

**7000 - METODI PER LA
DETERMINAZIONE DI
MICROORGANISMI INDICATORI DI
INQUINAMENTO E DI PATOGENI**

7000. Metodi per la determinazione di microorganismi indicatori d'inquinamento e di patogeni

Dalla difficoltà di utilizzare tecniche di routine finalizzate alla ricerca di tutti i possibili organismi patogeni, è sorta la necessità di ricercare, per la definizione della qualità di un'acqua, microorganismi indicatori di contaminazione, la cui presenza può essere considerata indice della presenza di patogeni. L'uso degli indicatori tuttavia fornisce la probabilità, e non la certezza, della presenza di patogeni. I microorganismi storicamente proposti come indicatori di inquinamento fecale nell'ambiente e che vengono ricercati, comunemente e su base normativa, per la definizione della qualità di acque di diversa tipologia e a diversa destinazione d'uso sono i Coliformi Totali, i Coliformi Fecali (di cui fa parte *Escherichia coli*) e gli Streptococchi Fecali. Negli anni più recenti, l'approfondimento degli studi e delle ricerche ha tuttavia orientato l'interesse su altri gruppi di indicatori o specie microbiche più significativi: enterococchi ed *Escherichia coli* sono attualmente ritenuti più validi indicatori di contaminazione fecale e parametri che, meglio di altri, possono segnalare la eventuale presenza di patogeni. In Tab. 3 vengono suggeriti alcuni volumi iniziali per l'analisi di acque naturali di diversa tipologia per il rilevamento quantitativo degli indicatori di contaminazione fecale.

Tabella 3: Volumi proposti per l'analisi di acque di diversa tipologia per il rilevamento quantitativo degli indicatori di contaminazione fecale

Tipo di acqua	Volumi (mL)				
	10	1	0,1	0,01	0,001
Sorgente	x				
Lago	x	x			
Torrente		x	x		
Fiume		x	x		
Refluo					
clorata		x	x		
trattam. secondario		x	x	x	
trattam. primario			x	x	
grezza				x	x

La ricerca dei patogeni deve essere effettuata, rispetto agli indicatori, su quantitativi più elevati di acqua, ma, mentre il loro rilevamento testimonia ovviamente della loro sicura presenza, un risultato negativo non depone per la loro sicura assenza. Infatti i patogeni possono essere presenti con discontinuità negli effluenti e conseguentemente nei corpi idrici riceventi; in aggiunta, l'abbondante presenza di flora contaminante accessoria interferisce spesso con la reale possibilità di evidenziare i patogeni anche quando essi siano presenti. Pertanto, a causa della discontinuità della loro presenza e delle difficoltà tecniche legate al loro isolamento nell'ambiente idrico, la ricerca dei patogeni non potrà tanto avere il significato di controllare la qualità delle acque, quanto finalità epidemiologiche, offrendo la possibilità di individuare uno degli anelli della catena attraverso la quale avviene la diffusione degli agenti patogeni responsabili delle malattie infettive di origine idrica.

Di seguito vengono presentati i metodi di analisi per la ricerca sia di indicatori di contaminazione fecale (coliformi, streptococchi ed *Escherichia coli*) e di qualità (conteggio delle co-

lonie su agar), sia di alcuni organismi che producono forme di resistenza (spore di clostridi solfito-riduttori, uova di Elminti), di patogeni e opportunisti patogeni di natura batterica (*Salmonella*, *Vibrio* e *Aeromonas*), batteriofagi, virus e protozoi patogeni.

I metodi proposti per i diversi parametri microbiologici considerati sono stati elaborati in rispetto delle più recenti acquisizioni tecnico-scientifiche e degli aggiornamenti che in questi anni sono stati segnalati a livello nazionale ed internazionale. Sono pertanto stati inseriti metodi analitici che, sperimentati ampiamente in laboratorio e facenti parte di protocolli operativi per la ricerca dei parametri microbiologici presi in considerazione, erano già stati proposti da enti ed organizzazioni internazionali quali ISO, APHA, USEPA, AOAC, PHLS, WHO. Alcuni di essi fanno già parte di una serie di metodi di riferimento proposti a livello nazionale dall'Istituto Superiore di Sanità, dall'IRSA e dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Ancora, alcuni sono stati sottoposti a prove di comparazione tra metodi anche nell'ambito di circuiti interlaboratoriali svolti a livello europeo.

Per quanto riguarda le attrezzature di laboratorio, le tecniche di campionamento e quelle di analisi più generali, si fa riferimento alle Sezioni 6020, 6030 e 6040.

