favoriscono la crescita di microrganismi di tipo intestinale.

- Brodo Selenito Cistina 37°C per 24 - 48 ore
- Brodo Rappaport Vassidialis
- Brodo Tetrationato Novobiocina

} 42°C per 24 - 48 ore

CONFERMA

Consiste in uno striscio su terreno selettivo differenziale.

- Desossicolato Citrato Lattosio Agar
- Bismuto Sulfite Agar
- Verde Brillante Agar
- Rambach
- Salmonella Shigella Agar

37°C per 24 ore

RICONOSCIMENTO COLONIE SOSPETTE

- Test sierologico agglutinazione con siero polivalente
- Prove biochimiche API Test
- Tipizzazione fagica

Composizione dei terreni:

- **ACQUA PEPTONATA TAMPONATA**

Peptone	10,0 g	KH_2PO_4	1500 ml
NaCl	5,0 g	H_20 distillata	1000 ml
$Na_2HPO_4*1H_2O$	9,0 g	pH = 7,2	

- **LATTE SCREMATO**

  Latte scremato sterile + verde brillante 0,02% solo per cacao e derivati

Entrambi si distribuiscono 225 ml per beuta e dopo sterilizzazione viene seminato con 25 g di campione pesato sterilmente.

- **BRODO SELENITE CISTINA**

Peptone	4,0 g	Na_2HPO_4	5,0 g
Lattosio	4,0 g	KH_2PO_4	5,0 g
Selenito di sodio	5,0 g	H_2O distillata	1000 ml
pH = 6,9			

Si distribuisce 90 ml per beuta e non si sterilizza. La semina avviene in ragione di 1:10.

Questo brodo oggi è poco usato nei laboratori di analisi, poiché contiene il selenito, sostanza altamente tossica, che ha problemi di smaltimento, per questo motivo si preferisce l'impiego di altri brodi selettivi.

- **BRODO TETRATIONATO**

Estratto carne	0,9 g	$CaCO_3$	25,0 g
Peptone	4,5 g	Tiosolfato di sodio	40,7 g
Estratto lievito	1,8 g	Bile essiccata	4,7 g
NaCl	4,5 g	H_2O distillata	1000 ml
pH = 7,4-7,6			

Distribuire 100 ml per beuta. Al momento dell'uso unire ad ogni 100 ml, 1,9 ml di soluzione iodoiodurata (200 g I_2+250 g KI) +1 ml sol. Verde brillante. La semina avviene in ragione di 1:10 (1 ml di prearricchimento in 10 ml).

- **RAPPAPORT VASSILIADIS**

Peptone di soia	5,0 g	Verde malachite	0,04 g
NaCl	8,0 g	H_2O distillata	1000 ml
K_2PO_4	1,6 g	pH = 5,2±0,2	
$MgCl_2$	40,0 g		

Distribuire 10 ml per provetta. Si tratta di un terreno molto selettivo, pertanto a differenza dei brodi precedenti viene seminato in ragione di 1:100 (0.1 ml di prearricchimento in 100 ml).

- **SALMONELLA SHIGELLA AGAR**

Estratto di carne	5,0 g	Citrato ferro	1,0 g
Proteose-peptone	5,0 g	Verde brillante	0,00033 g
Lattosio	10,0 g	Rosso neutro	0,025 g
Sali biliari	8,5 g	Agar	18,0 g
Tiosolfato di sodio	8,5 g	H_2O distillata	1000 ml
pH = 7			

Non si sterilizza. Salmonella cresce formando caratteristiche colonie piccole diafane (lattosio negative) talvolta con centro nero (produzione di H_2S).

Per la ricerca delle Shigelle si procede come per *Salmonella* spp. in quanto presentano le stesse caratteristiche colturali. La differenziazione avviene solo alla fine a livello di genere con i numerosi Kit oggi in commercio.

5.13. 1. RICERCA DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

La ricerca si esegue mediante metodica di arricchimento, che prevede i seguenti passaggi:

1. Fase di prearricchimento
2. Fase di arricchimento
3.Fase di conferma su terreno selettivo e differenziale
4. Identificazione

PREARRICCHIMENTO

25 g di campione sono posti sterilmente in 225 ml di terreno Tryptic Soy Broth (TSB) ed incubati a 4°C per 7-14-21 giorni; oppure posti in terreno Yeast Extract Rose Bengala Broth (YER) ed incubati a 10°C per 5 giorni.

