

# MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI

**Prof. Ilario Ferrocino**

 0116708847

 [ilario.ferrocino@unito.it](mailto:ilario.ferrocino@unito.it)

 University of Turin

DISAFA - Microbiology and food technology sector

Largo Paolo Braccini, 2

10095 Grugliasco (TO)

# L'analisi microbiologica degli alimenti

L'analisi microbiologica degli alimenti, consiste nella determinazione del numero e/o della presenza di specifiche popolazioni microbiche e/o di uno specifico microrganismo e/o di specifici metaboliti microbici (enzimi, tossine).

L'analisi microbiologica degli alimenti è utilizzata come strumento di supporto alla implementazione di sistemi di gestione della qualità e sicurezza microbiologica degli alimenti (come ad esempio l'analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo HACCP ) e alla verifica della loro efficacia.

Il controllo microbiologico degli alimenti è orientato a:

- i) valutare le reali condizioni igieniche di produzione di un alimento; identificare le fasi del processo in corrispondenza delle quali si verificano i rischi maggiori di contaminazione da parte di microrganismi pericolosi, di una loro sopravvivenza o di una loro incontrollata proliferazione;
- ii) analisi dei prodotti finiti a conferma e verifica dell'efficacia del sistema HACCP implementato e per stabilire se le norme di buona fabbricazione, di conservazione e di distribuzione sono state strettamente seguite.

# L'analisi microbiologica degli alimenti

L'analisi microbiologica di un campione alimentare è svolta per diversi motivi:

- verificare l'efficacia dei sistemi di garanzia della qualità e della sicurezza implementati;
- validare la buona qualità microbiologica del prodotto;
- Identificare un alimento quando è sospettato di essere stato causa di malattia alimentare;
- Identificare potenziali pericoli potenziali durante le fasi di un processo produttivo;
- Identificare i Punti Critici di Controllo da monitorare;
- per stabilire la “shelf life” di un prodotto ai fini dell'etichettatura (data di scadenza).

## Le indagini da svolgere:

- Enumerazione di specifiche popolazioni microbiche (Microrganismi totali «aerobi, anaerobi, microaerofili, sporigeni, non sporigeni, psicrotrofici, mesofili, termofili»; Lieviti e Muffe; *Enterobacteriaceae*; Coliformi; Batteri lattici etc...)
- Enumerazione di specifici microrganismi (Protecnologici, Probiotici, Patogeni, Alterativi);
- Presenza o assenza di specifici microrganismi patogeni e loro metaboliti (enzimi, tossine).

# L'analisi microbiologica degli alimenti

L'analisi microbiologica di un alimento devono prendere:

- il piano di campionamento e i criteri microbiologici;
- il prelievo e trasporto dei campioni in laboratorio;
- la scelta dei metodi analitici per il rivelamento, la numerazione e l'identificazione di specifici microrganismi o di gruppi di microrganismi e delle loro tossine.

# L'analisi microbiologica degli alimenti: campionamento

**Prelievo di una quantità di campione rappresentativa di un lotto di prodotto.**

**Lotto:** quantità di prodotto alimentare ottenuto, trattato e conservato in condizioni uniformi in un ciclo di produzione omogenea, comunque identificabile.

Numero e grandezza del campione devono:

- essere stabiliti statisticamente mediante “casualizzazione”;
- tener conto della distribuzione e della stratificazione microbica e dell'influenza dell'errore analitico.

