

EDITORIALE

In questo numero vengono presentati due contributi riguardanti l'analisi di microrganismi in matrici solide (fanghi, suoli, sedimenti). L'esecuzione di analisi microbiologiche su queste matrici risulta particolarmente complessa e laboriosa per la capacità di adesione dei microrganismi al substrato che rende i metodi tradizionalmente usati per il conteggio dei microrganismi nelle acque inadeguati. Nel primo contributo vengono presentati tre metodi analitici che consentono di determinare le salmonelle in alcune matrici ambientali solide, con particolare riguardo ai fanghi di depurazione. L'esigenza di armonizzazione delle metodiche fin qui utilizzate risulta di fondamentale importanza tenuto conto dell'influenza delle procedure di trattamento del campione solido sui risultati analitici. Diversi studi hanno evidenziato che la diffusione di batteri del genere *Salmonella* nell'ambiente può essere anche favorita dall'uso, come fertilizzanti, di fanghi non trattati; indagini svolte dove questa pratica è comunemente applicata hanno mostrato che nel fango non igienizzato è possibile rilevare concentrazioni variabili tra 2 e 5 milioni di salmonelle per litro con percentuali molto elevate di campioni positivi (97%).

In una fase, come l'attuale, di aggiornamento del D.Lgs. 99/92, che stabilisce le caratteristiche, le modalità e le condizioni in base alle quali i fanghi provenienti dal processo di depurazione delle acque reflue possono essere utilizzati in agricoltura ed annovera *Salmonella* tra i parametri da sottoporre a controllo, i metodi proposti possono costituire un riferimento per gli operatori addetti al controllo. Inoltre, possono rappresentare uno strumento applicativo utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per la ricerca del patogeno in matrici analoghe, come suoli e sedimenti.

Nel secondo contributo viene illustrata una metodica messa a punto presso l'IRSA-CNR per il distacco delle cellule batteriche associate al sedimento fluviale.

La quantificazione dell'abbondanza dei microrganismi negli ambienti acquatici è un parametro di base per comprendere il ruolo delle comunità microbiche nei processi ecosistemici. Negli ultimi anni, le misure di abbondanza microbica sono principalmente effettuate utilizzando la microscopia ad epifluorescenza e la citometria a flusso, associate all'utilizzo di coloranti fluorescenti specifici per la marcatura degli acidi nucleici cellulari.

Tuttavia, quando i microrganismi sono associati ai sedimenti di fondo, l'applicazione di questi metodi è resa problematica dalla presenza di particelle di detrito e di materiale organico che possono mascherare il segnale fluorescente specifico delle cellule. Fino ad oggi sono stati proposti diversi metodi per l'estrazione e la conta diretta delle cellule associate a diverse matrici ambientali, tuttavia non si è ancora pervenuti ad una procedura standardizzata, soprattutto per quanto riguarda il sedimento di ambienti fluviali.

Infine, a conclusione del 1° Circuito interlaboratoriale per l'analisi dei microrganismi filamentosi del fango attivo, che ha visto la partecipazione di 23 laboratori, ci è sembrato utile riesaminare l'attività svolta, richiamando gli elementi più significativi del circuito stesso e fare alcune riflessioni sui futuri sviluppi dell'iniziativa. Abbiamo il piacere di segnalare che dai laboratori partecipanti è stato assunto l'impegno di dare periodicità all'iniziativa e di prevedere l'organizzazione del 2° circuito interlaboratoriale nel corso del 2010.

Dr. Maurizio Pettine
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, dicembre 2009

INDICE

| | |
|---|-------|
| SALMONELLA spp. IN MATRICI AMBIENTALI SOLIDE: METODOLOGIE DI ANALISI | 2-19 |
| QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE BATTERICHE ASSOCIATE A SEDIMENTO FLUVIALE MEDIANTE MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA E CITOMETRIA A FLUSSO | 19-23 |
| RISULTATI DEL 1° CIRCUITO INTERLABORATORIALE PER L'ANALISI MICROSCOPICA DEI MICRORGANISMI FILAMENTOSI DEL FANGO ATTIVO | 23-29 |

SALMONELLA spp. IN MATRICI AMBIENTALI SOLIDE: METODOLOGIE DI ANALISI

a cura di Bonadonna L.*, Nusca A.*

* Istituto Superiore di Sanità, Roma

RIASSUNTO

In considerazione della complessità associata all'analisi microbiologica di matrici ambientali solide e alla rilevanza sanitaria del patogeno *Salmonella*, sono descritti tre metodi analitici che permettono di determinare il batterio in alcune matrici ambientali solide con particolare riguardo ai fanghi di depurazione. I metodi potrebbero essere considerati come riferimento a fronte di una indicazione di carattere tecnico dettata dalla legislazione italiana e possono rappresentare uno strumento applicativo utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per la ricerca del patogeno in matrici analoghe, come suoli e sedimenti.

INTRODUZIONE

I microrganismi, e in special modo i batteri, sono in grado di colonizzare e svilupparsi in habitat caratterizzati da condizioni fisico-chimiche ampiamente diverse che conducono alla formazione di microambienti variamente popolati e diversificati.

In particolare, le superfici umide rappresentano un substrato particolarmente adatto all'adesione di microrganismi che tendono a formare, su di esse, biofilm, struttura eterogenea costituita da microcolonie incapsulate in una matrice polisaccaridica. È noto, ad esempio, che sul particolato la disponibilità di nutrienti è molto più elevata rispetto ad una soluzione acquosa, l'attività metabolica è più intensa ed il numero di cellule più elevato poiché i microrganismi adesi catabolizzano, direttamente, i composti di cui il microgranulo è costituito.

Il particolato svolge anche una funzione protettiva nei confronti dei microrganismi se esposti all'effetto di fattori abiotici e biotici (presenza di disinfettanti, radiazioni ultraviolette, metalli pesanti, infezione da parte di batteriofagi). In questo caso, ad una maggiore capacità di sopravvivenza da parte dei microrganismi (85 volte più alta rispetto a quella di microrganismi diffusi in una colonna d'acqua), può corrispondere un aumento delle concentrazioni microbiche (di 100 – 1000 volte) su particelle in sospensione rispetto all'acqua in cui sono immerse.

In campo analitico, la stima della concentrazione microbica presente in matrici solide (fanghi, suoli, sedimenti) risulta, proprio per le capacità di adesione dei microrganismi al substrato, particolarmente complessa e laboriosa e i metodi, tradizionalmente usati per il conteggio dei microrganismi nelle acque, sono generalmente inadatti.

In ambito sanitario risulta particolarmente rilevante l'analisi microbiologica dei fanghi di depurazione se si considera che essi, come prodotti di risulta derivati dai processi di trattamento dei liquami, costituiscono il concentrato di tutti gli inquinanti presenti nei reflui. In particolare, se si tiene conto che il numero dei microrganismi concentrati nei fanghi supera quello presente nelle acque reflue grezze, la determinazione delle caratteristiche microbiologiche dei fanghi, soprattutto se utilizzati a scopo agricolo, assume un ruolo rilevante in campo sanitario. Il problema di rendere igienicamente innocui i fanghi si pone soprattutto, e in modo prioritario, qualora essi vengano sparsi sui suoli dove, esaltando i processi biologici, possono favorire la crescita della vegetazione. Tuttavia la presenza di batteri, virus e parassiti (protozoi e metazoi), inglobati nei fanghi, può rappresentare un rischio sanitario e una limitazione per questa pratica di recupero. Il rischio è legato sia alla contaminazione di colture vegetali che possono, attraverso la catena alimentare, essere veicolo di trasmissione di malattie sia alla contaminazione dei corpi idrici per effetto dei processi di dilavamento.

Se il rischio può essere correlato più facilmente alla presenza di virus e di strutture microbiche più resistenti (uova e cisti di metazoi e protozoi, spore batteriche), tuttavia anche le forme microbiche vegetative possono trovare condizioni favorevoli per la loro sopravvivenza e moltiplicazione. Infatti, benché i patogeni più comuni possano essere ritrovati nei fanghi, solo alcuni vi si trovano con una frequenza significativa. In particolare, i microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae possono raggiungere nei fanghi elevate concentrazioni. Tra i patogeni compresi in questa famiglia, *Salmonella*, per la sua potenziale maggiore diffusione nella popolazione e per il suo tradizionale ruolo di patogeno enterico, è il microrganismo più comunemente ricercato.

Diversi studi hanno messo in evidenza che la diffusione di *Salmonella* nell'ambiente può essere favorita dall'uso, come fertilizzanti, di fanghi non trattati; indagini svolte dove questa pratica è comunemente applicata hanno messo in evidenza che nel fango non igienizzato è possibile rilevare concentrazioni variabili tra 2 e 5 milioni di salmonelle per litro con percentuali molto elevate di campioni positivi (97%).

I processi di trattamento del fango sono comunque in grado di ridurre il numero di salmonelle, come di tutti i microrganismi presenti, anche se i diversi trattamenti possono produrre differenti risultati. Infatti, se la digestione anaerobica mesofila permette di ridurre di due unità logaritmiche il numero di *Salmonella*, con la digestione aerobica mesofila si raggiunge un abbattimento di tre unità logaritmiche della sua concentrazione, mentre la digestione aerobica a freddo consente un abbattimento di un solo fattore logaritmico (Mohaibes e Heinonen-Tanski, 2004).

I processi biologici che si svolgono nei suoli sono influenzati in ampia misura dalla temperatura e i microrganismi apportati al suolo con i fanghi vengono ad inserirsi in un equilibrio preesistente non sempre ad essi favorevole. Suoli neutri o alcalini e umidi, così come anche periodi piovosi e basse temperature, possono allungare i tempi di sopravvivenza dei microrganismi. È stato ripetutamente osservato che ad alte temperature, in un ambito in cui i valori massimi non sono comunque letali, i tempi di sopravvivenza sono nettamente inferiori, probabilmente per un aumento della competizione con la flora autoctona antagonista. In particolare, la capacità di sopravvivenza di *Salmonella* in suoli trattati con fanghi dipende in modo prevalente da fattori climatici, anche se, in funzione dei diversi sierotipi, i tempi di sopravvivenza possono ampiamente variare (30 ÷ 365 giorni).

La ricerca di *Salmonella* nei fanghi di depurazione, come anche in matrici simili, può fornire risultati diversi quando gli stessi campioni vengono contemporaneamente analizzati con metodiche diverse. Infatti, possono essere calcolate differenze significative nelle medie dei valori ottenuti se, preventivamente, sul campione viene o meno praticato un pretrattamento prima dell'esame microbiologico. Poiché a influenzare i risultati di analisi volte al rilevamento dei microrganismi presenti in matrici solide sono le caratteristiche fisico-strutturali, pretrattamenti dei campioni (es., agitazione) possono permettere la disgregazione delle particelle con conseguente rilascio e separazione dei microrganismi in esse aggregati.

È in questo contesto che emerge la necessità di presentare metodi analitici che soddisfino caratteristiche di adeguatezza per questi tipi di campioni.

Pertanto, di seguito sono descritti tre metodi analitici che permettono di determinare *Salmonella* in alcune matrici ambientali solide, con particolare riguardo ai fanghi di depurazione.

I metodi potrebbero essere considerati come riferimento a fronte di una indicazione di carattere tecnico dettata dalla legislazione italiana e possono rappresentare uno strumento applicativo utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per la ricerca del patogeno in matrici analoghe, come suoli e sedimenti.

DEFINIZIONI

***Salmonella* spp.**

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, C8-esterasi positivi, non fermentanti il lattosio, saccarosio e salicina. La morfologia è simile a quella degli altri enterobatteri; sono mobili per la presenza di flagelli peritrichi (eccetto i sierotipi *S. gallinarum* e *S. pullorum* che sono immobili). La maggior parte forma fimbrie; alcuni ceppi del sierotipo *S. enteritidis* e *S. typhimurium* producono fimbrie sottili che li rendono non agglutinabili con i sieri anti-O. Ad oggi sono riconosciuti 2300 sierotipi di *Salmonella*, differenziabili sulla base dei diversi caratteri antigenici: antigeni somatici (O), capsulari (Vi) e antigeni flagellari (H).

Unità Formanti Colonia (UFC)

È un valore che rappresenta il numero di colonie visibili formate da singole cellule batteriche in crescita su appropriate piastre agarizzate.

Rivitalizzazione

Consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati e per questo non in grado di crescere direttamente su terreno agarizzato.

Rivitalizzazione quantitativa

Consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati isolati su una membrana filtrante, prima del trasferimento su terreno cromogeno, distinti come singole colonie.

PROCEDURE ANALITICHE

METODO 1

Filtrazione su membrana

1 - CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura di analisi descritta può essere utilizzata per il rilevamento di *Salmonella* spp. in campioni di fanghi di depurazione, altri fanghi trattati e non trattati, suoli anche concimati e sedimenti.