ARRICCHIMENTO SELETTIVO

0,1 ml di prearricchimento sono trasferiti sterilmente in 10 ml di Rappaport e Brodo Selenito ed incubati a 22°C per 4 giorni. (Per la composizione degli arricchimenti si rimanda ai terreni per la ricerca di *Salmonella* spp.).

CONFERMA

Striscio su terreno selettivo differenziale Celfusodin-Irgasan- novobiocina agar (CIN) (25°C per 24-48 ore).

IDENTIFICAZIONE

Le colonie che su questo terreno selettivo e differenziale si presentano di colore rosso scuro con bordo bianco (occhio di bue) sono sottoposte alle seguenti prove:

- Crescita in Triple Sugar Iron (TSI)
- Idrolisi dell'urea
- Mobilità: tipico di *Yersinia enterocolitica* è di risultare mobile a seconda della temperatura di incubazione, è mobile a temperature inferiori a 30°C ed immobile a 37°C.
- Prove biochimiche : API test

Composizione dei terreni :

- **TRIPTIC SOY BROTH (TSB)**

Triptone	17,0 g	Cloruro di sodio	5,0 g
Soitone	3,0 g	Dipotassio fosfato	2,5 g
Destrosio	2,5 g	H_2O distillata	1000 ml
pH = 7,3			

- **YEAST EXTRACT ROSE BENGALA BROTH (YER)**

Fosfato bisodico eptaidrato	17,25 g	Sali di bile	2,0 g
Estratto di lievito	5,0 g	Cloruro di sodio	1,0 g
Solfato di magnesio eptaidrato	0,01 g	H_2O distillata	1000 ml
pH = 7,9			

Dopo sterilizzazione si aggiunge al momento dell'uso:

Sorosio 4%	100 ml
Piruvato di sodio	100 ml
Rosso bengala 4 mg/ml	10 ml

Sterilizzati per filtrazione amicrobica.

- **CELFUSODIN-IRGASAN-NOVOBIOCINA AGAR (CIN)**

Estratto di lievito	2,0 g	Sodio piruvato	2,0 g
Peptone	17,0 g	Sodio colato	0,5 g
Proteose peptone	3,0 g	Rosso neutro	30 mg
Mannitolo	20,0 g	Cristal violetto	1 mg
Sodio desossicolato	0,5 g	Irgasan	4 mg
Solfato di magnesio eptaidrato	10 mg	Agar	13,5 g
Sodio cloruro	1,0 g	H_2O distillata	1000 ml

Si sterilizza a 121°C per 20 minuti, dopodiché si aggiunge il supplemento contenente antibiotici (celfusodina e novobiocina).

Si semina per spatolamento superficiale e si incuba 25°C per 24-48 ore.

- **TRIPLE SUGAR IRON AGAR (TSI)**

Estratto di carne	3,0 g	Destrosio	1,0 g
Estratto di lievito	3,0 g	Citrato ferrico	0,3 g
Peptone	20,0 g	Sodio tiosolfato	0,3 g

Cloruro di sodio	5,0 g	Rosso fenolo	tracce
Lattosio	10,0 g	Agar	12,0 g
Saccarosio	10,0 g	H_2O distillata	1000 ml
pH =7,4			

Si sterilizza a 121°C per 20 minuti. Si semina per infissione e striscio superficiale, e si incuba a 37°C per 24 ore.

- **TERRENO PER L'IDROLISI DELL'UREA**

Peptone	1,0 g	Fosfato bisodico	1,2 g
Destrosio	1,0 g	Rosso fenolo	tracce
Cloruro di sodio	5,0 g	Agar	15,0 g
Fosfato acido di potassio	0,8 g	H_2O distillata	1000 ml
pH = 6,8			

Dopo sterilizzazione, al momento dell'uso aggiungere a 95 ml di terreno fuso portato a 45°C, 0,5 ml di soluzione di urea al 20 %. I ceppi di *Yersinia enterocolitica* risultano urea positivi (il terreno vira dal giallo al fucsia).