7010. Coliformi totali

1. Introduzione

1.1 Generalità

Nel gruppo dei coliformi totali vengono compresi microrganismi che fanno parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. L'appartenenza a questa famiglia da parte di generi differenti, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35°-37°C in 48 ore. I coliformi totali sono batteri a forma di bastoncino, gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni. Sono considerati, insieme ai coliformi fecali e agli streptococchi, classici indicatori di contaminazione nelle acque. Pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10⁹ UFC/g, sono ubiquitari. Proprio a causa della loro costante presenza nell'ambiente, la loro validità come indicatori è stata più volte messa in dubbio. Le più recenti indicazioni, in fase comunque di ulteriore evoluzione, tendono a distinguere i microrganismi appartenenti al gruppo in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione. La prima categoria, ben conosciuta, è quella dei coliformi di riconosciuta origine fecale che comprende alcune specie dei generi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, presenti nel materiale fecale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e in acque e suoli contaminati. La seconda categoria corrisponde a specie che, al contrario, sono largamente distribuite nell'ambiente, dove possono anche moltiplicarsi, colonizzando suolo, acqua e vegetazione.

Nelle acque reflue grezze le loro concentrazioni possono raggiungere valori compresi tra 10⁷-10⁹ per 100 mL di campione.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

Possano essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A*: metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab. 1, Sezione 6020). Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.
- *Metodo B*: metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo per-

mette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati tre substrati alternativi.

1.4 *Campo di applicazione*

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. **METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)**

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 *Volume da analizzare*

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3. **Strumentazione e vetreria**

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. **Reattivi e terreni di coltura**

4.1 *Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva*

4.1.1 Brodo Lattosato

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.1.2 Brodo al Lauril Triptosisio

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato (4.1.1). Si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

Composizione:

Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio lauril solfato	0,1	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

4.2 Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

4.2.1 Brodo Lattosato Bile Verde Brillante

Composizione:

Peptone	10	g
Lattosio	10	g
Bile	20	g
Verde brillante	13,3	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno nei tubi contenenti la campanella di Durham rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (4.1.1 o 4.1.2), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a 36±1°C. Dopo 24±2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48±3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva: sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

5.2 Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 0,1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo lattosato bile verde brillante (4.2.1) per la prova di conferma. Incubare i tubi a 36±1°C per 24+24 ore. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi totali.

Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare, considerando l'eventuale diluizione, il valore dell'indice MPN.

6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. METODO B. Metodo del numero più probabile (MPN)

Il metodo di seguito descritto viene riportato nel Manuale "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" sotto il nome di Enzyme Substrate Test. L'EPA ha approvato questo tipo di analisi sotto il nome di MMO-MUG test (Colilert). L'AOAC ha inserito il metodo analitico in "Official Methods of Analysis" con il nome di "Defined Substrate Technology" (Colilert).

Recentemente la performance del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.

È applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche oligotrofe, clorate e comunque contenenti coliformi totali danneggiati. È di facile e rapido impiego.

8.1 Principio del metodo B

Il prodotto è già disponibile in commercio sotto forma di kit completo per l'inoculo del campione, utilizzabile in tubi e piastre multi-pozzetto, monouso, per lo svolgimento della tecnica del numero più probabile (MPN). Dopo un periodo di incubazione di 18 o 24 ore a $36\pm 1^\circ\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati: i pozzetti positivi per la presenza di coliformi totali hanno virato al giallo. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

8.2 Volume da analizzare

Il volume da analizzare per qualsiasi tipologia di acque è 100 mL, sia che si tratti del campione tal quale, sia di una sua diluizione, quest'ultima da determinare comunque in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

8.3 Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- sigillatore automatico.

8.4 Reattivi e terreni di coltura

Composizione:		
Ammonio solfato	5	g
Manganese solfato	0,5	mg
Zinco solfato	0,5	mg
Magnesio solfato	100	mg
Sodio cloruro	10	g
Calcio cloruro	50	g
Sodio solfito	40	g
Amfotericina B	1	mg
O-nitrofenil-β-D-galattopiranoside	0,5	g
4-metilumbellifenil-β-D-glucuronide	75	mg
Solanium	0,5	g
Hepes buffer		
Sali di sodio	5,3	g
Acido organico	6,9	g

8.4.1 Defined Substrate Technology (Colilert)

Il terreno disidratato viene distribuito in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il kit fornisce la possibilità di leggere i risultati dopo 18 o 24 ore.

8.5 Procedura

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, mescolare in un flacone sterile il terreno disidratato (8.4.1) con 100 mL di campione o di una sua diluizione. Chiudere il flacone e mescolare per sciogliere completamente il terreno. Attendere che l'eventuale formazione di schiuma sia sparita e versare il contenuto del flacone nella piastra sterile a 51 pozzetti o in quella a 97 pozzetti. Sigillare la piastra inocolata con l'apposito sigillatore automatico (8.3) che provvede anche alla distribuzione del campione all'interno dei pozzetti.

