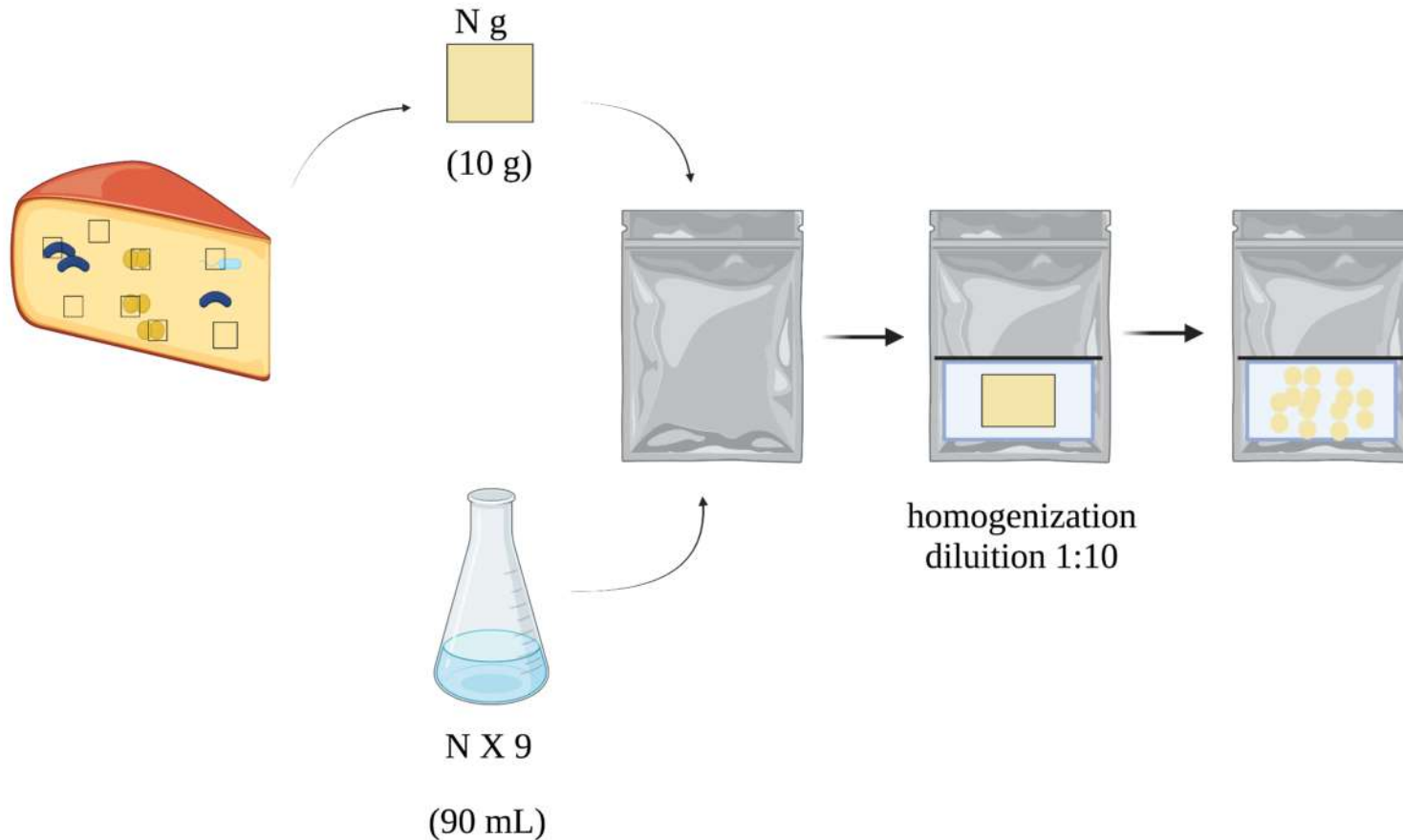


# Procedura di preparazione del campione per l'analisi

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



# Procedura di preparazione del campione per l'analisi

**Preparazione dell'omogenato o diluizione madre.** L'aliquota di campione destinata alla preparazione dell'omogenato deve essere sufficientemente grande in modo da essere rappresentativa della complessa composizione microbica del campione. In genere vengono omogenati da un minimo di 10 g ad un massimo di 40 g.

L'omogenato del campione alimentare viene preparato diluendolo nel rapporto 1:10 in un adatto diluente.

Tale sospensione-diluizione, detta anche diluizione madre, usualmente viene realizzata aggiungendo **N X 9** ml di diluente a **N g** di campione.

ES:

10 grams of sample in 90 mL of buffer

11 grams of sample in 99 mL of buffer

14 grams of sample in 126 mL of buffer

25 grams of sample in 225 mL of buffer

etc....