5.13.2. VALUTAZIONE DELLA POTENZIALE PATOGENICITA' DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

La virulenza dei ceppi di *Yersinia enterocolitica* viene valutata attraverso le seguenti prove:

a) Analisi della Ca^{++} dipendenza

Il terreno utilizzato è **Magnesio-Ossalato-Medium**, avente la seguente composizione:

Blood Agar Base (BBL)	40 g
H_2O distillata	830 ml

Dopo sterilizzazione, si aggiungono le seguenti soluzioni sterilizzate per filtrazione:

Cloruro di magnesio (23,8 g/l)	80 ml
Ossalato di sodio (33,5 g/l)	80 ml
Glucosio (180,2 g/l)	10 ml

Per ogni ceppo si inocula con 0,1 ml di sospensione batterica 2 piastre, una viene successivamente incubata a 26°C e l'altra a 37°C. Si osservano le colonie dopo 2-3 giorni. I ceppi che crescono a 26°C in maniera confluente e a 37°C presentano solo 10-100 colonie per piastra, sono Ca^{++} dipententi, perciò sospetti di virulenza.

b) Prova di autoagglutinazione

Il terreno utilizzato è detto RPMI-1640, con aggiunta del 10% di siero fetale di vitello e di HERPES sino ad una concentrazione finale di 25 mM (acido N-2-idrossietil-piperazina-N-2-etansulfonico) distribuito in una doppia serie di provette in ragione di 2 ml ciascuna. Una serie è incubata a 26°C e l'altra a 37°C, entrambe per 18 ore.

Si osserva la crescita: i ceppi virulenti crescono dando torbidità uniforme a 26°C e una pellicola di agglutinazione sul fondo, con surnatante limpido a 37°C.

I ceppi avirulenti crescono dando torpidità uniforme sia a 26°C che a 37°C, a volte però ceppi che crescono con colonie rugose danno agglutinazione spontanea sia a 26°C che a 37°C.

c) Attività pirazinamidasica

Per il test si utilizza un terreno costituito da:

TSA (Triptic soy agar)	30 g	
Estratto di lievito	3 g	
Pirazina-carboxamide	1 g	
Tampone tris-maleato pH =6	0.2 M	1000 ml

Il terreno è posto in provette, sterilizzato a 121°C per 20 minuti e raffreddato sottoforma di slant.

I ceppi da testare sono fatti crescere su TSA per una notte, seminati sugli slant e incubati per 48 ore a 25-30 °C, dopodiché la coltura cresciuta è trattata con una soluzione acquosa all'11% di solfato di ammonio ferroso preparata di fresco. Dopo 15 minuti si effettua la lettura del test: questo si considera positivo se compare una colorazione rosa dovuta alla presenza di acido pirazinoico, e negativo se il colore non cambia.

d) Fermentazione di salicina, esculina, ramnosio, saccarosio

Si utilizza il terreno **Andrade Peptone water**

Peptone	10,0 g
Cloruro di sodio	5,0 g
Indicatore Andrade	0,1 g
H_20 distillata	1000 ml

che viene posto in provette (4,5 ml per provetta), sterilizzato a 121°c per 20 minuti ed addizionato di 0,5 ml della soluzione di zucchero al 10%. Si considera positivo il risultato quando si ha la comparsa di una colorazione rosa, nelle provette incubate a 25°C per 2-3 giorni.

5.14. RICERCA DI *LISTERIA* SPP.

Anche per Listeria si esegue una ricerca qualitativa in 25 g di prodotto. I passaggi sono:

- Pre-arricchimento selettivo
- Arricchimento selettivo
- Prova di conferma in terreni differenziali e selettivi
- Prove di identificazione

PRE-ARRICCHIMENTO SELETTIVO

25 g di campione sono posti sterilmente in 225 ml di terreno di Fraser ½ concentrazione, incubazione a 30°C per 24 ore.

ARRICCHIMENTO SELETTIVO

Trasferimento di 1 ml di prearricchimento in 10 ml di Fraser a concentrazione normale, incubazione a 37°C per 48 ore.

CONFERMA

In caso di annerimento della brodocoltura striscio sui terreni selettivi differenziali Palcam ed ALOA (30°C per 48-72 ore)

IDENTIFICAZIONE

Prove di identificazione delle colonie caratteristiche per accertare l'appartenenza alla specie *L. monocytogenes*.