Il metodo è particolarmente adatto per valutare l'efficienza delle procedure di trattamento volte all'abbattimento di patogeni nei fanghi di depurazione. Il metodo non è adatto per fanghi trattati che contengono meno di 1 UFC di *Salmonella* spp. per grammo di peso umido e comunque per fanghi non trattati caratterizzati da basse concentrazioni di *Salmonella*.

2 - PRINCIPIO DEL METODO

Salmonella spp. è in grado di svilupparsi in brodo al Tetratonato alla temperatura di $36 \pm 2^\circ\text{C}$ e di crescere su Rambach agar a $36 \pm 2^\circ\text{C}$, grazie alla fermentazione del glicole polipropilenico e alla produzione di acido.

Il campione, diluito in funzione della concentrazione stimata di *Salmonella* nel campione ed omogeneizzato mediante apparecchiatura di miscelazione (tipo per analisi degli alimenti) è centrifugato e filtrato; la membrana è recuperata asepticamente ed incubata a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ su un disco in fibra di vetro sterile imbibito con il terreno di rivitalizzazione (Brodo al Tetratonato). Dopo 24 ore la membrana è recuperata asepticamente ed incubata a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ su terreno cromogeno (Rambach® agar). Le membrane sono esaminate dopo 24 e 48 ore (in questo caso per rilevare la più esigente *S. dublin*); dopo incubazione si procede a quantificare le colonie. Le salmonelle presuntive crescono su questo terreno come colonie di un colore rosso brillante, derivante dalla fermentazione del glicole propilenico; altre enterobatteriacee appaiono blu, verdi, viola o incolori per la loro incapacità di fermentare il glicole propilenico. Inoltre, alcune producono β -galattosidasi che idrolizza l'X-gal incolore (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside) presente nel terreno producendo colonie blu. Per distinguere *Salmonella* spp. dall'occasionale presenza di *Citrobacter* spp., nebulizzare una soluzione di 4-metilumbelliferil caprilato (1 mg/mL) in etanolo direttamente sulla membrana posta su Rambach agar. La presenza di *Salmonella* spp. è segnalata dalla fluorescenza emessa dalle colonie sotto la luce UV a 366 nm, derivante dalla reazione di idrolisi del 4-metilumbelliferil caprilato, operata dall'enzima C8 esterasi, presente nelle salmonelle. Alcune salmonelle non fermentanti il glicole propilenico (*S. typhi* e *S. paratyphi*) crescono come colonie incolori.

Il limite di determinazione del metodo è approssimativamente di 3 UFC per grammo di peso umido, in funzione della quantità di parte solida che, ad alta concentrazione - >20% (w/v) -, può ridurre il volume di campione da filtrare, se non è diluito.

3 - REAGENTI, DILUENTI E TERRENI COLTURALI

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

L'uso di prodotti chimici di altro grado analitico è consentito purché sia dimostrato che, nell'analisi, essi forniscano prestazioni equivalenti.

3.1 - Soluzione salina tamponata (SST)

Composizione

| | | |
|-----------------------------|------|----|
| Cloruro di sodio | 8 | g |
| Cloruro di potassio | 0,2 | g |
| Sodio fosfato bibasico | 1,15 | g |
| Potassio fosfato monobasico | 0,2 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7 \pm 0,2$. Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.2 - Brodo al Triptone e Soia modificato (MTSB)

3.2.1 - Soluzione di Novobiocina

Composizione

| | | |
|------------------|----|----|
| Novobiocina | 1 | g |
| Acqua distillata | 10 | mL |

Asepticamente, sciogliere 1 g di Novobiocina in 10 mL di acqua distillata e sterilizzare per filtrazione su una membrana con porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$. Conservare la soluzione a $-14 \pm 2^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

3.2.2 - Terreno completo di Brodo al Triptone e Soia modificato

Composizione

| | | |
|---|------|----|
| Digerito pancreatico di caseina (triptone) | 17 | g |
| Digerito papainico di farina di soia (peptone di soia) | 3 | g |
| Glucosio | 2,5 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Potassio fosfato monoacido (K ₂ HPO ₄) | 2,5 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Sciogliere gli ingredienti in agitazione e, se necessario, aggiustare il pH a $7 \pm 0,2$. Aggiungere i supplementi nelle concentrazioni sotto indicate:

| | | |
|---|-----|---|
| Sali di bile n. 3 | 1,5 | g |
| Potassio fosfato monoacido (K ₂ HPO ₄) | 1,5 | g |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di un mese. Immediatamente prima dell'uso, aggiungere la soluzione di novobiocina sterile filtrata per ottenere una concentrazione finale di 40 mg/L.

3.3 - Terreno di rivitalizzazione: Brodo al Tetratonato

Composizione

| | | |
|-------------------------------|------|----|
| Lab-Lemco (estratto di carne) | 0,9 | g |
| Peptone | 4,5 | g |
| Estratto di lievito | 1,8 | g |
| Cloruro di sodio | 4,5 | g |
| Carbonato di calcio | 25 | g |
| Sodio tiosolfato pentaidrato | 40,7 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata sotto agitazione e aggiustare il pH a $8 \pm 0,2$; portare lentamente ad ebollizione, quindi lasciare raffreddare lentamente a $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di un mese. Prima dell'uso aggiungere 20 mL di una soluzione iodio-ioduro.

3.3.1 - Soluzione iodio-ioduro

Composizione

| | | |
|------------------|----|----|
| Iodio | 6 | g |
| Potassio ioduro | 5 | g |
| Acqua distillata | 20 | mL |

Immediatamente prima dell'uso, aggiungere la soluzione sterile di novobiocina filtrata, appena preparata, per ottenere una concentrazione finale di 40 mg/L.

3.4 - Rambach® agar

Composizione

| | | |
|------------------------|------|----|
| Peptone | 8 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Desossicolato di sodio | 1 | g |
| Miscela cromogena | 1,5 | g |
| Glicole propilenico | 10,5 | g |
| Agar | 15 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. In funzione della quantità di terreno da preparare, aggiungere un volume di acqua distillata alla miscela cromogena già pronta nella confezione. Agitare fino alla completa dissoluzione dei componenti. Aggiungere la fiala del terreno disidratato e riscaldare agitando frequentemente. Il tempo di solubilizzazione di una sospensione di 250 mL è di 20÷25 minuti; per la solubilizzazione di 1000 mL di terreno sono necessari 35÷40 minuti. Non sterilizzare, non surriscaldare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare ad una temperatura non inferiore a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

Il substrato è classificato come tossico nocivo (Xn) e irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e Tris(idrossimetil-aminometano). Se inalato, può causare irritazioni alla pelle e problemi respiratori. Durante la manipolazione del terreno, è raccomandato l'uso della cappa a flusso laminare. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

3.5 - Soluzione di 4-metilumbelliferil caprilato (C8 esterasi)

Composizione

| | | |
|--------------------------------|----|---|
| 4-metil umbelliferil caprilato | 1 | % |
| Eptano | 99 | % |

Prodotto brevettato, disponibile in commercio, da usare e conservare secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il prodotto è classificato come infiammabile (F) e irritante (Xi) per la presenza di eptano. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego ed utilizzare Dispositivi di Protezione Individuali.

3.6 - Soluzione salina peptonata

Composizione

| | | |
|------------------|------|----|
| Peptone | 1 | g |
| Cloruro di sodio | 8,5 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7 \pm 0,2$. Riscaldare agitando frequentemente. Sterilizzare la soluzione in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

4 - STRUMENTAZIONI ED APPARECCHIATURE

Oltre la normale attrezzatura di laboratorio, è necessario avere a disposizione:

- omogeneizzatore (tipo per analisi di alimenti);
- centrifuga;
- lampada di Wood a 366 nm;
- nebulizzatore;
- contenitori sterili per omogeneizzatore;
- filtri di fibra di vetro.

5 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

Durante il campionamento, operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza. Prelevare campioni di non meno di 100 g di peso umido; portarli in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo.

Durante il trasporto e lo stoccaggio, per evitare fenomeni di moltiplicazione o inattivazione cellulare, mantenere refrigerati i campioni a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per un massimo di 36 ore.

Mantenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

6 - PROCEDURA

6.1 - Preparazione del campione

Pesare un sub-campione rappresentativo di 25 g (peso umido) del campione in un contenitore da 250 mL.

Aggiungere un appropriato volume di SST a pH 7,0 per ottenere un volume finale di 250 mL e mescolare usando un omogeneizzatore. Misurare il pH in un'aliquota del campione.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ con acido cloridrico 1 M, agitando per assicurare un'omogeneizzazione completa del campione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es.: acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

I campioni da analizzare possono contenere quantità variabili di materiale solido; pertanto, alcuni di essi potranno richiedere una fase di centrifugazione e di prefiltrazione prima di essere analizzati per filtrazione. In questo caso, trasferire il contenuto del recipiente in un sacchetto sterile per omogeneizzatore, con o senza filtro integrato per escludere le particelle più grandi, ed omogeneizzare per 2 minuti. Trasferire il contenuto del sacchetto in 5 tubi conici sterili da centrifuga e centrifugare le 5 aliquote da 50 mL per 3 minuti, impostando una velocità di $200 \text{ g} \div 300 \text{ g/minuto}$.

Decantare, in un beaker, il supernatante e filtrare attraverso un pre-filtro in fibra di vetro di diametro di 47 mm e porosità di $2,7 \mu\text{m}$ per rimuovere i detriti più fini. Per evitare intasamenti, non versare il campione nell'imbuto da filtrazione in un'unica fase. Una volta terminata la prefiltrazione, trasferire il filtrato in un contenitore sterile da 250 mL.

6.2 - Diluizione del campione

Il numero delle diluizioni del campione da filtrare successivamente varia in funzione della concentrazione stimata di *Salmonella* nel campione. Solitamente, la diluizione A (il filtrato) dovrebbe essere diluita in modo seriale da 10^{-1} a 10^{-3} con MTSB. Questo può permettere di ottenere conteggi fino a 10^5 salmonelle per grammo di peso umido del campione. Livelli di contaminazione di *Salmonella* più alti richiederanno ulteriori diluizioni (fino a 10^{-4} a 10^{-5}).

Preparare un numero adatto di contenitori sterili a seconda del numero di diluizioni selezionate e aggiungere 90 mL di MTSB in ciascun contenitore.

Usando una pipetta sterile, trasferire 10 mL del filtrato nei 90 mL di MTSB e mescolare bene utilizzando un agitatore.

Usando una nuova pipetta, trasferire 10 mL del filtrato diluito in 90 mL di MTSB e mescolare bene utilizzando un agitatore.

Procedere come sopra descritto per preparare tutte le diluizioni necessarie.

6.3 - Filtrazione per membrana

Prima della fase di filtrazione, inserire, in tante capsule di Petri quante sono le diluizioni, filtri di fibra di vetro saturati con il Brodo al Tetrionato ($2 \pm 0,5$ mL).

Aggiungere una quantità sufficiente di Soluzione salina tamponata ($15 \pm 0,5$ mL) nell'apparato di filtrazione; pipettare 10 mL del campione diluito nell'apparato di filtrazione. Filtrare il campione attraverso una membrana quadrettata sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di $0,45 \mu\text{m}$. Rimuovere la membrana e trasferirla nella capsula contenente il prefiltra imbevuto. Come di norma, poggiare la membrana con un movimento rotatorio per prevenire la formazione di bolle di aria tra il terreno colturale e la membrana. Qualsiasi membrana aggrinzita o strappata rinvenuta dopo la filtrazione deve essere scartata.

Prima di filtrare la prima diluizione, filtrare un controllo negativo, cioè 10 mL di MTSB. Dopo l'ultima diluizione, filtrare un controllo negativo (10 mL di MTSB) e un controllo positivo (per esempio: una sospensione di *Salmonella* spp. di un ceppo certificato contenente 10^2 microrganismi).

6.4 - Rivitalizzazione e conteggio delle colonie su substrato cromogeno

Incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore. Rimuovere le membrane dai filtri di fibra di vetro imbevuti di Brodo al Tetrionato mediante pinzette sterili e trasferirle sulla superficie di capsule di Petri contenenti Rambach agar. Incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 24 ore e 48 ore.

Contare le colonie tipiche rosa come presuntive. *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* e *S. senftenberg* possono essere rilevate già dopo 24 ore. Tuttavia, per il rilevamento di ceppi più esigenti come *Salmonella dublin*, possono essere necessarie 48 ore.

6.5 - Conferma delle colonie

Le colonie tipiche presuntive devono essere confermate entro le 48 ore; dopo aver aerosolizzato sulle capsule di Petri contenenti Rambach agar una soluzione di C_8 esterasi, contare le colonie sotto la luce ultravioletta a 366 nm. Prima di procedere al conteggio, far evaporare l'eccesso della C_8 esterasi. Il rilevamento di colonie fluorescenti conferma la presenza di *Salmonella*. Per il calcolo dei risultati, sarebbe opportuno, tenere in considerazione la norma UNI EN ISO 8199:2008 (2008).

6.6 - Determinazione del peso secco

Il numero di salmonelle può essere calcolato in relazione al peso umido o al peso secco.