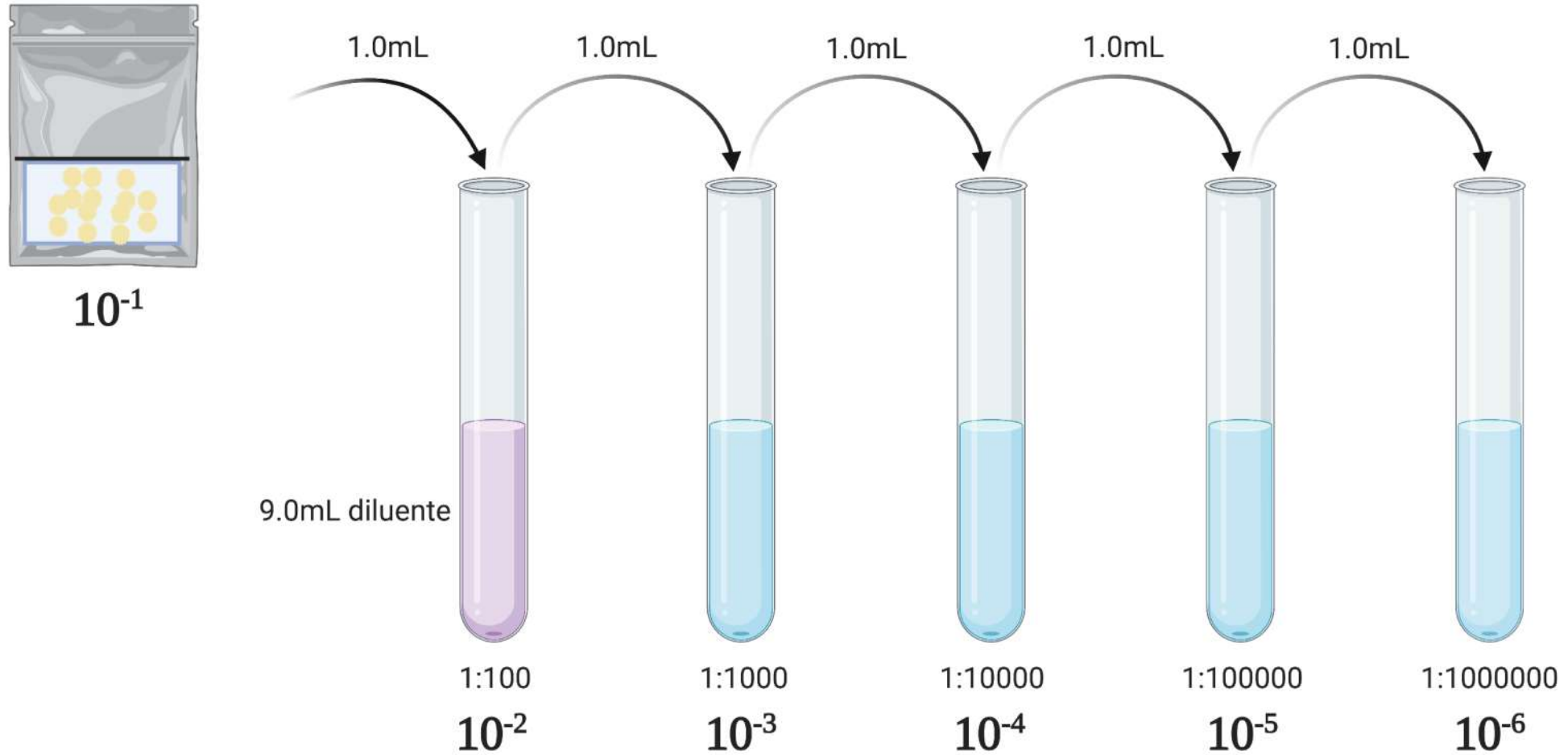
## Preparazione delle diluizioni decimali seriali

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

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

Utilizzare sempre una nuova pipetta per ogni diluizione da realizzare.

# Preparazione delle diluizioni decimali seriali



# Tecniche di semina delle piastre

E' necessario trasferire loro aliquote sul o nell'adatto terreno nutritivo.

Tali aliquote in genere sono di 1 ml o di 0,1 ml in funzione del metodo di inoculo utilizzato.