# L'analisi microbiologica degli alimenti: campionamento

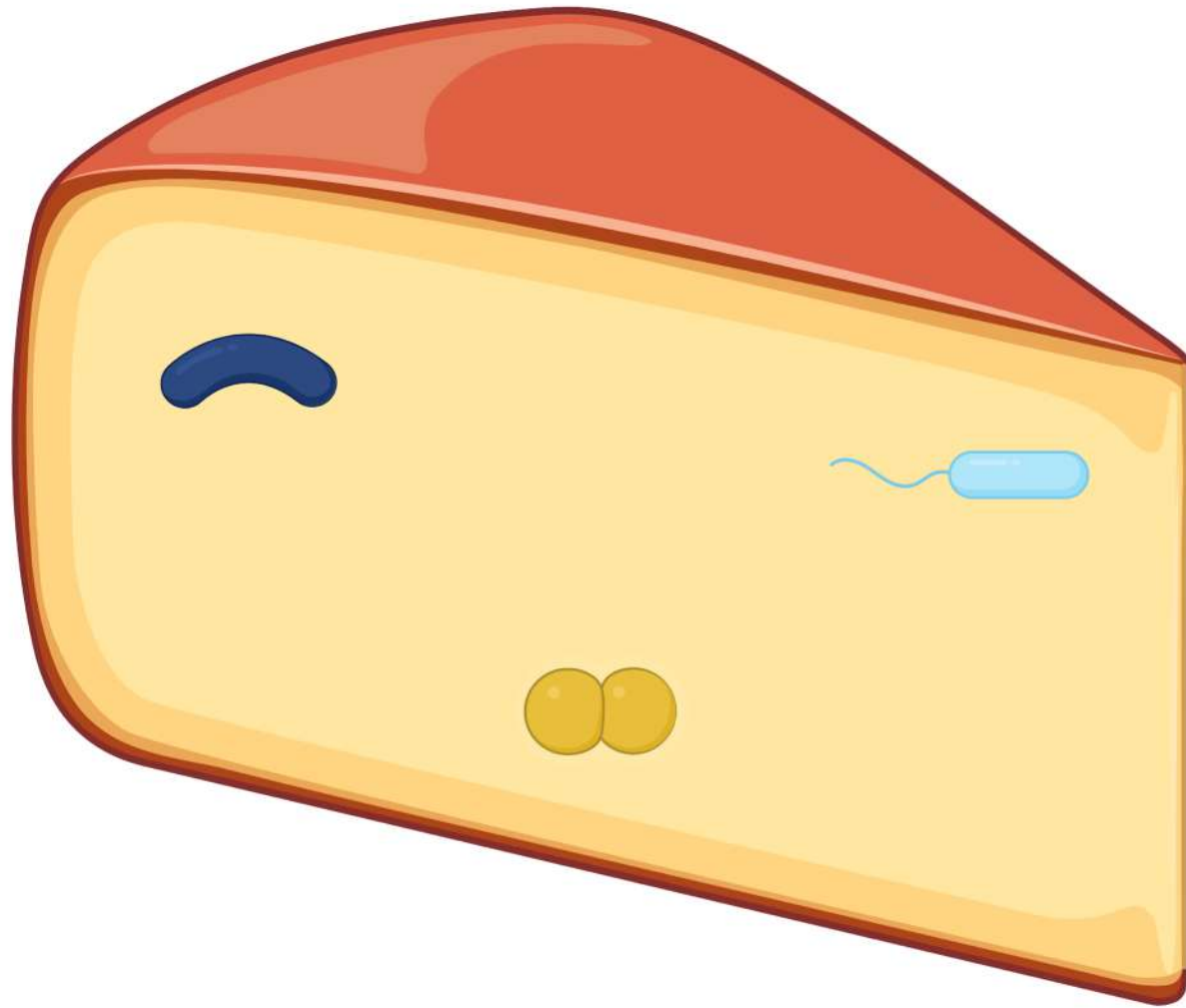
A differenza dell'analisi chimica degli alimenti, in cui le sostanze chimiche dannose sono il più delle volte distribuite uniformemente e, nella maggioranza dei casi, la loro concentrazione rimane più o meno costante nel tempo, l'analisi microbiologica di un alimento deve tener conto dell'ecologia microbica dello stesso.

La distribuzione dei microrganismi negli alimenti è imprevedibile e nella maggioranza dei casi essi sono distribuiti in maniera casuale, con stratificazioni microscopiche e spaziali.