Per determinare quest'ultimo, fare, preferibilmente, riferimento al metodo riportato in UNI EN 12880:2002 (2002) ed eseguire la determinazione in parallelo con le analisi microbiologiche.

7 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di salmonelle (presente in un g di peso umido del campione originale) viene calcolato moltiplicando il numero delle colonie tipiche e fluorescenti per il fattore di diluizione complessivo. Considerare le diluizioni che, dopo conferma delle colonie sul substrato Rambach agar, rientrano in un numero compreso nell'intervallo tra 10 e 100 colonie tipiche. Se non ci sono conteggi in questo intervallo può essere opportuno considerare conte al di fuori di questo intervallo a condizione che sia possibile una enumerazione accurata.

Calcolare il numero di colonie per g di peso umido in base alla formula:

$$c = n/abv$$

dove

c = concentrazione di *Salmonella* per peso umido espressa come numero per grammo

n = numero totale di colonie tipiche di *Salmonella* nelle diluizioni selezionate

a = fattore iniziale di diluizione

b = fattore di diluizione per le diluizioni seriali

v = volume totale filtrato attraverso le membrane delle diluizioni selezionate

Esempio:

Se il volume filtrato della diluizione v è 10 mL e ci sono due conte che, ottenute alle rispettive diluizioni (v_1 e v_2), rientrano nell'intervallo 10 - 100:

| Diluizione | conte |
|------------|------------|
| 10^{-2} | 81 colonie |
| 10^{-3} | 15 colonie |

si ottiene:

n = numero di colonie ($81+15 = 96$)

a = fattore iniziale di diluizione (10^{-1})

b = fattore di diluizione delle diluizioni scelte (10^{-2} e 10^{-3})

v = volume filtrato (10 mL)

$c = 96/(0,1 \times 0,01 \times 10) + (0,1 \times 0,001 \times 10)$

$c = 96/0,011 = 8,7 \times 10^3$ concentrazione di *Salmonella* per g di peso umido del campione originale (ufc/g di peso umido)

Il numero di colonie per g di peso secco del campione è calcolato in base alla formula:

$$c = (n/abve) \times 100$$

e = residuo secco (%) del campione umido originale.

8 - PRESTAZIONE DEL METODO

Su alcuni campioni di matrici solide, comprendenti, fanghi di depurazione a diverse fasi di trattamento e compostati, durante un circuito interlaboratoriale europeo sono state determinate alcune caratteristiche di prestazione del metodo (Report 3, 2007).

Precisione del metodo

| Limite di rilevamento (5%) | Limite superiore di quantificazione (5%) | Intervallo di quantificazione | Dispersione U^2 |
|--------------------------------------|--|-------------------------------|-------------------|
| <i>Salmonella</i> spp. /g peso umido | <i>Salmonella</i> spp. /g peso umido | Unità log10 | |
| 2,70 | $1,32 \times 10^{10}$ | 9,68 | < 0,05 |

Valori di ripetibilità e riproducibilità

| Matrice/campione | Media totale | Ripetibilità (scala log) | Riproducibilità (scala log) |
|------------------|--------------|--------------------------|-----------------------------|
| 1 | 14 | 0,759 | 2,014 |
| 2 | 18 | 1,206 | 2,421 |
| 3 | 390886 | 0,709 | 0,962 |
| 4 | 259263 | 0,283 | 2,045 |
| 5 | 191740 | 0,713 | 3,853 |
| 6 | 1030 | 0,447 | 1,463 |
| 7 | 6384 | 0,514 | 2,199 |
| 8 | 19616 | 0,543 | 2,299 |
| 9 | 40327 | 0,807 | 0,996 |
| 10 | 13302 | 0,737 | 2,514 |
| 11 | 1046 | 2,344 | 3,892 |

| | | |
|---------------------|--|--|
| Per g di peso umido | Differenza massima tra 2 misure indipendenti su scala log (95% dei casi) | Differenza massima tra 2 misure indipendenti su scala log (95% dei casi) |
|---------------------|--|--|

METODO 2

Determinazione semiquantitativa con tecnica della conta del Numero Più Probabile (MPN)

1 - CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura di analisi descritta può essere utilizzata per il rilevamento di *Salmonella* spp. in campioni di fanghi di depurazione, altri fanghi trattati e non trattati, suoli anche concimati e sedimenti.

2 - PRINCIPIO DEL METODO

Salmonella è in grado di riprodursi nel brodo alla selenite-cistina a $36 \pm 2^\circ\text{C}$, nel brodo di arricchimento-selettivo di Rappaport Vassiliadis a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ e di produrre colonie su Rambach agar oppure su Xilosio Lisina Desossicolato (XLD) agar a $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

Con questa procedura, alcune salmonelle come *S. typhi* e *S. paratyphi* non sono rilevabili.

Per eseguire la tecnica del Numero Più Probabile (MPN) è necessario utilizzare sei serie di tre beute o di tubi contenenti diluizioni seriali della sospensione del campione.

Il rilevamento di *Salmonella* spp. prevede quattro fasi:

- crescita dei batteri in un terreno selettivo primario;
- arricchimento in un terreno selettivo secondario che inibisce la crescita degli altri microrganismi favorendo quella di *Salmonella* spp ;
- isolamento su terreni solidi specifici e selettivi;
- test di identificazione biochimici e sierologici.

3 - REAGENTI, DILUENTI E TERRENI CULTURALI

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti utilizzando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure diluenti disidratati o terreni completi, preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

L'uso di prodotti chimici di altro grado analitico è consentito purché sia dimostrato che, nell'analisi, forniscano prestazioni equivalenti.

3.1 - Soluzione salina peptonata

Composizione

| | | |
|------------------|------|----|
| Peptone | 1 | g |
| Cloruro di sodio | 8,5 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata, si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Sterilizzare la soluzione in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Aggiustare il pH finale a $7 \pm 0,2$. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

3.2 - Brodo alla selenite e cistina

Composizione

| | | |
|------------------------|------|----|
| Peptone di caseina | 5 | g |
| Lattosio | 4 | g |
| Sodio fosfato bibasico | 10 | g |
| Sodio selenito acido | 4 | g |
| L-cistina | 0,01 | g |
| Acqua distillata | 900 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere asepticamente i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente e distribuire in beute sterili da 125 mL in ragione di 90 mL/beuta e in tubi da 25 mL in ragione di 9 mL/tubo. Aggiustare il pH finale a $7 \pm 0,2$. Non surriscaldare e non autoclavare; poiché la selenite è altamente tossica, lavorare utilizzando Dispositivi di Protezione Individuale.

3.3 - Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione

| | | |
|-------------------------------|-------|----|
| Peptone di soia | 4,5 | g |
| Cloruro di magnesio esaidrato | 28,6 | g |
| Cloruro di sodio | 7,2 | g |
| Potassio fosfato bibasico | 0,18 | g |
| Potassio fosfato monobasico | 1,26 | g |
| Verde malachite ossalato | 0,036 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti in acqua distillata e riscaldare agitando frequentemente. Aggiustare il pH finale a $5,2 \pm 0,1$. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo), sterilizzare in autoclave a $115 \pm 2^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

3.4 - Xilosio-Lisina-Desossicolato agar (XLD agar)

3.4.1 - Soluzione al rosso fenolo

Composizione

| | | |
|---------------------------------------|------|----|
| Rosso fenolo | 1 | g |
| Soluzione di idrossido di sodio 0,1 M | 1,25 | mL |
| Acqua distillata | 250 | mL |

Sospendere 1 g di rosso fenolo in 1,25 mL di una soluzione di idrossido di sodio e portare la soluzione a 250 mL con acqua distillata.

3.4.2 - Terreno completo XLD agar

Composizione

| | | |
|---------------------|------|----|
| Estratto di lievito | 3 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| L-lisina cloridrato | 5 | g |
| Agar | 12,5 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno completo si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Sospendere i componenti e riscaldare la miscela fino a completa soluzione. Sterilizzare in autoclave per 15 ± 1 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ e aggiungere i supplementi nelle concentrazioni sotto indicate:

| | | |
|---------------------------|------|----|
| Lattosio | 7,5 | g |
| Saccarosio | 7,5 | g |
| Xilosio | 3,75 | g |
| Sodio desossicolato | 1 | g |
| Sodio tiosolfato | 6,8 | g |
| Ferro ammonio citrato | 0,8 | g |
| Soluzione di rosso fenolo | 20 | mL |

Aggiungere asepticamente i supplementi alla miscela sterile ed aggiustare il pH a $7,4 \pm 0,2$. Riscaldare a bagnomaria per 45 ± 1 minuti; versare in capsule di Petri e lasciare solidificare.

3.5 – Terreno cromogeno Rambach® agar

Composizione

| | | |
|------------------------|------|----|
| Peptone | 8 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Desossicolato di sodio | 1 | g |
| Miscela cromogena | 1,5 | g |
| Glicole propilenico | 10,5 | g |
| Agar | 15 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere la fiala del terreno disidratato e riscaldare agitando frequentemente. Agitare fino alla completa dissoluzione dei componenti. Il tempo di solubilizzazione di una sospensione di 250 mL è di $20 \div 25$ minuti; per la solubilizzazione di 1000 mL di terreno sono necessari $35 \div 40$ minuti. Non sterilizzare, non surriscaldare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare ad una temperatura non inferiore a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

Il substrato è classificato come tossico nocivo (Xn) e irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e Tris(idrossimetil-aminometano). Consultare la scheda di sicurezza prima della preparazione.

3.6 - Terreno all'urea

3.6.1 - Terreno di base all'urea

Composizione

| | | |
|-----------------------------|-------|----|
| Triptone | 1 | g |
| Glucosio | 1 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Potassio fosfato monobasico | 2 | g |
| Miscela cromogena | 1,5 | g |
| Rosso fenolo | 0,012 | g |
| Agar | 12 | g |
| Acqua distillata | 950 | mL |

Sciogliere gli ingredienti mediante agitazione riscaldando la soluzione. Aggiustare il valore di pH dopo sterilizzazione a $\text{pH } 6,8 \pm 0,1$. Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

3.6.2 - Soluzione di urea

Sospendere l'urea in acqua distillata portando a un volume di 1000 mL. Sterilizzare la soluzione per filtrazione attraverso un filtro sterile con porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$.

3.6.3 - Terreno all'urea completo

Il terreno si trova anche in commercio. Per la sua preparazione e conservazione seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Sciogliere il terreno di base all'urea, raffreddarlo alla temperatura di $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ed a 950 mL aggiungere asepticamente 50 mL della soluzione di urea.

Distribuire in tubi sterili in ragione di circa 10 mL/tubo, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

3.7 - Brodo al triptofano-triptone per la prova della produzione dell'indolo

Composizione

| | | |
|------------------|------|----|
| Triptone | 10 | g |
| DL-triptofano | 1 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Aggiustare il pH dopo sterilizzazione a un valore di $7,4 \pm 0,1$. Distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

3.8 - Reattivo di Kovacs

Composizione

| | | |
|--------------------------------------|----|----|
| Para-dimetilaminobenzaldeide | 5 | g |
| Alcool amilico | 75 | mL |
| Acido cloridrico concentrato (0,1 M) | 25 | mL |

Il reattivo si trova anche in commercio già pronto per l'uso. Sciogliere la para-dimetilaminobenzaldeide in 75 mL di alcool amilico e riscaldare a bagnomaria a 60°C per 5 minuti. Aggiungere 25 mL di acido cloridrico (0,1 M). Il reattivo sarà pronto per l'uso dopo circa 6 – 7 ore (colorazione gialla). Mantenere a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e proteggere dalla luce.

Il reattivo è un prodotto nocivo, deve essere preparato sotto cappa chimica.

3.9 - Terreno per la prova della lisina decarbossilasi

3.9.1 - Soluzione di porpora di bromocresolo

Composizione

| | | |
|-------------------------|-----|----|
| Porpora di bromocresolo | 1 | g |
| Acqua distillata | 100 | mL |

Sospendere il porpora di bromocresolo in acqua distillata.

3.9.2 - Terreno completo per la prova della lisina decarbossilasi

Composizione

| | | |
|--------------------------------------|------|----|
| L-lisina | 5 | g |
| Estratto di lievito | 3 | g |
| Glucosio | 1 | g |
| Soluzione di porpora di bromocresolo | 1,5 | mL |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente in un bagnomaria. Aggiustare il valore di pH usando una soluzione di idrossido di sodio (0,1 M) per ottenere dopo sterilizzazione un pH di $6,8 \pm 0,1$. Distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

3.10 - Triptone soia agar

Composizione

| | | |
|------------------|------|----|
| Triptone | 15 | g |
| Peptone di soia | 5 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Agar | 20 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare fino a completa soluzione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4 - STRUMENTAZIONI ED APPARECCHIATURE

Oltre la normale attrezzatura di laboratorio, è necessario avere a disposizione:

- contenitori sterili per omogeneizzatore;
- omogeneizzatore (tipo per analisi di alimenti).