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

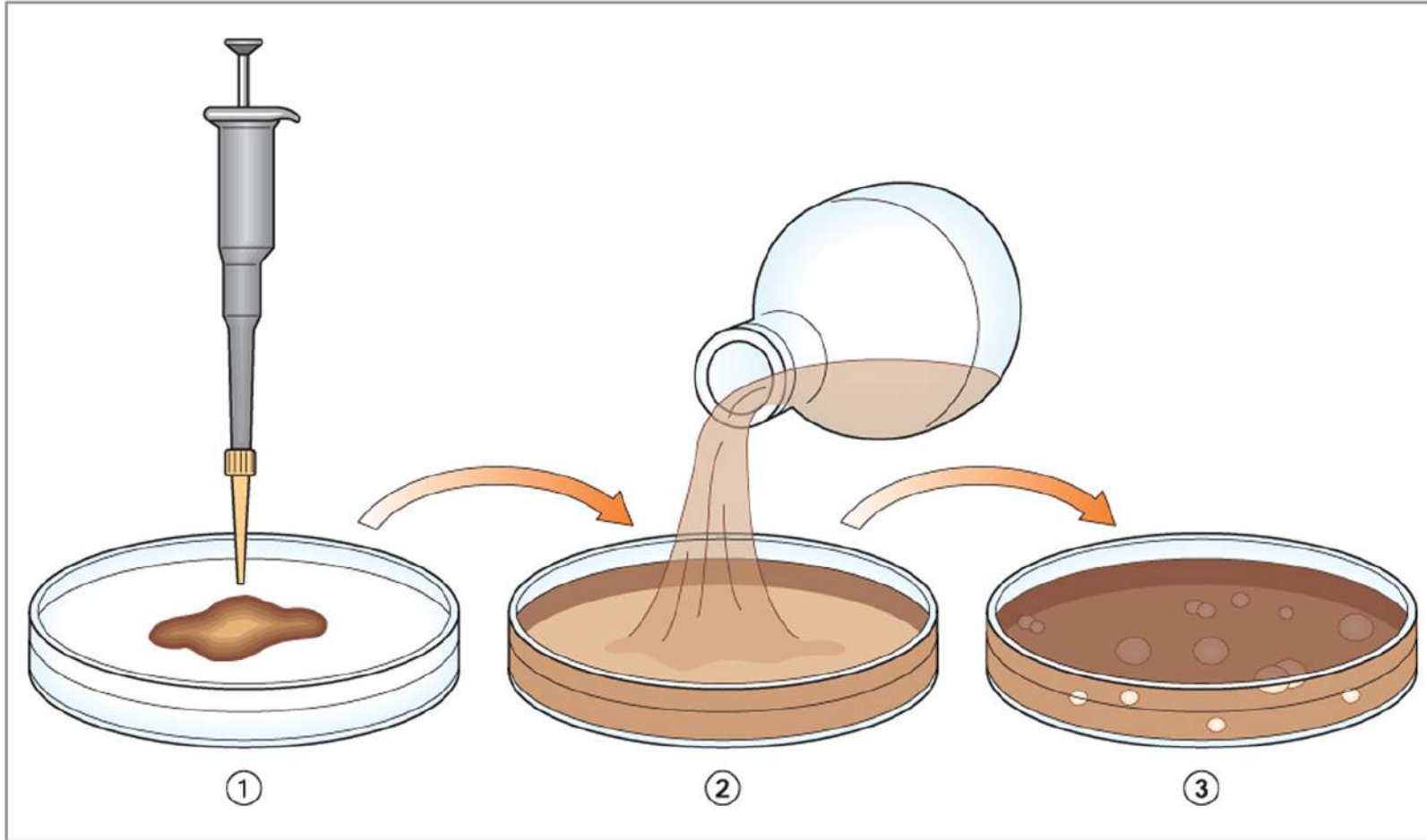
## **Tecnica per inclusione dell'inoculo in substrato solidificabile (Tecnica "Pour Plate")**

Questa tecnica prevede l'uso di agar a temperatura di 45°C che potrebbe danneggiare le cellule di alcuni microrganismi; inoltre, la crescita delle colonie avviene sia in superficie che in profondità. Le colonie inglobate nella matrice del substrato,