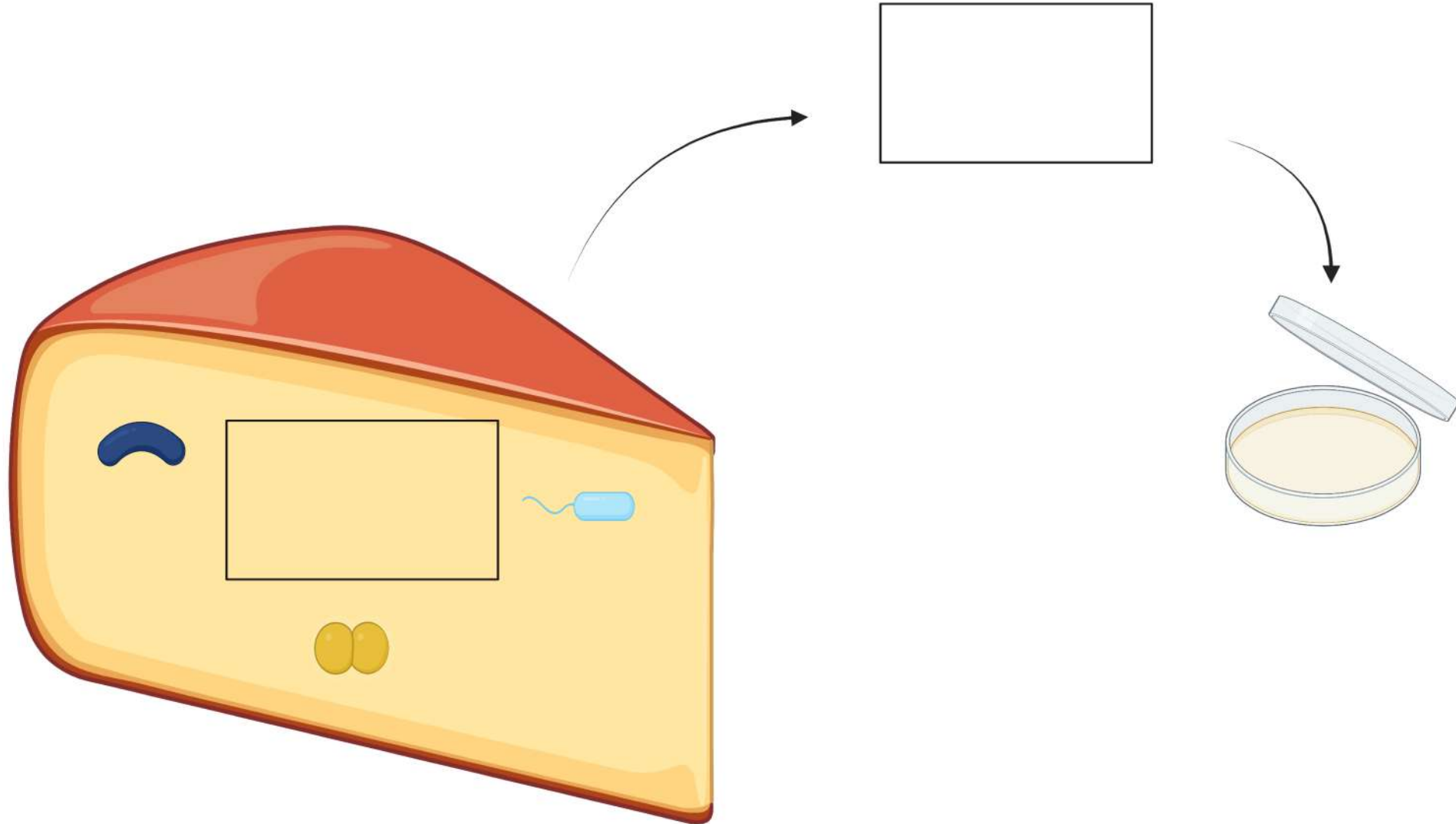
Inoltre, il microbiota di un alimento presenta un carattere dinamico, aumenta o diminuisce di numero durante le varie fasi di un processo produttivo in funzione delle condizioni ecologiche che si realizzano.