5 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

Durante il campionamento, operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza. Raccogliere campioni non inferiori a 100 g di peso umido e portarli in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo.

Durante il trasporto e lo stoccaggio, per evitare fenomeni di moltiplicazione o inattivazione cellulare, mantenere i campioni refrigerati a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Procedere all'analisi preferibilmente entro 36 ore.

6 - PROCEDURA

6.1 - Preparazione del campione

6.1.1- Determinazione del peso secco

Il numero di salmonelle può essere calcolato in relazione al peso umido o al peso secco. Per determinare quest'ultimo, preferibilmente fare riferimento al metodo riportato in UNI EN 12880:2002 ed eseguire la determinazione in parallelo con le analisi microbiologiche.

6.1.2 - Preparazione della sospensione

Sospendere un sub-campione rappresentativo di 25 g (in peso umido) in un appropriato volume di soluzione salina peptonata per raggiungere un volume finale di 250 mL. Omogeneizzare per 2 minuti, procedere immediatamente all'analisi.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ con acido cloridrico 1 M, agitando per assicurare un'omogeneizzazione completa del campione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es.: acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

6.2 – Analisi

6.2.1 - Preparazione delle diluizioni

Prelevare 1 mL dalla sospensione primaria preparata. Allestire una serie di diluizioni decimali (1 mL della sospensione primaria + 9 mL di soluzione salina peptonata) fino a 10^{-5} .

6.2.2 - Arricchimento primario

Inoculare 3 beute, contenenti 90 mL di brodo alla selenite e cistina, con 10 mL della sospensione primaria preparata ed omogeneizzata come descritto.

Inoculare 3 tubi, contenenti 9 mL di brodo alla selenite e cistina, con 1 mL della sospensione primaria preparata ed omogeneizzata come descritto.

Da ciascuna diluizione, trasferire 1 mL per tubo in 3 tubi contenenti 9 mL di brodo alla selenite e cistina. Incubare le 3 beute ed i 15 tubi a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

6.2.3 - Arricchimento selettivo secondario

Da ciascuna coltura del prearricchimento ottenuta come descritto precedentemente trasferire asepticamente 0,1 mL in tubi contenenti 10 mL di brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis. Incubare a $41 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

6.2.4 - Isolamento

Trasferire un'ansata dai tubi di Rappaport Vassiliadis, utilizzando un'ansa sterile da 10 μL , e strisciare sui terreni XLD agar e Rambach agar per ottenere colonie isolate. Incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

6.2.5 - Identificazione di colture pure

Identificare le colonie tipiche e presuntive di *Salmonella* spp. sui terreni XLD agar e Rambach agar.

Sul terreno XLD agar, le colonie tipiche si presentano di colore rosso rosato con centro nero ad eccezione dei ceppi H_2S negativi (es. *Salmonella senftenberg* H_2S negativi), ma possono presentarsi anche nere. Sul terreno Rambach agar le colonie tipiche si presentano di colore rosa.

Procedere alla conferma sierologica per almeno una colonia tipica identificata su ciascun terreno e su ciascuna diluizione seminata. Per una più precisa determinazione del genere *Salmonella* possono essere eseguite prove biochimiche.

6.2.6 - Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie di *Salmonella* sospette mediante identificazione sierologica dei loro antigeni somatici e flagellari (O e H). Gli stipti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classifica di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

6.2.7 - Conferma biochimica

Per accertare l'appartenenza al genere *Salmonella* delle colonie sospette, è opportuno eseguire le prove di conferma di seguito riportate:

- idrolisi dell'urea
- produzione di indolo
- decarbossilazione della lisina.

È anche possibile effettuare un'identificazione diretta delle colonie sospette, utilizzando i sistemi miniaturizzati disponibili in commercio.

Prima di effettuare le prove di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone soia agar, incubando a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per $18 \div 24$ ore. Eseguire le prove su colonie cresciute da non oltre 24 ore.

6.2.7.1 - Idrolisi dell'urea

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone soia agar, la colonia sospetta e strisciare sulla superficie inclinata del terreno all'urea completo. Incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore e controllare a brevi intervalli di tempo la crescita.

Se la reazione è positiva, l'idrolisi dell'urea libera ammoniaca che fa virare il colore del rosso fenolo al rosa e successivamente al rosso ciliegia scuro. La reazione spesso è evidente dopo $2 \div 4$ ore.

Per *Salmonella* spp., che non idrolizza l'urea e quindi non causa nessun cambiamento di colore, il risultato deve essere negativo.

6.2.7.2 - Produzione di indolo

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile le colonie sospette cresciute sul terreno Triptone soia agar. Inoculare in tubi contenenti brodo al triptofano-triptone ed incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore. Dopo incubazione aggiungere alla brodocoltura alcune gocce del reattivo di Kovacs per rivelare la produzione di indolo. Una reazione positiva si manifesta entro pochi secondi con lo sviluppo di una colorazione rossa ad anello sulla superficie del brodo. Per *Salmonella* spp., che non produce indolo, il risultato della prova deve essere negativo.

6.2.7.3 - Prova della decarbossilazione della lisina

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone soia agar, la colonia sospetta ed inoculare appena sotto la superficie del terreno liquido. Ricoprire il terreno con paraffina liquida od olio sterili. Incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

La positività della *Salmonella* è determinata dalla reazione alcalina evidenziata da una colorazione violacea dopo il periodo d'incubazione.

7 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

7.1 - Determinazione del numero più probabile (MPN)

Per ciascuna delle 6 diluizioni (dalla sospensione primaria alla diluizione 10^{-5}), prendere nota del numero delle beute e/o dei tubi che hanno dato risultati positivi su XLD e/o Rambach agar dopo le fasi di arricchimento e le prove di conferma.

Identificare il corrispondente numero caratteristico (NC) considerando che esso corrisponde al numero di tubi positivi delle ultime 3 diluizioni che mostrano un numero di tubi positivi > 0 .

Quando è possibile, scegliere 3 diluizioni seriali per le quali i risultati non sono né totalmente positivi né totalmente negativi. Se ciò non è possibile, è preferibile scegliere le 3 diluizioni seriali con risultati positivi. Se meno di 3 diluizioni seriali mostrano risultati positivi, usare la diluizione contenente la concentrazione più alta nel campione e le 2 diluizioni successive. Se ci sono tubi positivi solo per una delle diluizioni seriali, per ricavare il numero usare questa diluizione e la diluizione precedente e quella successiva.

ESEMPIO

| Diluizione del campione | 10^{-1} | | | 10^{-1} | | | 10^{-2} | | | 10^{-3} | | | 10^{-4} | | | 10^{-5} | | |
|-------------------------------|----------------------|----|----|----------------------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|
| | Sospensione primaria | | | sospensione primaria | | | | | | | | | | | | | | |
| Inoculo (mL di arricchimento) | 10 | 10 | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Brodo selenite-cistina (mL) | 90 | 90 | 90 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Rambach | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| XLD | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NC | 3 | | | 1 | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | | 0 | | |

NC= numero caratteristico

Conservare le diluizioni (Soluzione peptone salina) del campione a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ fino al risultato finale. Se tutte le capsule nelle ultime tre serie di diluizioni (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) sono positive, preparare 10^{-6} e 10^{-7} e trasferire 1 mL per tubo in 3 tubi contenenti ciascuno 9 mL di brodo di selenite-cistina.

7.2 - Calcolo

 Consultare la tabella 1 per determinare il Numero Più Probabile (MPN) di *Salmonella* spp.

Esempio

| | | | | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Diluzione del campione | 10^{-1} | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} |
| Volume | 10 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Fattore di diluizione | 10^0 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} |

Esempio A

| | | | | | | |
|--|----------|----------|-------------------|----------|----------|----------|
| NC | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tabella MPN | | | 1,5 | | | |
| Fattore di diluizione | | | 10^0 | | | |
| Calcolo | | | $1,5 \times 10^0$ | | | |
| Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione | | | 1,5 | | | |

Esempio B

| | | | | | | |
|--|----------|----------|------------------|----------|----------|----------|
| NC | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Tabella MPN | | | 15 | | | |
| Fattore di diluizione | | | 10^0 | | | |
| Calcolo | | | 15×10^0 | | | |
| Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione | | | 15 | | | |

Esempio C

| | | | | | | |
|--|----------|----------|------------------|----------|----------|----------|
| NC | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Tabella MPN | | | 15 | | | |
| Fattore di diluizione | | | 10^{-1} | | | |
| Calcolo | | | 15×10^1 | | | |
| Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione | | | 150 | | | |

Esempio D

| | | | | | | |
|--|----------|----------|-------------------|----------|----------|----------|
| NC | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| Tabella MPN | | | 15 | | | |
| Fattore di diluizione | | | 10^{-2} | | | |
| Calcolo | | | 15×10^2 | | | |
| Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione | | | $1,5 \times 10^3$ | | | |

Esempio E

| | | | | | | |
|--|----------|----------|-------------------|----------|----------|----------|
| NC | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 |
| Tabella MPN | | | 15 | | | |
| Fattore di diluizione | | | 10^{-3} | | | |
| Calcolo | | | 15×10^3 | | | |
| Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione | | | $1,5 \times 10^4$ | | | |

 I risultati dovrebbero essere espressi come *Salmonella* spp. MPN g⁻¹ di peso umido ed i limiti inferiore e superiore dovrebbero essere sempre riportati fra parentesi.

Tab.1 - Indice MPN e limiti di confidenza al 95% e al 99% per varie combinazioni di risultati positivi in una serie di 3 tubi

| Numero caratteristico | | | Indice MPN | Limiti di confidenza | | | |
|-----------------------|----------------------|----------------------|------------|----------------------|--------|--------|--------|
| 1 ^a cifra | 2 ^a cifra | 3 ^a cifra | | ≥ 95 % | ≥ 95 % | ≥ 99 % | ≥ 99 % |
| 0 | 0 | 0 | < 0,30 | 0,00 | 0,94 | 0,00 | 1,40 |
| 0 | 0 | 1 | 0,30 | 0,01 | 0,95 | 0,00 | 1,40 |
| 0 | 1 | 0 | 0,30 | 0,01 | 1,00 | 0,00 | 1,60 |
| 0 | 1 | 1 | 0,61 | 0,12 | 1,70 | 0,05 | 2,50 |
| 0 | 2 | 0 | 0,62 | 0,12 | 1,70 | 0,05 | 2,50 |
| 0 | 3 | 0 | 0,94 | 0,35 | 3,50 | 0,18 | 4,60 |
| 1 | 0 | 0 | 0,36 | 0,02 | 1,70 | 0,01 | 2,50 |
| 1 | 0 | 1 | 0,72 | 0,12 | 1,70 | 0,05 | 2,50 |
| 1 | 0 | 2 | 1,1 | 0,4 | 3,5 | 0,2 | 4,6 |
| 1 | 1 | 0 | 0,71 | 0,13 | 2,00 | 0,06 | 2,70 |
| 1 | 1 | 1 | 1,1 | 0,4 | 3,5 | 0,2 | 4,6 |
| 1 | 2 | 0 | 1,1 | 0,4 | 3,5 | 0,2 | 4,6 |
| 1 | 2 | 1 | 1,5 | 0,5 | 3,8 | 0,2 | 5,2 |
| 1 | 3 | 0 | 1,6 | 0,5 | 3,8 | 0,2 | 5,2 |
| 2 | 0 | 0 | 0,93 | 0,15 | 3,50 | 0,07 | 4,60 |
| 2 | 0 | 1 | 1,4 | 0,4 | 3,5 | 0,2 | 4,6 |
| 2 | 0 | 2 | 2,0 | 0,5 | 3,8 | 0,3 | 5,2 |
| 2 | 1 | 0 | 1,5 | 0,4 | 3,8 | 0,2 | 5,2 |
| 2 | 1 | 1 | 2,0 | 0,5 | 3,8 | 0,2 | 5,2 |
| 2 | 1 | 2 | 2,7 | 0,9 | 9,4 | 0,5 | 14,2 |
| 2 | 2 | 0 | 2,1 | 0,5 | 4,0 | 0,2 | 5,6 |
| 2 | 2 | 1 | 2,8 | 0,9 | 9,4 | 0,5 | 14,2 |

segue

cont.

| Numero caratteristico | | | Indice MPN | Limiti di confidenza | | | |
|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------------|--------|--------|--------|
| 1 ^a cifra | 2 ^a cifra | 3 ^a cifra | | ≥ 95 % | ≥ 95 % | ≥ 99 % | ≥ 99 % |
| 2 | 2 | 2 | 3,5 | 0,9 | 9,4 | 0,5 | 14,2 |
| 2 | 3 | 0 | 2,9 | 0,9 | 9,4 | 0,5 | 14,2 |
| 2 | 3 | 1 | 3,6 | 0,9 | 9,4 | 0,5 | 14,2 |
| 3 | 0 | 0 | 2,3 | 0,5 | 9,4 | 0,3 | 14,2 |
| 3 | 0 | 1 | 3,8 | 0,9 | 10,4 | 0,5 | 15,7 |
| 3 | 0 | 2 | 6,4 | 1,6 | 18,1 | 1,0 | 25,0 |
| 3 | 1 | 0 | 4,3 | 0,9 | 18,1 | 0,5 | 25,0 |
| 3 | 1 | 1 | 7,5 | 1,7 | 19,9 | 1,1 | 27,0 |
| 3 | 1 | 2 | 12 | 3 | 36 | 2 | 44 |
| 3 | 1 | 3 | 16 | 3 | 38 | 2 | 52 |
| 3 | 2 | 0 | 9,3 | 1,8 | 36,0 | 1,2 | 43,0 |
| 3 | 2 | 1 | 15 | 3 | 38 | 2 | 52 |
| 3 | 2 | 2 | 21 | 3 | 40 | 2 | 56 |
| 3 | 2 | 3 | 29 | 9 | 99 | 5 | 152 |
| 3 | 3 | 0 | 24 | 4 | 99 | 3 | 152 |
| 3 | 3 | 1 | 46 | 9 | 198 | 5 | 283 |
| 3 | 3 | 2 | 110 | 20 | 400 | 10 | 570 |
| 3 | 3 | 3 | > 110 | | | | |

METODO 3 – Presenza/Assenza

1 - CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura di analisi o descritta può essere utilizzata per il rilevamento di *Salmonella* spp. in campioni di fanghi di depurazione, altri fanghi trattati e non trattati, suoli anche concimati e sedimenti.