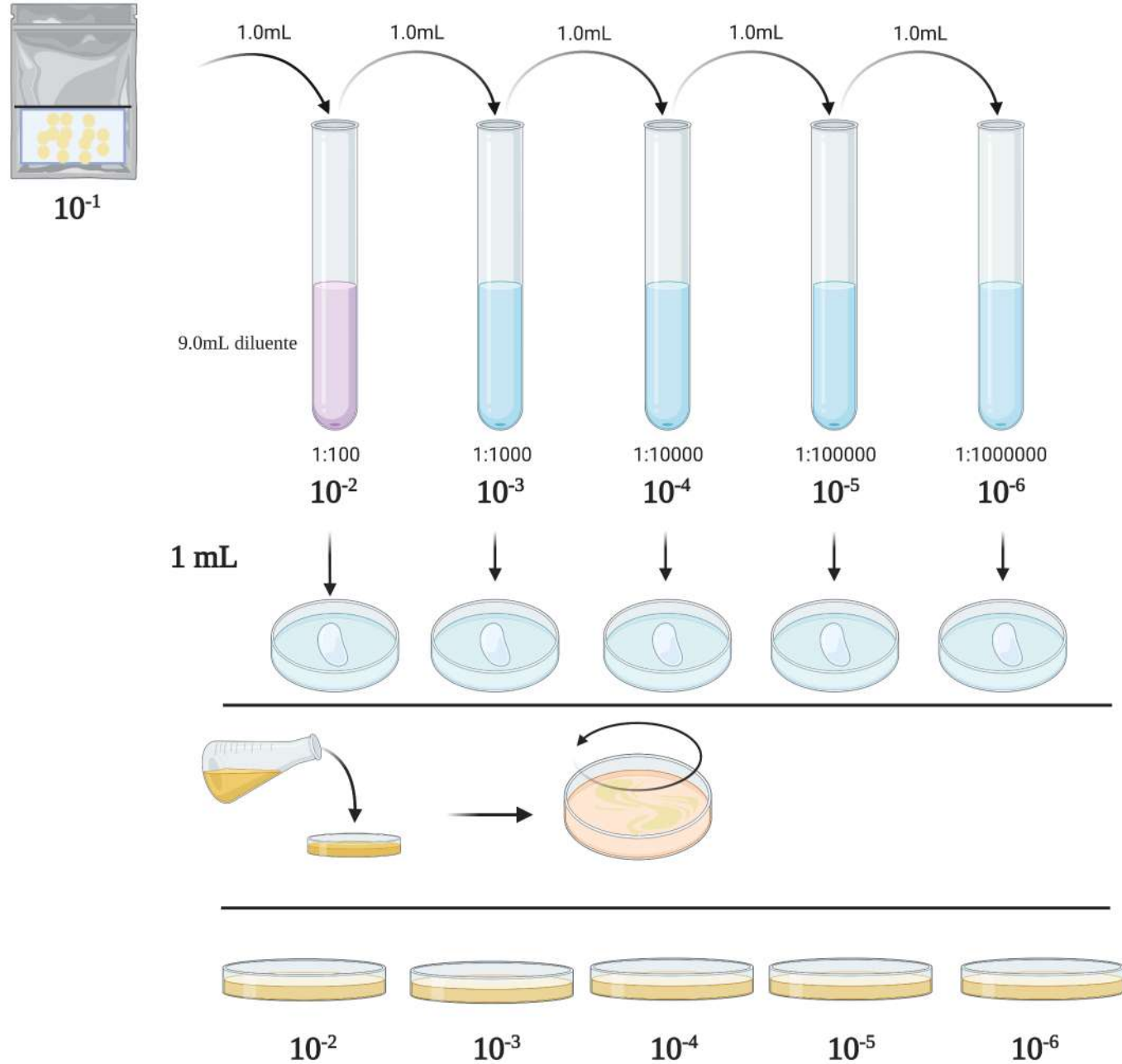
## **Tecnica di semina per distribuzione (spatolamento) superficiale dell'inoculo su substrato solido (Tecnica "Spread plate").**

La crescita delle colonie avviene in superficie, facilitando la loro numerazione.