# L'analisi microbiologica degli alimenti: campionamento

**Presenza o assenza di  
un patogeno**

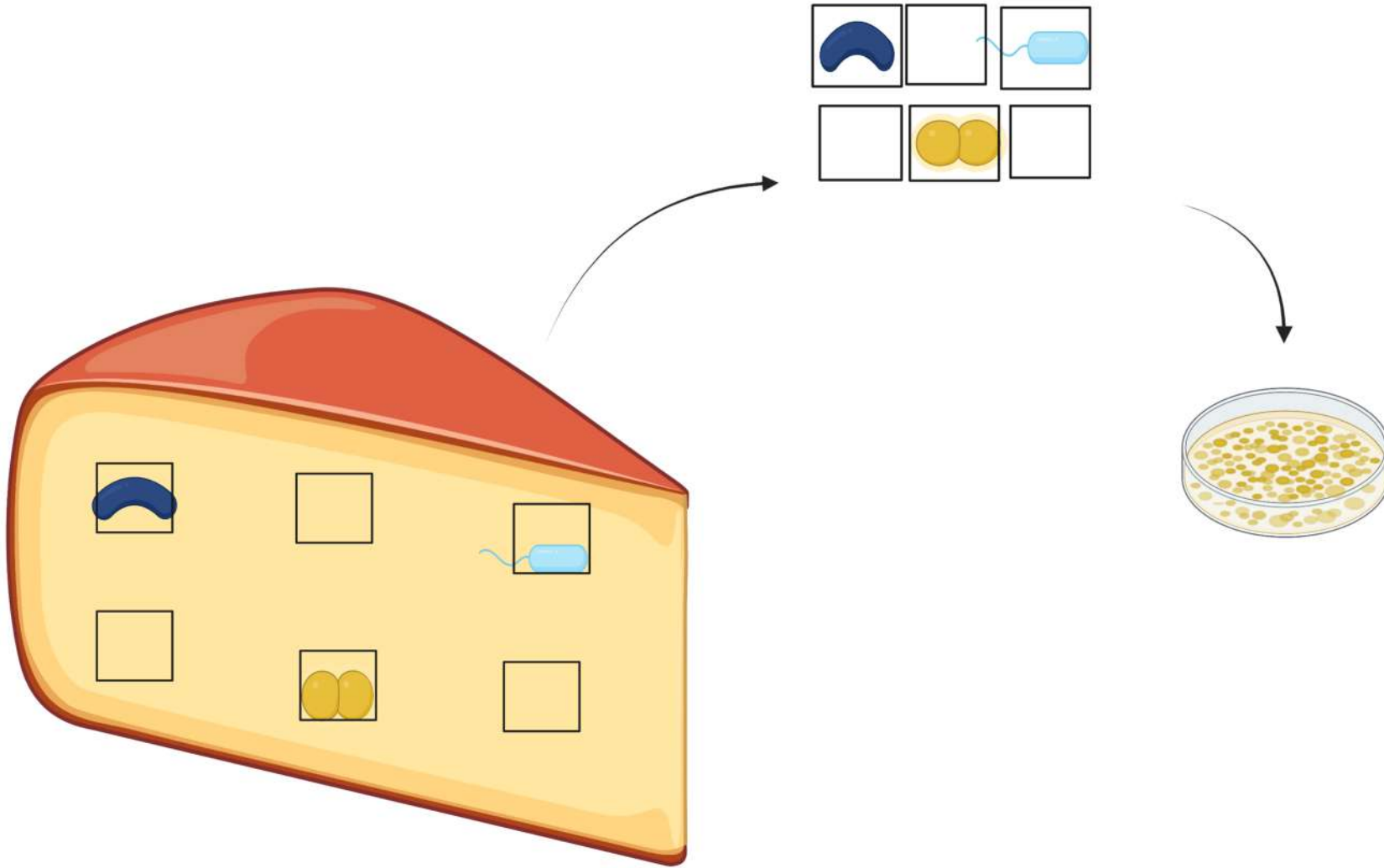


# L'analisi microbiologica degli alimenti: campionamento





# L'analisi microbiologica degli alimenti: campionamento



# L'analisi microbiologica degli alimenti: campionamento

Il campione deve essere costituito da uno specificato numero di unità campionarie prelevate in maniera random da ogni lotto di prodotto.

I criteri stabiliti nel piano di campionamento riportano il quantitativo che deve essere prelevato.

I campioni di alimento vanno raccolti in contenitori sterili, conservati e trasportati in condizioni refrigerate (0-4°C) o allo stato congelato, in funzione della natura del prodotto.

«**campione**», una serie composta di una o più unità o una porzione di materia selezionate tramite modi diversi in una popolazione o in una quantità significativa di materia e destinate a fornire informazioni su una determinata caratteristica della popolazione o della materia oggetto di studio e a costituire la base su cui fondare una decisione relativa alla popolazione o alla materia in questione o al processo che le ha prodotte.

# Criteri microbiologici e Piani di Campionamento

Per giudicare la qualità e la sicurezza microbiologica di un alimento si valuta la presenza o il numero di microrganismi indicatori o patogeni.

Per dare un giudizio obiettivo ci si deve riferire a dei criteri microbiologici precisi

«**criterio microbiologico**», un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita;

Un criterio microbiologico deve fornire le seguenti informazioni:

- le caratteristiche per identificare l'alimento;
- il tipo, la specie o il gruppo di organismi da ricercare;
- i metodi analitici da usare;
- il piano di campionamento;
- i limiti microbiologici applicabili per lo specifico prodotto,
- Il punto della catena di produzione/trasformazione al quale si applica
- le azioni da intraprendere quando i limiti non sono rispettati

# Piani di campionamento a due classi

I criteri microbiologici che definiscono l'accettabilità di un determinato prodotto alimentare, dettano il piano di campionamento da adottare, con particolare riferimento al numero di campioni da sottoporre ad analisi

Il campione può ricadere in una di due classi: accettato o rifiutato.  
Dunque questi piani vengono usati per **decisioni presenza/assenza**.