2 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo permette di rilevare salmonelle danneggiate con un metodo che prevede quattro fasi:

- prearricchimento dei batteri in un terreno selettivo primario;
- arricchimento in un terreno selettivo secondario che inibisce la crescita di microrganismi interferenti, favorendo quella delle salmonelle;
- preparazione di colture pure con inoculo su due differenti terreni solidi selettivi;
- identificazione sierologica e/o biochimica.

Il limite di rilevamento per *Salmonella* è approssimativamente 10 ufc/50 g di peso umido del campione.

3 - TERRENI DI CULTURA E REAGENTI

3.1 - Acqua peptonata tamponata con l'aggiunta di 40 mg/L di Novobiocina

3.1.1 - Acqua peptonata tamponata

Composizione

| | | |
|--|------|----|
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Peptone da caseina | 10 | g |
| Potassio diidrogeno fosfato | 1,5 | g |
| di-Sodio idrogeno fosfato dodecaidrato | 9 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Sciogliere i componenti mantenendo in agitazione la soluzione. Dispensare in aliquote da 450 mL e sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

3.1.2 - Soluzione di Novobiocina

Composizione

| | | |
|------------------|----|----|
| Novobiocina | 1 | g |
| Acqua distillata | 10 | mL |

Sciogliere asepticamente 1 g di Novobiocina in 10 mL di acqua distillata e sterilizzare per filtrazione su una membrana con porosità nominale di 0,2 μm . Conservare la soluzione a $5 \pm 3^\circ\text{C}$, protetta dalla luce. La soluzione può essere conservata per una settimana in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

3.1.3 - Terreno completo: Acqua peptonata tamponata con Novobiocina

Trasferire 180 μL della soluzione di Novobiocina in aliquote da 450 mL di Acqua peptonata tamponata sterilizzata per ottenere una concentrazione finale di Novobiocina di 40 mg/L. Aggiungere la soluzione dell'antibiotico immediatamente prima dell'uso ed agitare con cura.

3.2 - Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione

| | | |
|-------------------------------|-------|----|
| Peptone di soia | 4,5 | g |
| Cloruro di magnesio esaidrato | 28,6 | g |
| Cloruro di sodio | 7,2 | g |
| Potassio fosfato bibasico | 0,18 | g |
| Potassio fosfato monobasico | 1,26 | g |
| Verde malachite ossalato | 0,036 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Aggiustare il pH finale a $5,2 \pm 0,1$. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo), sterilizzare in autoclave a $115 \pm 2^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

3.3 - Xilosio-Lisina-Desossicolato agar (XLD)

3.3.1 - Soluzione rosso fenolo

Composizione

| | | |
|---------------------------------------|------|----|
| Rosso fenolo | 1 | g |
| Soluzione di idrossido di sodio 0,1 M | 1,25 | mL |
| Acqua distillata | 250 | mL |

Sospendere 1 g di rosso fenolo in 1,25 mL di una soluzione di idrossido di sodio e portare la soluzione a 250 mL con acqua distillata.

3.3.2 - Terreno completo XLD agar

Composizione

| | | |
|---------------------|------|----|
| Estratto di lievito | 3 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| L-lisina cloridrato | 5 | g |
| Agar | 12,5 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno completo si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Sospendere i componenti e riscaldare la miscela fino a completa soluzione. Sterilizzare in autoclave per 15 ± 1 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ e aggiungere i supplementi nelle concentrazioni sotto indicate:

| | | |
|---------------------------|------|----|
| Lattosio | 7,5 | g |
| Saccarosio | 7,5 | g |
| Xilosio | 3,75 | g |
| Sodio desossicolato | 1 | g |
| Sodio tiosolfato | 6,8 | g |
| Ferro ammonio citrato | 0,8 | g |
| Soluzione di rosso fenolo | 20 | mL |

Aggiungere asetticamente i supplementi alla miscela sterile ed aggiustare il pH a $7,4 \pm 0,2$ usando una soluzione di idrossido di sodio (0,1 M). Riscaldare a bagnomaria per 45 ± 1 minuti e versare in capsule di Petri e lasciare solidificare.

3.4 - Verde brillante-rosso fenolo-lattosio-saccarosio agar, modificato (BPLS Agar modificato)

Composizione

| | | |
|---------------------------|--------|----|
| Peptone di carne | 5 | g |
| Peptone di caseina | 5 | g |
| Estratto di carne | 5 | g |
| di-Sodio idrogeno fosfato | 2 | g |
| Cloruro di sodio | 3 | g |
| Lattosio | 10 | g |
| Saccarosio | 10 | g |
| Rosso fenolo | 0,08 | g |
| Verde brillante | 0,0125 | g |
| Agar | 12 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata; si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Sciogliere i componenti in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Non autoclavare. Raffreddare e versare in capsule di Petri.

3.5 - Agar nutritivo

Composizione

| | | |
|-------------------|------|----|
| Estratto di carne | 3 | g |
| Peptone | 5 | g |
| Agar | 15 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata; si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Sciogliere i componenti in acqua distillata. Portare ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Raffreddare e versare in capsule di Petri.

4 - STRUMENTAZIONE E VETRERIA

Normale attrezzatura di laboratorio.

5 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

Durante il campionamento, operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza. Raccogliere campioni non inferiori a 100 g di peso umido e portarli in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo.

Durante il trasporto e lo stoccaggio, per evitare fenomeni di moltiplicazione o inattivazione cellulare, mantenere i campioni refrigerati a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Procedere all'analisi preferibilmente entro 36 ore.

6 - PROCEDURA

6.1 - Arricchimento primario

A 50 g di campione (in peso umido) aggiungere 450 mL di Acqua peptonata tamponata con novobiocina; incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore in un termostato mantenendo in agitazione (150 rpm). Con un volume inferiore a 50 g di campione, mantenere il rapporto di 1:10 tra il peso del campione ed il volume del terreno di arricchimento primario.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ con acido cloridrico 1 M, agitando per assicurare un'omogeneizzazione completa del campione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es.: acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

6.2 - Arricchimento secondario

Trasferire 0,1 mL della coltura di arricchimento primario in due tubi, ciascuno contenente 10 mL di Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis; in condizioni statiche incubare un tubo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ e l'altro a $41 \pm 1^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

6.3 - Isolamento e selezione delle colonie

Prelevando un'ansata (10 μL) da ciascun tubo di arricchimento secondario, strisciare sui terreni di isolamento XLD e BPLS. Incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

Identificare le colonie tipiche e presuntive di *Salmonella* spp. sui terreni XLD agar e BPLS. Sul terreno XLD agar, le colonie tipiche si presentano di colore rosso rosato con centro nero ad eccezione dei ceppi H₂S negativi (es. *Salmonella senftenberg* H₂S negativi), ma possono presentarsi anche nere. Su BPLS le colonie tipiche si presentano di colore rosa.

Eseguire subcolture di almeno tre colonie tipiche, ognuna prelevata da ciascun terreno; seminare su agar nutritivo ed incubare a 36 ± 2°C per 21 ± 3 ore per ottenere colture pure per la fase di conferma.

6.4 - Conferma sierologica e biochimica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie di *Salmonella* sospette mediante identificazione sierologica dei loro antigeni somatici e flagellari (O e H). Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classifica di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai test specifici. Per la conferma biochimica vedi sezione 6.2.7 del metodo 2.

6.5 - Determinazione del contenuto di peso secco

Il numero di salmonelle può essere calcolato in relazione al peso umido o al peso secco. Per determinare quest'ultimo, preferibilmente fare riferimento al metodo riportato in UNI EN 12880:2002 ed eseguire la determinazione in parallelo con le analisi microbiologiche.

7 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il risultato positivo per *Salmonella* deve essere espresso come "Presenza di *Salmonella* spp. in 50 g di campione"; l'assenza di *Salmonella* verrà riportata come "Assenza di *Salmonella* spp. in 50 g di campione".

BIBLIOGRAFIA

MOHAIBES M., HEINONEN-TANSKI H. (2004): "Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes", *Biores. Techn.*, **95**, 245-254.

UNI EN ISO 8199:2008. Qualità dell'acqua - Linea guida generale per la conta di microrganismi su terreno di coltura.

UNI EN 12880:2002. Caratterizzazione dei fanghi - Determinazione del residuo secco e dell'umidità.

Report 3 (2007). Salmonella. EU Horizontal project.

QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE BATTERICHE ASSOCIATE A SEDIMENTO FLUVIALE MEDIANTE MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA E CITOMETRIA A FLUSSO

a cura di Amalfitano S.*, Fazi S.*, Zoppini A.*, Puddu A.*

* Istituto di Ricerca Sulle Acque, CNR, Area della Ricerca RM1- Montelibretti, Roma

INTRODUZIONE

La quantificazione dell'abbondanza batterica negli ambienti acquatici è un parametro di base per comprendere il ruolo delle comunità microbiche nei processi ecosistemici. Negli ultimi anni, le misure di abbondanza sono principalmente effettuate utilizzando la microscopia ad epifluorescenza e la citometria a flusso, associate all'utilizzo di coloranti fluorescenti specifici per la marcatura degli acidi nucleici cellulari. Tuttavia, quando i microrganismi sono associati ai sedimenti di fondo, l'applicazione di questi metodi è resa problematica dalla presenza di particelle di detrito e di materiale organico che possono mascherare il segnale fluorescente specifico delle cellule (Daims e Wagner, 2007; Rogers et al., 2007). In molti casi la semplice diluizione del campione trattato è sufficiente per ottenere una chiara identificazione cellulare. Tuttavia nei sedimenti, soprattutto in quelli fini o argillosi, la diluizione è spesso inefficace, dal momento che l'abbondanza delle particelle di detrito può essere più elevata di diversi ordini di grandezza rispetto a quella batterica. In questi casi, è quindi necessaria la messa a punto di una procedura di separazione delle cellule dal sedimento. Fino ad oggi sono stati proposti diversi metodi per l'estrazione e la conta diretta delle cellule associate a diverse matrici ambientali, principalmente suolo ma anche sedimenti fluviali ed aggregati organici (Lindahl, 1996; Riis et al., 1998; Barra Caracciolo et al., 2005; Fazi et al., 2005; Amalfitano e Fazi, 2008). Non si è tuttavia pervenuti ancora ad una procedura standardizzata, soprattutto per quanto riguarda il sedimento di ambienti fluviali, poiché la sua matrice è particolarmente complessa.

Generalmente i metodi di estrazione utilizzano una combinazione di trattamenti chimici e fisici al fine di ottenere il distacco delle cellule dal substrato, senza influenzare l'integrità delle membrane cellulari. In particolare, dal punto di vista chimico, agenti chelanti quali sali di sodio (ossalato, pirofosfato, citrato) e resine (es. amberlite) sono molto utilizzati per indebolire i legami idrogeno e le forze elettrostatiche che legano insieme cellule e particelle di detrito.

L'utilizzo di questi composti in associazione con tensioattivi (Sodio-dodecilsolfato, Sodio-colato, Tween-Series, Triton-X) si è dimostrato particolarmente efficace nel separare in modo ottimale le cellule dal detrito (Katayama et al., 1998). Dal punto di vista fisico, il distacco delle cellule viene normalmente effettuato tramite strumenti quali vortex, agitatori, miscelatori, bagni e sonde ad ultrasuoni. Una volta staccate le cellule dalle particelle si procede alla fase di separazione. Diversi Autori hanno suggerito di impiegare la centrifugazione su gradiente di densità, utilizzando una soluzione non-tossica a concentrazione nota di Nycodenz (Nycomed, Oslo, Norvegia; densità $1,310 \pm 0.002$ g/mL) (Lindhal, 1996; Courtois et al., 2001; Fazi et al., 2005; Amalfitano e Fazi, 2008). Il Nycodenz è un derivato dall'acido benzoico, tradizionalmente utilizzato in campo biomedico per la separazione di particelle biologiche in vitro (Rickwood et al., 1982).