Composizione dei Terreni:

- **TERRENO DI FRASER BASE**

Proteose peptone	5,0 g	Na_2HPO_4	12,0 g
Peptone di caseina	5,0 g	KH_2PO_4	1,35g
Estratto di lievito	5,0 g	Esculina	1,0 g
Estratto di carne	5,0 g	LiCl	3,0 g
NaCl	20,0 g	H_2O distillata	1000 ml
pH= 7,2			

Al momento dell'uso aggiunger come agenti selettivi una soluzione acquosa di citrato ferrico ammonico (500 mg) ed un supplemento selettivo costituito da acriflavina (12,5 mg) ed ac. nalidixico (10 mg). Entrambe queste sostanze sono già pronte ad esatta concentrazione e devono

solo essere riprese con 1 ml di acqua distillata sterile Per le quantità da aggiungere vedi tabella seguente:

	½ Frase	Fraser
Brodo Fraser base	1000 ml	1000 ml
Soluzione di citrato di ammonio	1 ml	1 ml
Soluzione supplemento selettivo	1 ml	2 ml

- **TERRENO DI PALCAM**

Peptone	23,0 g	Esculina	0,5 g
Amido	1,0 g	Glucosio	0,5 g
NaCl	5,0 g	Litio cloruro	15,0 g
D-mannitolo	10,0 g	Agar	15,0 g
Citrato ferrico ammonico	0,5 g	H_2O distillata	1000 ml

Al terreno sterilizzato aggiungere al momento dell'uso, dopo fusione e raffreddamento a 48°C il supplemento selettivo costituito da:

Polimixina B	0,005 g	Ceftazidina	0,01 g
Rosso fenolo	0,08 g	Acriflavina	0,0025 g

Incubazione a 30°C per 48-72 ore. Le colonie del genere *Listeria* appaiono come caratteristiche colonie circolari di colore grigio metallo con centro più scuro e leggermente sprofondato (ombelicale) circondate da un alone bruno.

- **TERRENO ALOA**

Agar base:

Peptone di carne	18,0 g	Magnesio glicerofosfato	1,0 g
Triptone	6,0 g	Magnesio solfato	0,5 g
Estratto di lievito	10,0 g	Cloruro di sodio	5,0 g
Piruvato di sodio	2,0 g	Cloruro di litio	10,0 g
Glucosio	2,0 g	Agar	18,0 g
Disodio idrogeno fosfato anidro	2,5 g	H_2O distillata	930 ml

5-bromo-4-cloro-3-indolo-β-D-glucopiranoside 0,05 g

pH = 7,2

Al terreno sterilizzato aggiungere al momento dell'uso, dopo fusione e raffreddamento a 48°C:

5 ml di soluzione di Acido Nalidixico:

Acido Nalidixico sale di sodio	0,02 g
H_2O distillata	5 ml

Dissolvere l'acido nalidixico sale di sodio in acqua e sterilizzare per filtrazione.

5 ml di soluzione di Ceftazidime:

Ceftazidime	0,02 g
H_2O distillata	5 ml

Dissolvere la Ceftazidime in acqua e sterilizzare per filtrazione.

5 ml di soluzione di Polimixina B:

Polimixina B solfato	76700 U
H_2O distillata	5 ml

Dissolvere la Polimixina B in acqua e sterilizzare per filtrazione.

5 ml di soluzione di Cicloeximide:

Cicloeximide	0,05 g
Etanolo	2,5 ml
H_2O distillata	2,5 ml

Dissolvere la cicloeximide in 2,5 ml di etanolo e in seguito aggiungere 2,5 ml di acqua, poi sterilizzare per filtrazione.

50 ml di soluzione di arricchimento:

Dissolvere 2 g di L-α-fosfatidilinositolo in 50 ml di acqua distillata fredda. Agitare per circa 30 minuti fino ad ottenere una sospensione omogenea. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Aggiungere a terreno previo raffreddamento a 48-50°C.

Incubazione a 35-37°C per 24 ore. Le colonie del genere *Listeria* appaiono come caratteristiche colonie verdi-blu circondate da un alone opaco.

Le colonie con morfologia caratteristica saranno isolate e dopo controllo al microscopio della purezza e della caratteristica mobilità (movimento rototraslatorio) sono sottoposte a prove biochimiche di identificazione.

Prove di identificazione per la specie *L. monocytogenes*

	L. monocytogenes	*L. innocua*	*L .seeligeri*	*L. welshimeri*
Fermentazione xilosio	-	-	+	+
Fermentazione di: ramnosio	+	-/+	-	-/+
β-Emolisi	+	-	+	-
CAMP test				
St. aureus	+	-	+	-
R. equi	-/+	-	-	-

Tutte queste prove ed altre, sempre di tipo biochimico sono racchiuse nel kit Api Listeria Biomeriaux, che consentono facilmente la diagnosi di specie. In alternativa le colonie sospette possono venire identificate con sistemi di analisi immunoenzimatico o con sonde genetiche.