**n**: numero di unità da campionare e da sottoporre ad analisi; per unità campionaria (u.c.) deve intendersi una porzione singola o confezione di prodotto alimentare scelta a caso su cui si eseguiranno le analisi;

**m**: numero limite di batteri che determina l'inaccettabilità del lotto;

**c**: numero massimo di unità campionarie che possono superare il valore di m accettate per esprimere l'idoneità del lotto.

Di seguito è riportato un esempio per illustrare come si interpretano i risultati di un piano a 2 classi.

Es1.  $n=5$   $c=2$   $m=0$

Il lotto è fuori dai criteri se più di 2 u.c. presentano il microrganismo.

Es2.  $n=5$   $c=3$   $m=0$

# Piani di campionamento a tre classi

Il campione può ricadere nelle seguenti tre classi:

da 0 a  $m$ ;

da  $m$  a  $M$ ;

al di sopra di  $M$ .

Le tre classi qualitative per le  $n$  unità campionarie sono identificabili con le seguenti lettere:

**m**: valore limite del numero di batteri; il risultato è considerato soddisfacente se il numero di batteri in tutte le unità campionarie analizzate è inferiore ad  $m$ ;

**M**: valore massimo del numero di batteri tollerato; il risultato è considerato insoddisfacente se il numero di batteri in una o più delle unità campionarie analizzate è superiore ad  $M$ ;

**c**: numero delle unità campionarie il cui valore può essere compreso tra  $m$  ed  $M$ ; il campione viene considerato ancora accettabile se il numero di batteri delle altre unità campionarie è pari o inferiore ad  $m$ .

Il piano di campionamento a tre classi consente una maggiore flessibilità nell'interpretazione di risultati positivi, ammettendo la possibilità che una piccola proporzione dei campioni analizzati ( $c$ ) possa superare, entro un certo limite, il valore massimo consentito ( $m$ ).

## Piani di campionamento a tre classi

Supponiamo che per un dato alimento sono fissati i seguenti criteri microbiologici:

**$n=5$ ;  $c=2$ ;  $m=5 \times 10^2$ ;  $M=1 \times 10^3$**

(1)  $9,5 \times 10^2$

(2)  $3,5 \times 10$

(3)  $1,5 \times 10$

(4)  $2,1 \times 10$

(5)  $6,3 \times 10^2$

Il risultato è considerato soddisfacente poiché il numero di batteri in due delle unità campionarie (la n°1 e la 5) è compreso nel range definito dal criterio mentre le u.c. 2, 3 e 4 sono al di sotto del limite **m**.

# Piani di campionamento a tre classi

Il campione può ricadere nelle seguenti tre classi:

da 0 a  $m$ ;

da  $m$  a  $M$ ;

al di sopra di  $M$ .

Supponiamo che per un dato alimento sono fissati i seguenti criteri microbiologici:

$n=5$ ;  $c=2$ ;  $m=5 \times 10^3$ ;  $M=2 \times 10^4$

(1)  $9,5 \times 10^2$

(2)  $3,5 \times 10^3$

(3)  $1,5 \times 10^4$

(4)  $2,1 \times 10^4$

(5)  $4,3 \times 10^5$

Il risultato è considerato insoddisfacente poiché il numero di batteri in una delle unità campionarie (la  $n^{\circ}5$ ) è superiore ad  $M$

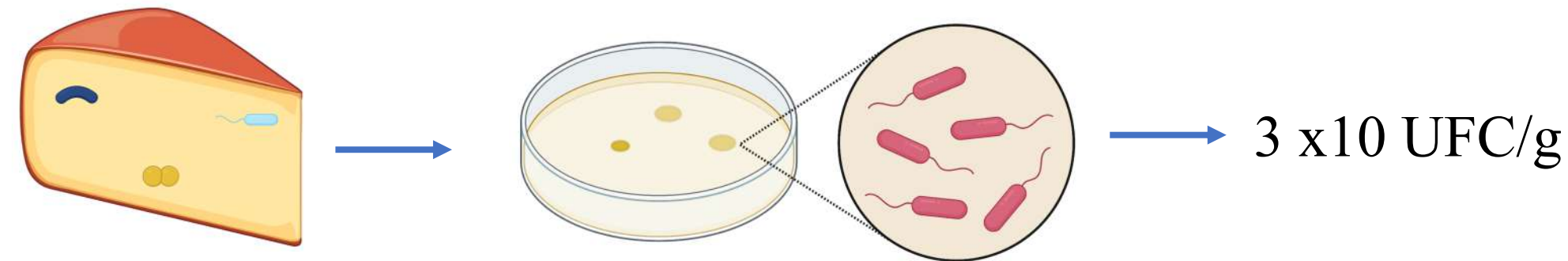
# Metodi analitici per la numerazione dei microrganismi negli alimenti