Nel seguito si illustra la metodica messa a punto presso l'IRSA-CNR per il distacco delle cellule batteriche associate al sedimento fluviale.

PRINCIPIO ED APPLICAZIONE DEL METODO

Il trattamento prevede l'utilizzo del chelante (sodio pirofosfato) e del tensioattivo (Tween 80) per indebolire i legami chimici tra sedimento e cellula, e trattamenti fisici (agitazione e sonicazione) per omogeneizzare il campione. La fase di separazione viene effettuata utilizzando la centrifugazione ad alta velocità su gradiente di densità attraverso l'utilizzo del medium Nycodenz, caratterizzato da una densità maggiore del sedimento ma minore delle cellule.

1 - RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DI SEDIMENTO

Il sedimento è setacciato *in situ* su maglia da 2 mm, al fine di eliminare il materiale detritico e minerale di grandi dimensioni, e messo in contenitori sterili e refrigerati. Il campione è fissato per almeno 1 ora con una soluzione di formaldeide (conc. finale 2%), e suddiviso in aliquote da 1 g.

Sub-campioni non fissati vengono utilizzati per l'analisi della composizione granulometrica e del peso secco.

2 - TRATTAMENTO CHIMICO-FISICO

Il trattamento chimico consiste nel diluire 1:10 (peso/volume) in una soluzione contenente PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 , pH = 7,4), sodio pirofosfato (conc. finale $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; Sigma-Aldrich) e Tween80 (conc. finale 0,5%; Research Organics Inc.).

Successivamente il campione è sottoposto a trattamenti fisici che consistono in:

- 1) agitazione effettuata per 30 minuti a 720 giri al minuto su agitatore orbitale (IKA KS 130 Basic);
- 2) sonicazione effettuata per 1 minuto a 20W utilizzando un processore liquido ad ultrasuoni (Misonix XL2000 con punta in titanio da 3,2 mm di diametro).

Successivamente, aliquote da 1mL dell'emulsione così ottenuta sono trasferite in microprovette da 2 mL. Utilizzando una siringa con ago, viene introdotto sul fondo della provetta 1 mL di Nycodenz. A questo punto, l'emulsione salirà ad occupare la parte alta della provetta. Segue centrifugazione a 14000 g per 90 minuti (centrifuga 5804R, Eppendorf), mantenendo la temperatura a 4°C. Le cellule batteriche, dopo la centrifugazione, si trovano a galleggiare su uno strato posto al di sopra della fascia di Nycodenz e possono facilmente essere prelevate con una pipetta, mentre sul fondo si forma un aggregato costituito principalmente da sedimento e particelle detritiche (Fig. 1).

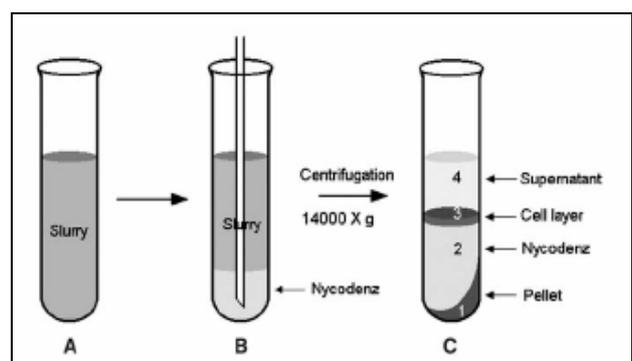


Fig. 1 - Procedura di separazione delle cellule dal sedimento (A) campione dopo agitazione e sonicazione con PBS, pirofosfato e Tween 80; (B) aggiunta di Nycodenz; (C) campione dopo centrifugazione (secondo Barra Caracciolo et al., 2005).

3 - OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA DI DISTACCO

L'efficienza dei trattamenti di distacco e purificazione dipende in modo sostanziale dal mantenimento dell'integrità cellulare. Infatti, se il Nycodenz entrasse all'interno della membrana cellulare danneggiata dai trattamenti, si osserverebbe un aumento della densità delle cellule che andrebbero perse durante la centrifugazione (Maron et al., 2006). L'elemento di criticità per il danneggiamento delle membrane cellulari è rappresentato dalla fase di sonicazione (Buesing e Gessner, 2002; Amalfitano e Fazi, 2008; Epstein e Rossèl, 1995).

Il trattamento ad ultrasuoni è difficilmente standardizzabile e può dipendere da diversi fattori sperimentali, tra cui ad esempio il tipo di strumento utilizzato (es. bagno o sonda), il volume e la viscosità della soluzione di distacco, la forma ed il materiale della provetta, ed inoltre dalle caratteristiche strutturali del campione sottoposto a sonicazione (es. composizione granulometrica, contenuto d'acqua). Di conseguenza, è necessario valutare ogni fase della procedura di distacco, cercando di raggiungere un efficiente compromesso tra il recupero cellulare dalla matrice ed il mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari.

4 - MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA

La combinazione delle procedure di separazione rende il campione quasi del tutto privo di particelle di sedimento, migliorando e facilitando le osservazioni al microscopio.

Al termine della centrifugazione, il surnatante è interamente prelevato, le cellule marcate con DAPI dopo incubazione al buio per 10 min (conc. finale $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e raccolte su membrana di policarbonato (porosità da $0,2 \mu\text{m}$, Nucleopore), tramite l'utilizzo di una pompa a vuoto ($<0,2 \text{ bar}$). Il filtro viene poggato su un vetrino da microscopio, coperto da un coprioggetto con interposizione di olio da immersione e conservato a -20°C fino al momento dell'osservazione al microscopio. L'osservazione viene effettuata utilizzando un microscopio ad epifluorescenza, dotato di lampada a vapori di mercurio, filtro dicroico UV, oculare con ingrandimento 10x ed obiettivo ad immersione 100x. Per ogni campione viene contato un minimo di 300 cellule su più campi selezionati in modo casuale e distribuiti su tutta l'area del filtro. Conoscendo, per il sistema ottico utilizzato, il rapporto tra la superficie di filtrazione effettiva e la porzione di griglia osservata, si risale al numero di cellule sull'intero filtro e da questo, in base al volume di campione filtrato, alla concentrazione di cellule nel surnatante (Zoppini et al., 2002).

Per ricavare l'abbondanza batterica nell'aliquota di sedimento bisogna quindi considerare il fattore di diluizione (1:10 peso/volume).

Per un confronto delle abbondanze cellulari tra diversi sedimenti i dati si esprimono per cm^3 .

La microscopia ad epifluorescenza permette anche la determinazione della biomassa batterica attraverso la misura della dimensione cellulare ottenuta dall'analisi delle immagini al microscopio (Amalfitano et al., 2008). L'utilizzo di queste procedure di separazione ha migliorato anche l'applicazione del metodo FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) ai sedimenti, che utilizza sonde oligonucleotidiche fluorescenti per lo studio della composizione filogenetica delle comunità microbiche bentoniche (Fazi et al., 2005; Fazi et al., 2007).

5 - CITOMETRIA A FLUSSO

La possibilità di applicare la citometria a flusso per l'analisi di campioni di sedimento fluviale rappresenta un importante avanzamento negli studi di ecologia microbica. Questa tecnica ad oggi è utilizzata principalmente per l'analisi di campioni di acqua, poiché necessita che le cellule siano ben disperse in un mezzo acquoso. L'applicazione del protocollo di separazione sopradescritto permette di effettuare la conta al citometro delle cellule disperse in soluzione.

Nel citometro a flusso la fluorescenza delle cellule è misurata mentre le cellule vengono forzate a passare lungo un capillare da un flusso idrodinamico. Durante questo percorso le cellule vengono colpite da un fascio di luce, prodotto da un laser con una lunghezza d'onda opportunamente selezionata per mezzo di filtri specifici, ed emettono uno o più segnali di fluorescenza, in base al tipo di marcatura. I segnali vengono successivamente raccolti da fotomoltiplicatori che traducono i segnali luminosi in impulsi elettrici che vengono digitalizzati ed inviati ad un computer per l'elaborazione. Questa tecnica permette l'analisi di un numero di cellule che va da circa 200 a più di 2000 cellule per secondo, riducendo i tempi di lavoro. I dati multiparametrici sono statisticamente più consistenti rispetto a quelli ottenuti tramite l'analisi al microscopio (Shapiro, 1995).

La sospensione cellulare ricavata dal sedimento è analizzata con un citometro a flusso, dotato di un laser ad argon da 488 nm. I voltaggi dello strumento sono settati a 511 e 400, rispettivamente per il canale della fluorescenza verde (FL1) e della riflessione perpendicolare del raggio laser (90° side light scatter - SSC).

L'acquisizione e l'elaborazione dei dati, in scala logaritmica, vengono effettuati con i programmi CELL QUEST e PAINT-A-GATE (Becton Dickinson) in ambiente MAC OS, e FCS Express V3 in ambiente WINDOWS. I dati vengono acquisiti a bassa velocità di flusso, per limitare al massimo la sovrapposizione dei segnali fluorescenti. Inoltre, tutti gli eventi con valori <72 in FL1 sono considerati rumore strumentale e quindi esclusi dall'analisi. Per la conta totale, le aliquote vengono marcate con il colorante fluorescente SYTO-13 (conc. finale 5 µM; Molecular Probes), dopo incubazione al buio per 15 minuti.

Una soluzione di biglie fluorescenti da 0,97 µm di diametro a concentrazione nota (10 µL, ~10⁶ biglie mL⁻¹; Polyscience) è aggiunta come standard interno, per controllare il corretto funzionamento dello strumento e stimare la densità cellulare. I citogrammi della FL1 in funzione del SSC sono stati utilizzati per identificare gruppi batterici, distinguendoli graficamente dalle biglie e dalle particelle di sedimento (Amalfitano et al., 2009).

Nella figura 2, sono mostrate tre immagini ottenute con la microscopia ad epifluorescenza (a) e con la citometria a flusso (b) del sedimento non trattato e del sedimento prima e dopo i trattamenti con Nycodenz. Le cellule batteriche sono colorate in verde ed è evidente come il trattamento completo permette il recupero di un numero maggiore di cellule.

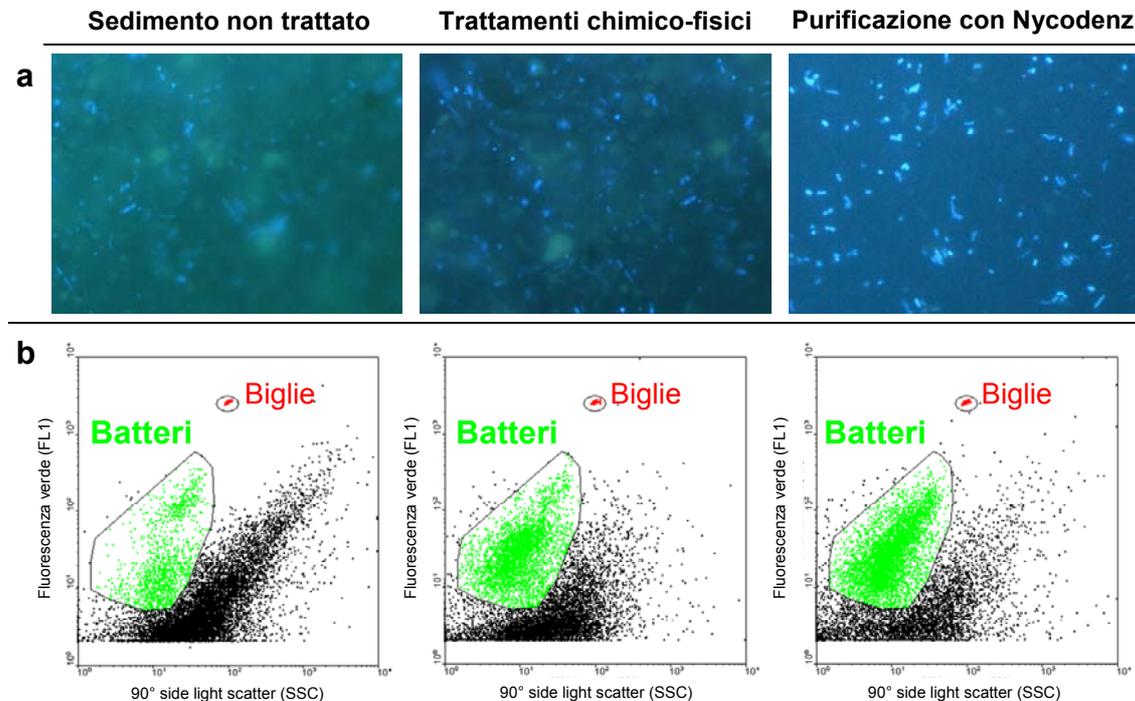


Fig. 2 - Immagini al microscopio ad epifluorescenza (a) e citogrammi delle analisi citometriche (b) effettuate su campioni di sedimento non trattato, trattato con la procedura chimico-fisica di separazione e dopo centrifugazione su gradiente di densità nel medium Nycodenz (adattata da Amalfitano e Fazi, 2008).