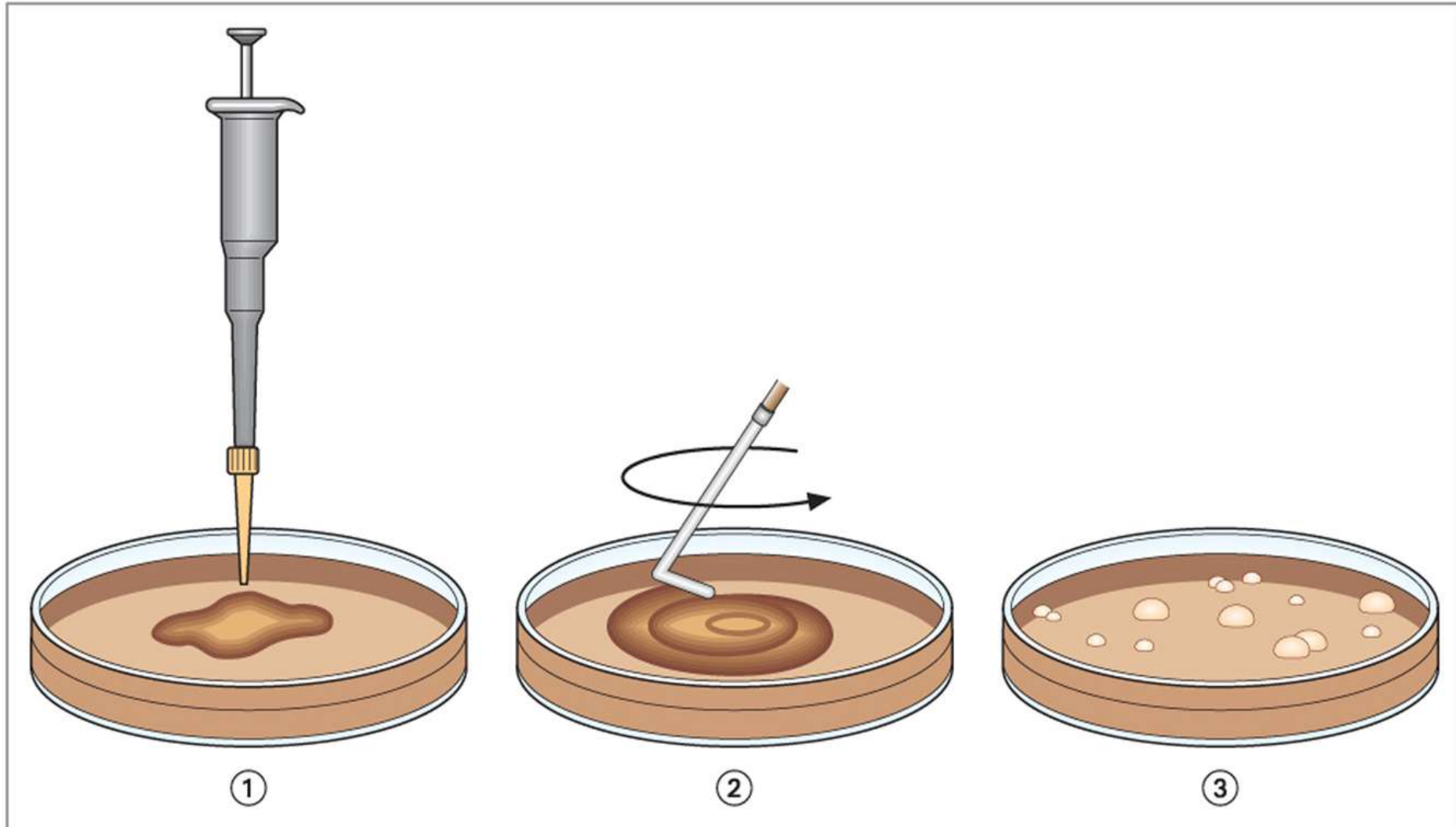
# METODO per INCLUSIONE



# Tecnica per inclusione

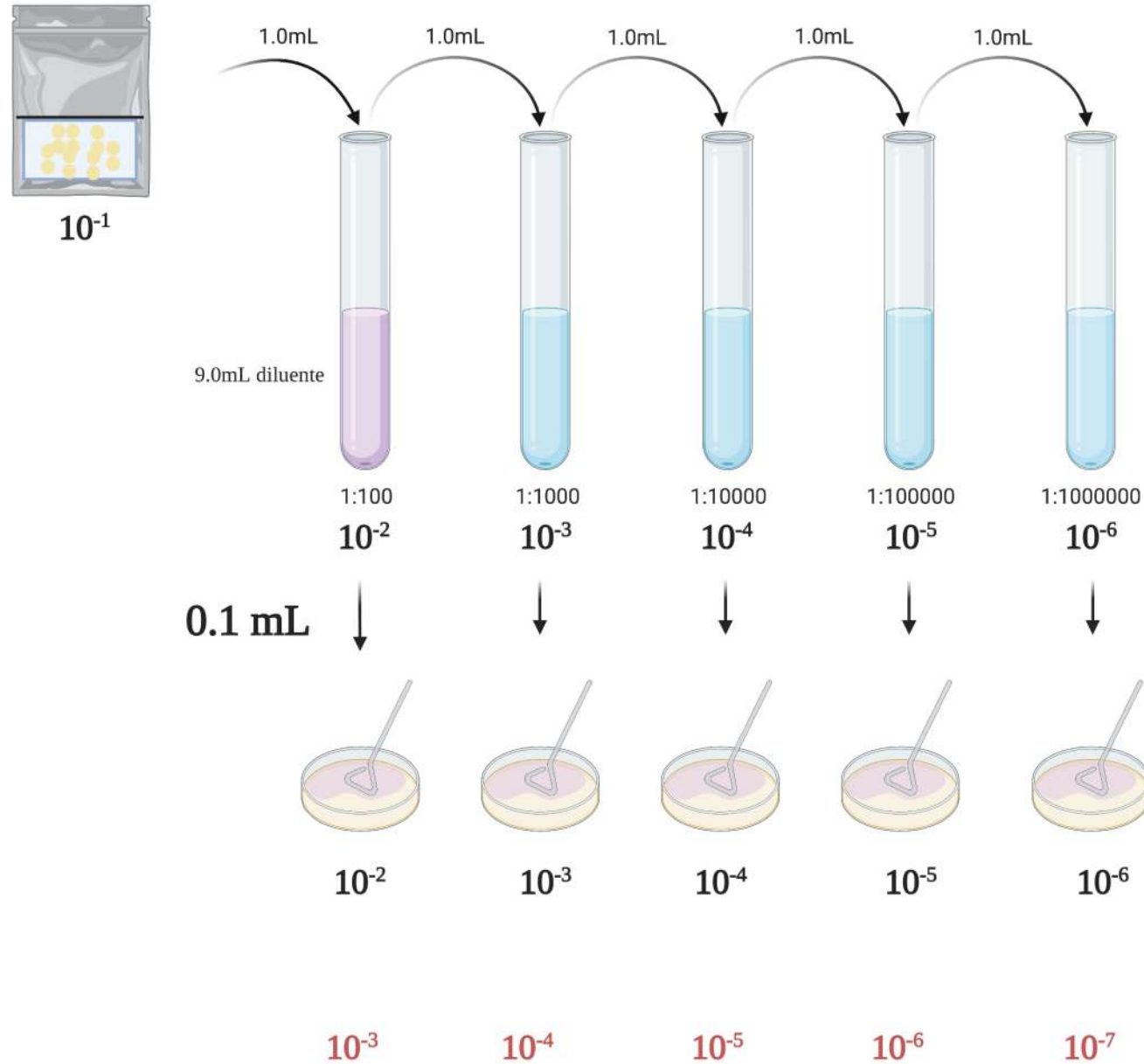


# METODO per SPATOLAMENTO





# Piastramento Per Spatolamento Superficiale



Inoculando ogni piastra con 0,1 ml di ciascuna diluizione e quindi con 1/10 del numero di UFC che sono presenti in 1 ml di inoculo, è necessario moltiplicare il n° di UFC/g o ml determinato per un fattore 10.

**PIASTRAMENTO PER SPATOLAMENTO SUPERFICIALE (SPREAD-PLATE)**  
NB. PER MICRORG. AEROBI O FACOLTATIVI!!!

## **LIMITI DI RILEVAMENTO:**

### **DA CAMPIONE LIQUIDO:**

SE USO INCLUSIONE: 1 UFC/ml

SE USO SPATOLAMENTO: 10 UFC/ml

**POSSO INOCULARE DIRETTAMENTE 1ml o 0,1ml DEL CAMPIONE TAL QUALE IN PIASTRA!!**

### **DA CAMPIONE SOLIDO:**

SE USO INCLUSIONE: 10 UFC/g

SE USO SPATOLAMENTO: 100 UFC/g

**DEVO PER FORZA DILUIRE PER INOCULARE 1ml o 0,1 ml DELLA DILUIZIONE MADRE ( $10^{-1}$ ) IN PIASTRA!!**

# Quante diluizioni realizzare?

Nella realtà, noi non conosciamo mai l'esatto numero di microrganismi presenti in un grammo o ml di campione. Al momento dell'analisi dobbiamo dunque decidere quante volte diluire il campione per fare in modo che le piastre petri, contenenti l'adatto terreno nutritivo, una volta seminate con aliquote delle diluizioni del campione possano contenere, dopo incubazione in adatte condizioni (tempo, temperatura e atmosfera) un numero di colonie facilmente contabili

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

a) può essere dettato dai criteri microbiologici da soddisfare per accertare se un campione risulta accettabile: se ad esempio è stabilito che in una unità campionaria il numero di UFC/g o ml non deve superare 100, allora è sufficiente diluire una sola volta il campione

b) può essere dettato da precedenti esperienze di analisi condotte su prodotti simili

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

# Numerazione delle colonie in piastra





# Numerazione delle colonie in piastra

uno spreader



piastre con troppe  
poche colonie

piastre con troppe  
colonie

## ISOLATION OF MICROBES



# Numerazione delle colonie in piastra

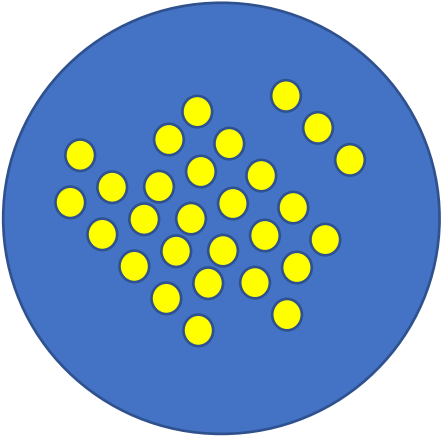
Teoricamente ogni cellula presente nel campione iniziale ha dato origine, in seguito a moltiplicazione, ad una colonia singola visibile ad occhio nudo.

Per il conteggio, il numero di colonie contato su una piastra viene moltiplicato per il numero di volte in cui è stato diluito il campione iniziale.

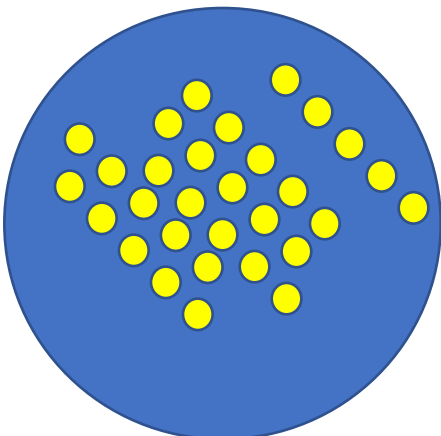
$$N \text{ (Numero di colonie)/ g o ml} = \frac{n \text{ (N° di colonie nelle piastre considerate) / p (N° di piastre considerate)}}{V \text{ (Volume dell'inoculo in ml) x d (diluizione considerata)}}$$

$$N \text{ (UFC)/g o ml} = \frac{(50+50)/2}{1 \times 10^{-3}} = 50 \times 10^3 = 5 \times 10^4$$

**spread plate technique=**  
0.1 mL of the dilution



28 colonies  
 $10^{-5}$



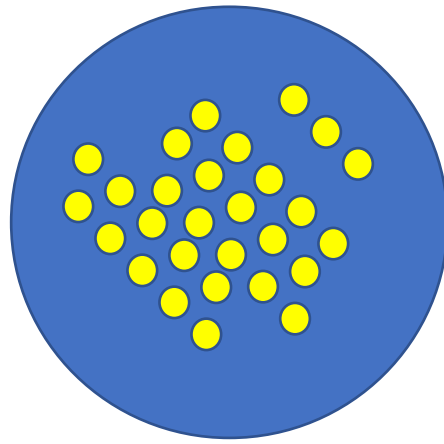
30 colonies  
 $10^{-5}$

$$N \text{ (number of colonies)/g or mL} = \frac{n \text{ (number of colonies from the plates) / } p \text{ (number of plates)}}{V \text{ (inoculum volume in mL) } \times d \text{ (dilution considered)}}$$

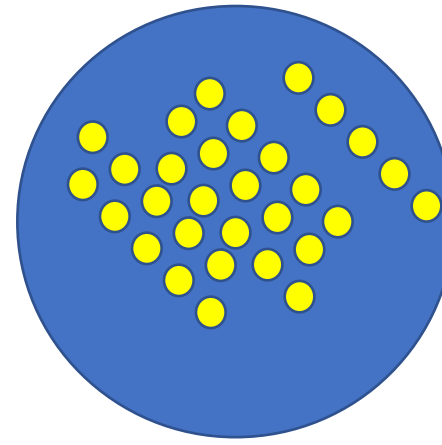
$$N \text{ (number of colonies)/g or mL} = \frac{n \text{ (28+30) / } p \text{ (2)}}{V \text{ (0.1 mL) } \times d \text{ (} 10^{-5}\text{)}} \rightarrow \frac{29}{V \text{ (0.1 mL) } \times d \text{ (} 10^{-5}\text{)}} \rightarrow 290 \times 10^5 \rightarrow 2.90 \times 10^7 \text{ CFU/g or mL}$$



**Pour plate technique=**  
1 mL of the dilution



28 colonies  
 $10^{-5}$



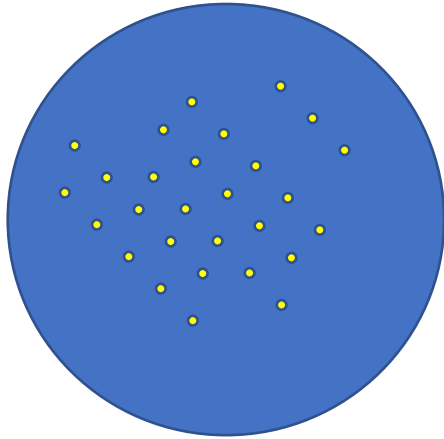
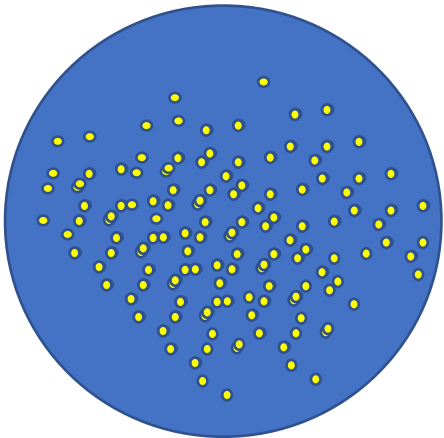
30 colonies  
 $10^{-5}$

**Pour plate technique=** 1 mL of the dilution

$$N \text{ (number of colonies)/g or mL} = \frac{n \text{ (number of colonies from the plates) / } p \text{ (number of plates)}}{V \text{ (inoculum volume in mL) } \times d \text{ (dilution considered)}}$$

$$N \text{ (number of colonies)/g or mL} = \frac{n \text{ (28+30) / } p \text{ (2)}}{V \text{ (1 mL) } \times d \text{ (10}^{-5}\text{)}} \rightarrow \frac{29}{V \text{ (1 mL) } \times d \text{ (10}^{-5}\text{)}} \rightarrow 29 \times 10^5 \rightarrow 2.90 \times 10^6 \text{ CFU/g or mL}$$

**Pour plate technique=**  
1 mL of the dilution



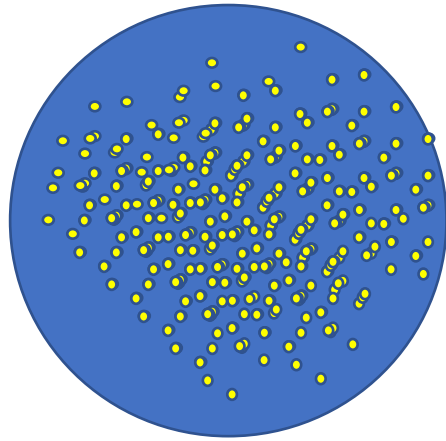
← 260 colonies  
**10<sup>-5</sup>**

28 colonies  
**10<sup>-6</sup>**

= 26 colonies in 10<sup>-6</sup>

$$N \text{ (number of colonies)/g or mL} = \frac{n \text{ (26+28) / p (2)}}{V \text{ (1 mL) X d (10}^{-6}\text{)}} \rightarrow \frac{27}{V \text{ (1 mL) X d (10}^{-6}\text{)}} \rightarrow 27 \times 10^6 \rightarrow 2.7 \times 10^7 \text{ CFU/g or mL}$$

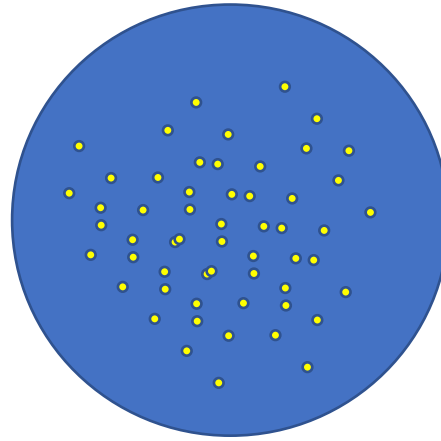
**Pour plate technique=**  
1 mL of the dilution



280 colonies  
 $10^{-6}$



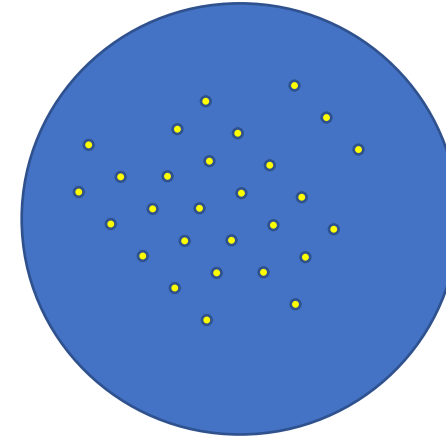
= 2.8 colonies in  $10^{-8}$



112 colonies  
 $10^{-7}$



= 11.2 colonies in  $10^{-8}$



28 colonies  
 $10^{-8}$

$$\begin{aligned}
 N \text{ (number of colonies)/g or mL} &= \frac{n (2.8+11.2+28) / p (3)}{V (1 \text{ mL}) \times d (10^{-8})} \rightarrow \frac{14}{V (1 \text{ mL}) \times d (10^{-8})} \rightarrow 14 \times 10^8 \rightarrow 1.4 \times 10^9 \text{ CFU/g or mL}
 \end{aligned}$$