8.5.1 Incubazione

Incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ entrambi i tipi di piastre per un periodo di 18 ore per Colilert 18 e di 24 ore per Colilert.

8.5.2 Lettura e interpretazione dei risultati

I pozzetti che hanno virato al giallo sono considerati positivi per i coliformi totali. Senza diluizioni la piastra a 51 pozzetti permette la lettura da 1 a 200 microrganismi/100 mL; la piastra a 97 pozzetti permette la lettura da 1 a 2419 microrganismi/100 mL.

8.6 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione. I valori dell'indice MPN sono calcolati in base alla tabella specifica fornita con il kit di analisi.

8.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

9. METODO C. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi totali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito vengono proposti tre substrati di isolamento alternativi.

9.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

9.2 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

10. Reattivi e terreni di coltura

10.1. Terreni di isolamento

10.1.1 m-Endo agar (Les)

Composizione:

Estratto di lievito	1,2	g
Casitone	3,7	g
Tiopeptone	3,7	g
Triptosio	7,5	g
Lattosio	9,4	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,0	g
Dipotassio idrogeno fosfato	3,3	g
Sodio cloruro	3,7	g
Sodio desossicolato	0,1	g
Sodio lauril solfato	0,05	g
Sodio solfito	1,6	g
Fucsina basica	0,8	g
Agar	15,0	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il metodo che utilizza questo substrato è riportato nelle normative nazionali che richiedono la determinazione del parametro coliformi totali per la valutazione della qualità delle acque; pertanto viene necessariamente inserito tra i metodi proposti.

Nota: il terreno è classificato come Xn - Nocivo. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che la presenza di fucsina basica (Magenta I) comporta la possibilità di effetti irreversibili (R40) e il prodotto può presentare un rischio di cancerogenesi (categoria 1). Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizza. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata contenente 20 mL di etanolo al 95%, si distribuisce in capsule di Petri. È preferibile pre-

parare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce.

L'uso di questo substrato può comportare che coliformi danneggiati dai trattamenti che l'acqua ha subito non vengano rilevati e può permettere la crescita di microrganismi diversi da quelli ricercati. Pertanto può accadere che colonie rosse tipiche non siano formate da microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali, così come colonie atipiche possano originare da batteri coliformi. Pertanto, è consigliabile, qualora sorgano dubbi sulla natura delle colonie, sottoporre le colonie sospette a prove di conferma.

10.1.2 C-EC Agar

Composizione:		
Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.1.3 Chromogenic E.coli/Coliform Medium

Composizione:		
Miscela cromogenica	20,3	g
Estratto di lievito	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	2,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato monoacido	3,5	g
Potassio fosfato biacido	1,5	g
Rosso neutro	0,03	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Il terreno è adatto per la determinazione dei coliformi totali in acque con basse densità di microrganismi interferenti.

10.2 Substrato di crescita

10.2.1 Agar soia triptone

<i>Composizione:</i>		
Tryptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa $+4^{\circ}\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.3 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

10.3.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

<i>Composizione:</i>		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

Nota: è da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

11. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di $0,45\ \mu\text{m}$ di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

11.1 Lettura dei risultati

Dopo incubazione, sul terreno m-Endo Agar (Les) (10.1.1) la lettura dei risultati deve essere effettuata al più presto allo scopo di evitare che la luce provochi alterazioni cromatiche delle colonie cresciute.

Sono da considerare coliformi totali le colonie cresciute entro le 24 ore, di colore rosso con riflesso verde metallico.

Sul C-EC Agar (10.1.2) sono considerate coliformi totali le colonie di colore verde-blu cresciute entro le 24 ± 2 ore.

Sul substrato Chromogenic *E. coli*/Coliform Medium (10.1.3) sono considerate coliformi totali le colonie di colore rosa cresciute entro le 24 ± 2 ore.

È possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobacteriacee, a cui il gruppo dei coliformi totali appartiene, alla prova della citocromossidasi (12.1), quale prova di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

12. Conferma biochimica

12.1 Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su Agar soia triptone (10.2.1) ed incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. I coliformi sono ossidasi-negativi.

13. Procedura

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (10.3.1) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica dei coliformi totali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi ossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

14. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi totali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte a conferma, considerando la eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_t = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

15. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

BONADONNA L. (1994): "Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche", *Tecnica Sanitaria*, **32**, 151-159.

HAVELAAR A.H., HEISTERKAMP S.H., HOEKSTRA J.A. & MOOIJMAN K.A. (1993): "Performance characteristics of methods for the bacteriological examination of water", *Wat. Sci. Technol. "Technol."*, **97**, 1-13.