CONCLUSIONI

I trattamenti chimico-fisici seguiti da una fase di centrifugazione ad alta velocità su gradiente di densità, consentono di migliorare il recupero di cellule dai campioni di sedimento, effettuando un

conteggio al microscopio più rapido e preciso, e di applicare la citometria a flusso che, con diverse tecniche di marcatura, costituisce un valido strumento per la quantificazione e la caratterizzazione dei microrganismi associati ai sedimenti di fondo.

BIBLIOGRAFIA

AMALFITANO S., FAZI S. (2008): "Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments". *J. Microbiol. Methods*, **75**, 237–243.

AMALFITANO S., FAZI S., PUDDU A. (2009): "Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles". *J. Microbiol. Methods*, **79**, 246–249.

AMALFITANO S., FAZI S., ZOPPINI A., BARRA CARACCILO A., GRENNI P., PUDDU A. (2008): "Responses of benthic bacteria to experimental drying in sediments from Mediterranean temporary rivers". *Microb. Ecol.*, **55**, 270–279.

BARRA CARACCILO A., GRENNI P., CUPO C., ROSSETTI S. (2005): "In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads". *FEMS Microbiol. Lett.*, **253**, 55–58.

BUESING N., GESSNER M. O. (2002): "Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms". *Aquat. Microb. Ecol.*, **27**, 29–36.

COURTOIS S., FROSTEGARD A., GORANSSON P., DEPRET G., JEANNIN P., SIMONET P. (2001): "Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation". *Environ. Microbiol.*, **3**, 431–439.

DAIMS H., WAGNER M. (2007): "Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 237–248.

EPSTEIN S., ROSSÈL J. (1995): "Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol". *Mar. Ecol., Prog. Ser.*, **117**, 289–298.

FAZI S., AMALFITANO S., PERNTHALER J., PUDDU A. (2005): "Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats". *Environ. Microbiol.*, **7**, 1633–1640.

FAZI S., AMALFITANO S., PIZZETTI I., J. PERNTHALER (2007): "Efficiency of fluorescence in situ hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content". *Syst. Appl. Microbiol.*, **30**, 463–470.

KATAYAMA A., KAI K., FUJIE K. (1998): "Extraction efficiency, size distribution, colony formation and 3H-thymidine incorporation of bacteria directly extracted from soil". *Soil Sci. Plant Nutr.*, **44**, 245–252.

LINDAHL V. (1996): "Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival". *J. Microbiol. Methods*, **25**, 279–286.

MARON P. A., SCHIMANN H., RANJARD L., BROTHIER E., DOMENACH A. M., LENS R., NAZARET S. (2006): "Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation". *Eur. J. Soil Biol.*, **42**, 65–73.

RICKWOOD D., FORD T., GRAHAM J. (1982): "Nycodenz: a new non ionic iodinated gradient medium". *Anal. Biochem.*, **123**, 23–31.

RIIS V., LORBEER H., BABEL W. (1998): "Extraction of microorganisms from soil: evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements". *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 1573–1581.

ROGERS S. W., MOORMAN T. B., ONG S. K. (2007): "Fluorescent in situ hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil". *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **71**, 620–631.

SHAPIRO H. M. (1995): "Practical flow cytometry". Third Edition. Wiley-Liss, New York.

ZOPPINI A., DI RADO B., BARRA CARACCILO A. (2002): "Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI)". *Notiziario dei Metodi Analitici*, IRSA-CNR, Roma.

RISULTATI DEL 1° CIRCUITO INTERLABORATORIALE PER L'ANALISI MICROSCOPICA DEI MICRORGANISMI FILAMENTOSI DEL FANGO ATTIVO

a cura di Spigoni G.*, Tandoi V.**

gianluigi.spigoni@eniaspa.it; tandoi@irsa.cnr.it

Enia SPA, Reggio Emilia

** Istituto di Ricerca Sulle Acque, CNR, Area della Ricerca RM1- Montelibretti, Roma

PREMESSA

A conclusione del 1° Circuito interlaboratoriale per l'analisi dei microrganismi filamentosi del fango attivo, è utile riesaminare l'attività svolta, richiamando gli elementi più significativi del circuito stesso e fare alcune riflessioni sui futuri sviluppi dell'iniziativa.

Il circuito interlaboratoriale, come spesso accade, nasce da una precisa esigenza di alcuni laboratori, quella di dimostrare la loro competenza tecnica.

Questo requisito è prescritto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 che i laboratori accreditati devono applicare, ad esempio facendo partecipare i propri operatori addestrati all'analisi microscopica dei fanghi attivi a circuiti interlaboratoriali di prova o *proficiency testing*.

Non è compito facile organizzare e gestire un circuito interlaboratoriale; lo è ancora meno se la platea dei possibili partecipanti è numericamente modesta, come nel caso degli operatori esperti nell'analisi dei fanghi attivi. Per contro l'originalità della prova (essenzialmente qualitativa) ha probabilmente contribuito a dare il necessario stimolo per trovare soluzione ai numerosi problemi organizzativi, uno per tutti (il principale) quello della valutazione delle prestazioni degli analisti.

Dopo una fase preparatoria piuttosto lunga, il gruppo di lavoro, composto da esperti in materia, ha approvato il Regolamento del circuito, il documento base per poter organizzare e valutare la prova interlaboratoriale in modo condiviso e coerente con la Guida ISO/IEC 43-1:1977.

ISCRITTI

I laboratori sono stati contattati attraverso i canali consueti (indirizzari aziendali, riviste scientifiche e specializzate, sito del Sinal), mediante locandina che illustrava le modalità di iscrizione ed il calendario del circuito. Agli iscritti veniva poi inviato il codice segreto ed il Regolamento del circuito.

Al termine della raccolta delle adesioni risultavano iscritti 23 laboratori; a questi vanno aggiunti, a soli fini organizzativi, gli otto analisti esperti che costituiranno la base analitica di riferimento per determinare i cosiddetti "valori assegnati" o di consenso.

MATERIALI

I materiali utilizzati nella prova erano costituiti da due campioni da 30 mL di fanghi attivi posti in flaconi di PP, prelevati da due impianti di depurazione civili. I campioni sono stati opportunamente sigillati ed inseriti in contenitori termici refrigerati spediti a mezzo corriere espresso ai laboratori partecipanti. All'atto della spedizione è stata verificata l'omogeneità dei campioni di fango distribuiti, mediante osservazione microscopica di aliquote prelevate a caso da 8 flaconi di PP, dei 30 pronti per la spedizione. La stabilità dei campioni di fango attivo è stata valutata preliminarmente nel mese di maggio 2008, a cura del laboratorio Enia, su aliquote di fango attivo simili per caratteristiche ed origine a quelle oggetto della prova, conservate refrigerate per oltre 10 giorni, tempo ritenuto adeguato al completamento delle osservazioni.

METODI

L'organizzazione del circuito interlaboratoriale è conforme alla Guida ISO/IEC 43-1:1977. I partecipanti al circuito hanno eseguito le osservazioni microscopiche seguendo le istruzioni fornite dall'organizzazione e conformemente al metodo IRSA CNR Q. 110:1999 – "Il problema del bulking filamentoso e delle schiume biologiche negli impianti a fanghi attivati; Appendice A".

DETERMINAZIONI DA EFFETTUARE

I laboratori dovevano effettuare le osservazioni microscopiche indicate dal metodo IRSA CNR e riportarle su apposita "Scheda delle osservazioni", una per ciascun campione. In particolare gli analisti dovevano indicare la classe di abbondanza dei filamenti, l'effetto dei filamenti sulla struttura del fiocco, il diametro prevalente dei fiocchi, l'aspetto del liquido tra i fiocchi, la morfologia dei fiocchi, la specie di microrganismi dominante e due specie secondarie. Le Schede, inviate in forma criptata all'organizzatore, costituivano la base per la valutazione dei risultati.

CALENDARIO

Il calendario previsto per il completamento del circuito era il seguente:

| | |
|--|---------------------|
| Richiesta d'iscrizione al circuito | entro il 10/09/2008 |
| Conferma iscrizione, assegnazione Codice identificativo ed invio Regolamento | entro il 19/09/2008 |
| Data spedizione campioni | 20/10/ 2008 |
| Data ricevimento campioni | entro il 22/10/2008 |
| Esecuzione delle prove | entro il 25/10/2008 |
| Trasmissione Schede delle osservazioni | entro il 7/11/2008 |
| Elaborazione dei risultati e spedizione dei Rapporti di prova | entro il 12/12/2008 |

DOCUMENTAZIONE INVIATA

A tutti i laboratori iscritti al circuito interlaboratoriale è stata inviata e-mail, in data 19/09/2008, contenente copia del Regolamento del circuito ed il codice segreto, da riportare sulla Scheda delle osservazioni per la trasmissione dei risultati all'organizzatore. In data 20 ottobre sono state inviate, assieme ai campioni di prova, le Schede delle osservazioni ed il Foglio delle istruzioni, con il protocollo di esecuzione delle prove.

ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Le Schede delle osservazioni trasmesse all'organizzatore dai laboratori, sono state poste a confronto con quelle compilate da 8 analisti esperti, i cui risultati rappresentano i "valori di consenso". Da questo confronto sono stati calcolati i punteggi ottenuti dai singoli partecipanti, in base al criterio che l'identificazione corretta delle specie rappresentava l'elemento di valutazione prevalente, rispetto alla parte morfologico-descrittiva contenuta nella Scheda.

VALORI ATTRIBUITI AI VARI PARAMETRI

| Parametri | Punteggio |
|--|-----------------------|
| classe di abbondanza nella moda tra tutti gli esperti $\pm 1, \pm 2, > \pm 2$ classi | 2 ÷ 1 ÷ 0 |
| concordanza con la moda dell'effetto dei filamenti sulla struttura del fiocco | 0.5 ÷ 0 |
| concordanza con la moda del diametro dei fiocchi | 0.5 ÷ 0 |
| concordanza con la moda dell'aspetto del liquido tra i fiocchi | 0.5 ÷ 0 |
| concordanza con la moda della morfologia del fiocco | 0.5 ÷ 0.25 ÷ 0 |
| concordanza con la moda del test con l'inchiostro di china | (facoltativo) |

| Microrganismi osservati rispetto agli esperti | Punteggio |
|---|-----------|
| la specie dominante (o codominanti) concorda con quella degli esperti | 3 |
| le tre specie principali (dominanti e secondarie) concordano con quelle degli esperti | 4 |
| delle tre specie principali una non è stata indicata correttamente | 2 |
| nessuna o solo una delle tre specie principali è stata identificata | 0 |

L'analista è qualificato quando la somma dei punti è ≥ 7 su entrambi i campioni di fango analizzati. Il punteggio massimo ottenibile, per ciascuna osservazione, è 11.

ANALISI DEGLI ESPERTI

Le sintesi delle Schede con le valutazioni del gruppo di esperti sono illustrate di seguito: (con il segno X, per la morfologia, D e S per le specie Dominanti e Secondarie)

CONSIDERAZIONI FINALI

Al circuito interlaboratoriale di qualificazione per l'analisi dei microrganismi filamentosi dei fanghi attivi hanno partecipato 23 laboratori; 6 di questi (26%) non hanno raggiunto il punteggio di 7 per entrambi i campioni analizzati, requisito minimo stabilito dal Regolamento per la qualifica degli operatori. Per contro ben 12 operatori hanno ottenuto punteggi elevati, compresi tra 9 ed 11/11.

La corretta compilazione delle Schede delle osservazioni è di fondamentale importanza; infatti gli organismi riportati nella nota a piè di pagina della Scheda, quando indicati dai partecipanti, non sono stati presi in considerazione per il calcolo dei punteggi. Alcuni laboratori hanno riportato sulla Scheda delle osservazioni due sole specie di microrganismi, anziché le tre previste, con ciò precludendosi la possibilità di ottenere punteggi elevati e conseguentemente la qualificazione.

Altri laboratori, che al contrario avevano indicato un numero di specie superiore a tre, sono stati interpellati dall'organizzatore per i necessari chiarimenti; in futuro sarà opportuno prevedere una informazione più rigorosa e puntuale circa le modalità di espressione delle specie di microrganismi osservati, dominanti e secondari. Anche la corretta e completa esecuzione del metodo è fondamentale per poter confrontare risultati tra loro omogenei. Poiché non sembrano sufficientemente chiare le modalità di esecuzione descritte nel metodo, si ritiene a questo proposito importante sottolineare come la valutazione microscopica della classe di abbondanza dei filamenti debba essere fatta in contrasto di fase, per i soli filamenti esterni al fiocco, mentre per la valutazione della specie dominanti e secondarie occorra anche analizzare il vetrino dopo colorazione di Gram e Neisser.