Diversi sono i metodi utilizzati per la numerazione dei microrganismi presenti in un campione alimentare. Quelli maggiormente utilizzati sono:

Conteggio **diretto** microscopico, per cellule vitali e non;

Metodo del **numero più probabile** di microrganismi (*Most Probable Numbers*, MPN) per la determinazione statistica delle cellule vitali;

Conteggio **standard** di cellule vitali su piastra (*Standard Plate Counts*, SPC);





# Diluenti usati in microbiologia

I campioni alimentari solidi prima di essere analizzati, vanno omogeneizzati in un adatto diluente, al fine di disperdere i microrganismi nella fase liquida che può essere facilmente manipolata per l'analisi. La scelta del diluente è una fase molto importante dell'analisi, in quanto diluenti non adatti, come ad esempio l'acqua, possono causare danneggiamenti delle cellule microbiche, con conseguente sottostima del numero di microrganismi.

Le principali caratteristiche dei diluenti sono:

isotonicità (stessa pressione osmotica delle cellule microbiche);

assenza di componenti nutritivi (o presenti in minima quantità);

bassa tensione superficiale (favorisce la miscelazione del liquido con il substrato agarizzato fluido).

# Terreni nutritivi per la coltivazione dei microrganismi

Un terreno di coltura può essere definito come l'ambiente nutritivo artificiale creato in laboratorio per far crescere un microrganismo.

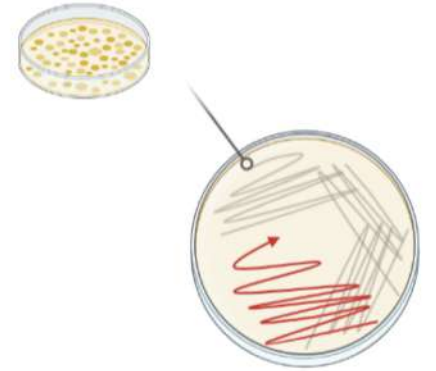
In base alla composizione in nutrienti si possono dividere in due gruppi:

**terreni a composizione chimica definita:** se ne conosce l'esatta composizione percentuale delle sostanze chimiche (organiche e inorganiche) utilizzate per la loro formulazione;

**terreni complessi o a composizione indefinita:** nella loro formulazione contengono sostanze di origine varia e, nella maggior parte dei casi, di derivazione naturale (animale e vegetale) di cui non è nota la precisa composizione dei nutrienti.

# Terreni nutritivi per la coltivazione dei microrganismi

**Terreni nutritivi liquidi:** detti anche brodi, sono preparati sciogliendo in acqua tutti i componenti necessari.



**Terreni nutritivi solidi:** sono resi tali aggiungendo, alla soluzione dei nutrienti, una sostanza gelificante come l'agar, che è un mucopolisaccaride sulfonato estratto da alghe rosse che, una volta fluidificato a temperature superiori a 85°C, solidifica quando viene lasciato raffreddare a temperature inferiori a 45°C. In genere è usato a concentrazioni dell'1,5% per preparare terreni solidi e allo 0,75% per terreni semi-solidi (agar soft).

# Terreni nutritivi per la coltivazione dei microrganismi

**Terreni per uso generale:** presentano una composizione in nutrienti tale da soddisfare la crescita della maggior parte dei microrganismi di uno specifico gruppo (batteri, lieviti e muffe).

**Terreni selettivi:** oltre ai normali componenti nutritivi, contengono sostanze chimiche che esercitano un'azione inibente nei confronti di alcuni microrganismi o gruppi di microrganismi, senza interferire, nelle dosi di utilizzo, con l'organismo da isolare.

**Terreni selettivi e differenziali:** sono terreni selettivi ai quali sono aggiunte particolari sostanze chimiche che determinano una modificazione del terreno come conseguenza di una particolare attività metabolica del microrganismo da isolare, differenziandolo dalle specie che non sono in grado di utilizzare il composto differenziale (ad esempio la capacità del microrganismo di fermentare un particolare carboidrato o di produrre particolari metaboliti che rendono “caratteristica” la colonia microbica da isolare).