Ricerca di *Listeria* spp. mediante conta diretta in terreno selettivo: eseguire le piastre con le diluizioni ritenute necessarie direttamente sul terreno selettivo differenziale Palcam o ALOA con il metodo delle piastre per spatolamento superficiale, incubare a 30°C per 2-4 giorni. . Procedere, in presenza delle caratteristiche colonie , alla identificazione della specie *L. monocytogenes*

Se si preferisce la conta diretta in terreno liquido, effettuare diluizioni decimali seminando in triplice serie il terreno di Fraser. Lettura col MPN delle provette annerite e striscio di conferma su piastre di terreno selettivo differenziale Palcam od ALOA. Il numero di ufc/g di *Listeria* spp verrà conteggiato mantenendo il sistema dell'MPN.

5.15. RICERCA DI BATTERI PROPIONICI

- **TERRENO DI POLITI-HETTINGA**

Brodo di carne	1000 ml	Lattato sodico al 70%	10,0 g
Estratto di lievito	10,0 g	Agar	15,0 g

(2-β-fenil-etanolo 10 ml di una soluzione all'1% per inibire i coliformi se si suppone la loro presenza)

pH = 7

Semina per spatolamento superficiale vengono incubate in anaerobiosi a 30°C per 6-7 giorni. Su questio terreno i batteri proponici crescono con caratteristiche colonie di colore bruno.

- **TERRENO YELA**

Estratto di lievito	1%	$MgSO_4*7H_2O$	0,005%
Lattato di sodio	1%	Tripticase	1%
K_2HPO_4	0,025%	Agar	2%
pH = 7			

Incubazione 30°C per 5-7 giorni in anaerobiosi.

5.16. RICERCA DEI VIBRIONI

Per vibrioni alofili ed alotolleranti dalle salamoie

- **AGAR SACCAROSIO SALE**:

Triptosio	15,0 g	Bromocresolporpora	0,025 g
Estratto di carne	3,0 g	Agar	15,0 g
NaCl	60,0 g	H_2O distillata	1000 ml
Estratto di lievito	3,0 g	pH = 7	

Semina per diffusione ed incubazione a 20°C per 48-72 ore. I vibrioni alofili si sviluppano, a seguito della fermentazione del saccarosio, sotto forma di colonie gialle.

- **RICERCA DI *VIBRIO PARAHAEMOLITYCUS***

Questo microrganismo può essere ricercato mediante conta diretta o previo arricchimento.

a) Ricerca diretta

- **AGAR BTB**

Peptone	10,0 g	Blu di bromotimolo	0,04 g
Estratto di carne	3,0 g	Blu di timolo	0,04 g
NaCl	40,0 g	Teepol (o Na-laurilsolfato)	2,0 g
Saccarosio	20,0 g	Agar	15,0 g
PH = 9			

- **AGAR TCBS**

Estratto di lievito	5,0 g	Saccarosio	20,0 g
Peptone	10,0 g	Bile essiccata	5,0 g
Citrato di Na	10,0 g	Blu timolo	0,04 g
NaCl	10,0 g	Blu di bromotimolo	0,04 g
Sodio colato	5,0 g	Agar	15,0 g
H_2O distillata	1000 ml	pH = 8,6	

Semina indifferentemente per spatolamento superficiale o per diffusione. Dopo 18-24 ore di incubazione a 37°C i ceppi di *V. parahaemolitycus* patogeni si presentano sotto forma di colonie rotonde di diametro 2-3 mm verdi o blu. I vibrioni non patogeni danno colonie più grandi, gialle o verdi con centro blu a seconda della capacità di fermentare saccarosio.

b) ARRICCHIMENTO

- **Brodo salato alla colistina**

Estratto di lievito	3,0 g	Metasolfonato di colistina	500μg/ml
Peptone	10,0 g	H_2O distillata 1000 ml	
NaCl	20,0 g	pH = 7,2	

- **Brodo glucosato salato al Teepol**

Peptone	10,0 g	Metilvioletto	0,002 g
Estratto di carne	3,0 g	Teepol	4,0 g
NaCl	20,0 g	H_2O distillata	1000 ml
Glucosio	5,0 g	pH = 8,2	

La prova di conferma viene effettuata nei terreni solidi prima descritti.

5.18. 1. TERRENI PER EUMICETI TOTALI

Per la ricerca di queste forme microbiche sono disponibili vari terreni, quelli più comuni sono:

- **AGAR ALL'INFUSO DI MALTO CONTENENTE 1,8% DI AGAR pH 5,5**

a) Preparazione dell'infuso di malto

Sospendere 100 g di orzo ogni 1000 cc di acqua di fonte e porre a 55°C per 5 ore, quindi filtrare su carta da filro rapida, portare il pH a 5,4-5,8 e sterilizzare a 1,5 atm per 1,5 ore. L'infuso così preparato viene conservato a temperatura ambiente ed utilizzato ogni volta che si vuole preparare il terreno al malto.

b) Preparazione del terreno al malto

Filtrare l'infuso con caltra da filtro rapida quindi controllare il pH (5,4-5,8) ed eventualmente aggiungere l'agar (18 g/l) e sterilizzare. Il terreno viene posto in piastra in quanto la semina è effettuata per spatolamento; incubazione a 25-30°C per 5-7 giorni.

Esiste un terreno Agar malto, commercializzato da varie ditte, la sua capacità di recupero, rispetto a quello preparato in laboratorio è però leggermente inferiore.

- **AGAR PATATA**

Porre 200g di patata sbucciata e lavata in 1200 cc di acqua di fonte, portare ad ebollizione per 45 minuti quindi aggiungere 20 g di glucosio e 18 g di Agar.

- **YEAST GLUCOSE CLORAMFENICOLO**

Estratto lievito	5,0 g	Agar	18,0 g
Glucosio	10,0 g	H_2O distillata	1000 ml
Cloramfenicolo	0,1 g		

Il pH viene portato a 5,5 dopo la sterilizzazione mediante aggiunta di una soluzione al 10% di ac. tartarico al 10% sterilizzata a parte (5 ml per 100 ml di terreno). Le piastre vengono allestite per spatolamento superficiale ed incubate generalmente a 25°C per 5-7 giorni. Per i lieviti, che sono anaerobi facoltativi le piastre possono essere allestite anche per incorporamento

Per limitare lo sviluppo di colonie di muffe si può aggiungere al terreno di coltura una sol. di rosa bengala, 35 ppm al massimo.

5.18.2. EUMICETI OSMOFILI

- **MY40**

Per il recupero delle forme osmofile ed osmotolleranti

Estratto di malto in polvere	20,0 g	Agar	15,0 g
Estratto di lievito	5,0 g	H_2Odistillata	1000 ml
Saccarosio	400,0 g		

In questo caso è bene anche aggiungere un 20% di saccarosio al diluente in cui si preparano le diluizioni decimali da piastrare per evitare shock osmotici.

5.18.3. RICERCA DI GRUPPI SPECIFICI

- ***ASPERGILLUS FLAVUS* AGAR MEDIUM (ADM)**

Utilizzato per la ricerca presuntiva di aspergilli del gruppo *flavus*

Estratto di lievito	20,0 g	Agar	15,0 g
Peptone	10,0 g	H_2O distillata	1000 ml
Ferro ammonio citrato	0,5 g	pH = 5,6	
Cloramfenicolo	0,1 g		

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 25-30°C per 3-5 giorni..*Aspergillus flavus* crescerà con caratteristiche colonie con fondo arancio.

- **DICHLORAN CLORAMFENICOLO MALTO AGAR**

Utilizzato per il recupero di *Alternaria* spp.

Estratto di malto in polvere	10,0 g	Agar	15,0 g
Dichloran (0,2% in etanolo)	1 ml	Acqua distillata	1000 ml
Cloramfenicolo	0,1 g		

- **CZAPEK DOX IPRODIONE DICHLORAN AGAR**

per la ricerca delle muffe del genere *Fusarium*

Czapek dox brododifco	35,0 g	Cloramfenicolo	0,05 g
$CuSO_4*5H_20$	0,005 g	Agar	20,0 g
$ZnSO_4*7H_20$	0,01 g	H_2Odistillata	1000 ml
Dichloran (0,2% in etanolo)	1 ml		

Al terreno pronto per l'uso aggiungere 10 ml di una soluzione allo 0,5% di clorotetraciclina ed 1 ml di iprodione in sospensione (0,3 di iprodione in 50 ml di acqua sterile). Semina per striscio superficiale ed incubazione a 25-30°C. Seguire giornalmente la crescita, osservando al microscopio a piccolo ingrandimento la formazione delle varie strutture miceliari.