Sulla scelta della specie dominante, infatti, il manuale IRSA Q.110:1999 alla pagina 152 riporta:

"7) Prevalenza ed abbondanza dei vari microrganismi filamentosi: una volta che se ne è accertata l'identità, si indica il batterio filamentoso che è prevalente nel fango (Dominante! ndr) e via via tutti gli altri che sono quindi secondari. La stima deve essere necessariamente semiquantitativa ...

Quest'ultima operazione non potrà essere rigorosa in quanto dovrà sempre far riferimento all'osservazione in contrasto di fase. La abbondante presenza di filamenti riscontrata all'interno dei fiocchi biologici e messa in evidenza con le colorazioni (ad es. tipo 0041) dovrà essere riportata con una nota appropriata."

Da questa nota si evince, seppur implicitamente, che la stima della dominanza richiede sia l'analisi in contrasto di fase, sia la colorazione del vetrino e che vanno considerati anche i filamenti presenti all'interno del fiocco.

L'osservazione microscopica dei batteri filamentosi del fango attivo rappresenta un metodo analitico con caratteristiche essenzialmente "qualitative". La scelta di utilizzare come riferimento i "Valori di consenso" ottenuti da un gruppo di esperti, rappresenta una soluzione di compromesso che tiene conto della specificità dei singoli campioni, della valutazione personale e delle variazioni, anche significative, che possono intervenire nel corso del test a causa della natura biologica dei campioni stessi. E' convinzione comune che il criterio del punteggio minimo sia un buon sistema di valutazione della competenza tecnica, robusto ma non eccessivamente permissivo, che dà il giusto peso ai contributi significativi del test e rende marginali quelli prettamente descrittivi.

Il 24 marzo 2009 si è svolta a Reggio Emilia la riunione plenaria tra i rappresentanti dei laboratori che hanno partecipato al Circuito interlaboratoriale e gli esperti. Sono stati illustrati e discussi i risultati, esaminati in dettaglio i problemi emersi e chiariti i dubbi di carattere analitico. Tra le proposte emerse degne di nota vi è da citare quella di inserire tra le prossime prove valutative il conteggio dei filamenti secondo il metodo Jenkins e quella di aggiungere ai due campioni di prova, un terzo campione di fango contenente organismi "difficili", allo scopo di favorire la formazione in rete degli operatori. Le proposte saranno oggetto di valutazione da parte del gruppo di esperti. L'impegno comune è stato quello di dare periodicità all'iniziativa e di prevedere l'organizzazione del 2° Circuito interlaboratoriale nel corso del 2010.

Ringraziamenti

Si ringraziano gli amici e i colleghi esperti che con il loro contributo hanno reso possibile l'organizzazione del circuito interlaboratoriale, in particolare i colleghi dell'IRSA per la grande disponibilità ed apertura, gli amici Gianpiero Cesaro (Società Ecologica Nolana cons. arl, NA), Paola Miana (Veritas spa, VE) ed Alessandra Goffredi (BAS - Servizi Idrici Integrati spa, BG) che hanno dato respiro "nazionale" all'iniziativa, Paolo Madoni dell'Università di Parma, nonché i colleghi di Enìa che hanno sostenuto il peso dell'organizzazione ed hanno pazientemente sopportato l'inevitabile carico di lavoro aggiuntivo: Claudia Davoli, Lorena Guglielmi, Cristina Stefanini e Maura Davoli.

Schede con le valutazioni del gruppo di esperti

| | | | | | | | |
|--|-------|----------------------------------|----------|------------------------------------|------------|------------------|--|
| | | Data ricevimento: 22-24/10/2008 | | COD. LAB. ESPERTI | | | |
| Campione: FANGO A | | Data osservazione: 23-25/10/2008 | | | | | |
| Segnare solo una opzione, quella ritenuta più significativa | | | | | | | |
| ABBONDANZA FILAMENTI | | | | | | | |
| O | O | O | O | XXXXXXXX | O | O | |
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| nessuno | pochi | alcuni | moderati | frequenti | abbondanti | eccessivi (rete) | |
| EFFETTO PREVALENTE DEI FILAMENTI SULLA STRUTTURA DEL FIOCCO | | | | | | | |
| XX | | XXXXXX | | O | | | |
| nessuno | | ponti tra i fiocchi | | fiocco a maglia larga | | | |
| DIAMETRO PREVALENTE DEI FIOCCHI (numerosità) | | | | | | | |
| X | | XXXXXXXX | | O | | | |
| < 150 µm | | 150-500 µm | | > 500 µm | | | |
| ASPETTO DEL LIQUIDO TRA I FIOCCHI (barrare una sola voce) | | | | | | | |
| XXXXXXXX | | O | | X | | O | |
| limpido | | cellule libere in sospensione | | frammenti in sospensione | | filamenti liberi | |
| MORFOLOGIA DEL FIOCCO (barrare una voce alle due sezioni) | | | | | | | |
| XX | | XXXXXX | | XXXXXXXXXX | | O | |
| rotondeggiante | | irregolare | | compatto | | frammentato | |
| TEST INCHIOSTRO DI CHINA (facoltativo) | | | | | | | |
| O | | O | | O | | | |
| positivo | | negativo | | non eseguito | | | |
| MICRORGANISMI FILAMENTOSI OSSERVATI | | | | | | | |
| Tipo | | Importanza | | Tipo | | Importanza | |
| <i>Sphaerotilus natans</i> | | | | <i>Nostocoida limicola II</i> | | S | |
| Tipo 1701 | | | | Tipo 1851 | | S | |
| Tipo 0041/0675 | | SSSSSS | | Tipo 0961 | | | |
| Tipo 021 N | | DDDDDDDD | | Tipo 0092 | | S | |
| <i>Thiothrix</i> sp. | | SSSSSS | | <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> | | S | |
| Tipo 0914 | | | | Funghi | | | |
| <i>Beggiatoa</i> sp. | | | | ALTRI | | | |
| <i>Microthrix parvicella</i> | | | | Zooglee | | | |
| Tipo 0581 | | | | Cluster | | | |
| Nocardioformi (MACO) | | | | Spirochete | | | |
| Tipo 1863 | | | | Altro..... | | | |
| (Importanza: indicare le tre specie principali specificando la specie dominante) | | | | | | | |

osservazione 100 x

osservazione 1000 x

Note: ai fini del punteggio sono ritenute valide le sei specie secondarie indicate dagli esperti

Schede con le valutazioni del gruppo di esperti

| | | | | | | | |
|--|-------|----------------------------------|------------|------------------------------------|------------|------------------|--|
| | | Data ricevimento: 22-24/10/2008 | | COD. LAB. ESPERTI | | | |
| Campione: FANGO B | | Data osservazione: 23-25/10/2008 | | | | | |
| Segnare solo una opzione, quella ritenuta più significativa | | | | | | | |
| ABBONDANZA FILAMENTI | | | | | | | |
| ○ | ○ | ○ | XXX | XXXXX | ○ | ○ | |
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| nessuno | pochi | alcuni | moderati | frequenti | abbondanti | eccessivi (rete) | |
| EFFETTO PREVALENTE DEI FILAMENTI SULLA STRUTTURA DEL FIOCCO | | | | | | | |
| XXXX | | ○ | | XXXX | | | |
| nessuno | | ponti tra i fiocchi | | fiocco a maglia larga | | | |
| DIAMETRO PREVALENTE DEI FIOCCHI (numerosità) | | | | | | | |
| ○ | | XXXXXXXX | | X | | | |
| < 150 µm | | 150-500 µm | | > 500 µm | | | |
| ASPETTO DEL LIQUIDO TRA I FIOCCHI (barrare una sola voce) | | | | | | | |
| XXXXXXXX | | ○ | | X | | X | |
| limpido | | cellule libere in sospensione | | frammenti in sospensione | | filamenti liberi | |
| MORFOLOGIA DEL FIOCCO (barrare una voce alle due sezioni) | | | | | | | |
| ○ | | XXXXXXXX | | ○ | | XXXXXXXX | |
| rotondeggiante | | irregolare | | compatto | | frammentato | |
| TEST INCHIOSTRO DI CHINA (facoltativo) | | | | | | | |
| ○ | | ○ | | ○ | | | |
| positivo | | negativo | | non eseguito | | | |
| MICRORGANISMI FILAMENTOSI OSSERVATI | | | | | | | |
| Tipo | | Importanza | | Tipo | | Importanza | |
| <i>Sphaerotilus natans</i> | | | | <i>Nostocoida limicola II</i> | | DDDDDD SS | |
| Tipo 1701 | | | | Tipo 1851 | | | |
| Tipo 0041/0675 | | SSSSSS | | Tipo 0961 | | | |
| Tipo 021 N | | | | Tipo 0092 | | DD SSSSSS | |
| <i>Thiothrix</i> sp. | | | | <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> | | | |
| Tipo 0914 | | | | Funghi | | | |
| <i>Beggiatoa</i> sp. | | | | ALTRI | | | |
| <i>Microthrix parvicella</i> | | SSSS | | Zooglee | | | |
| Tipo 0581 | | | | Cluster | | | |
| Nocardioformi (MACO) | | | | Spirochete | | | |
| Tipo 1863 | | | | Altro..... | | | |
| (Importanza: indicare le tre specie principali specificando la specie dominante) | | | | | | | |

osservazione 100 x

osservazione 1000 x

Note: ai fini del punteggio sono ritenute valide le due specie dominanti e le quattro specie secondarie indicate dagli esperti.

Analisi dei laboratori partecipanti: punteggi ottenuti dai laboratori per le variabili considerate.

| CODICE LABORATORIO | Fango | Classe Abbond. | Effetto Prevalente | Diametro Prevalente | Aspetto liquido | Morfologia | Identificaz. Microrg. filamentosi | TOTALE * |
|--------------------|-------|----------------|--------------------|---------------------|-----------------|------------|-----------------------------------|----------|
| 1 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 4 | 7,5 |
| 1 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10,5 |
| 2 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10,5 |
| 2 | B | 1 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3 | 5,5 |
| 3 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,25 | 4 | 7,25 |
| 3 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+2 | 8,5 |
| 4 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,25 | 4 | 7,25 |
| 4 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,25 | 3+2 | 8,25 |
| 5 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 2 | 6 |
| 5 | B | 2 | 0,5 | 0 | 0 | 0,5 | 4 | 7 |
| 6 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10,5 |
| 6 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10,5 |
| 7 | A | 2 | 0,5 | 0 | 0,5 | 0 | 4 | 7 |
| 7 | B | 2 | 0,5 | 0 | 0 | 0,25 | 2 | 4,75 |
| 8 | A | 2 | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 4 | 7,5 |
| 8 | B | 0 | 0,5 | 0 | 0,5 | 0,5 | 2 | 3,5 |
| 9 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,25 | 2 | 5,25 |
| 9 | B | 2 | 0,5 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 3 |
| 10 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 4 | 7,75 |
| 10 | B | 2 | 0,5 | 0 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10 |
| 11 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,25 | 4 | 7,25 |
| 11 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+2 | 8,5 |
| 12 | A | 2 | 0 | 0 | 0,5 | 0,25 | 3+4 | 9,75 |
| 12 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+2 | 8,5 |
| 13 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 4 | 7,75 |
| 13 | B | 2 | 0,5 | 0 | 0 | 0,25 | 0 | 2,75 |
| 14 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 4 | 7,75 |
| 14 | B | 2 | 0,5 | 0 | 0 | 0,5 | 3+2 | 8 |
| 15 | A | 2 | 0 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10 |
| 15 | B | 1 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+2 | 7,5 |
| 16 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,25 | 4 | 7,25 |
| 16 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 4 | 7,5 |
| 17 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 4 | 7,75 |
| 17 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10,5 |
| 18 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 3+2 | 9 |
| 18 | B | 2 | 0,5 | 0 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10 |
| 19 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 4 | 7,75 |
| 19 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 3+2 | 9 |
| 20 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10,5 |
| 20 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+2 | 8,5 |
| 21 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,25 | 3+2 | 8,25 |
| 21 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+2 | 8,5 |
| 22 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 3+2 | 9 |
| 22 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+2 | 8,5 |
| 23 | A | 2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 3+4 | 11 |
| 23 | B | 2 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | 3+4 | 10,5 |

* sono evidenziati in grigio i punteggi che non hanno raggiunto il valore minimo di 7

istituto di ricerca sulle acque - cnr
NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a *Quaderni* (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)

Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque. Area della Ricerca RM1 – Montelibretti
Via Salaria km 29,300 C.P. 10 – 00016 Monterotondo (RM)

Tel. 06/90672850 - Fax 06/90672787

Direttore responsabile: Maurizio Pettine

Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta

Segreteria di redazione: G. Barbiero

Stampato in proprio e distribuito "on-line": www.irsacnr.it/Notiziario

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda