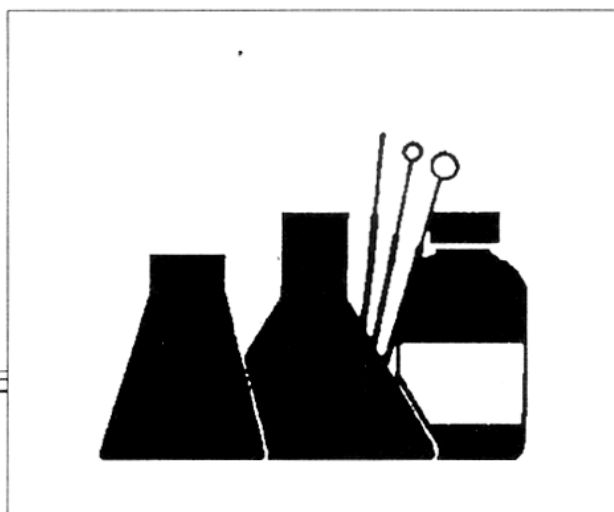

PAGINE APERTE



ENUMERAZIONE DELLE SALMONELLE NEI FANGHI

Roberto Spaggiari* e Yuri Veronesi*

La metodica di seguito proposta vuole essere un invito a promuovere una nuova "prassi" nello scambio delle informazioni e delle applicazioni nel campo della microbiologia ambientale, troppo spesso affidate alla discrezionalità dell'operatore. Sollecitiamo pertanto un dibattito su queste colonne con l'obiettivo di confrontare ed armonizzare le tecniche analitiche che ogni operatore applica nella routine quotidiana.

Come tutti gli addetti sanno, il decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 99 "Attuazione della direttiva CEE 86/278 concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura" prevede la determinazione delle salmonelle nei fanghi destinati allo spandimento su suoli agricoli, assumendo in 1.000 salmonelle/g di sostanza secca il valore massimo consentito.

Lo stesso decreto rimanda, per la loro ricerca, ai "Metodi analitici per i fanghi. Parametri biochimici e biologici" pubblicati nel Quaderno IRSA-CNR n. 64/83; la metodica ivi indicata, però, contempla una ricerca solo qualitativa, pertanto inadatta alla enume-

razione richiesta dalla norma.

Considerato che a distanza di un anno dalla promulgazione del decreto ancora non era uscito nessun aggiornamento da parte dell'IRSA, è stata allestita, nel nostro laboratorio, una serie di metodiche che sono state tra loro comparate al fine di meglio soddisfare sia le esigenze analitiche che quelle di controllo dei Servizi di igiene pubblica.

Scelta obbligata è stata l'utilizzo della tecnica dei tubi multipli che ben si adatta a campioni molto eterogenei per quanto riguarda il contenuto di sostanza secca e che consente di saggiare quantitativi di fango apprezzabili, aspetto non secondario se si considera che -trattandosi di campioni palabili- non è facile omogeneizzare al meglio la matrice.

Si riportano, al solo fine di ambientare lo studio, alcuni elementi prevalenti dell'indagine, condotta su 50 fanghi provenienti da altrettanti impianti di depurazione gestiti dall'A.G.A.C. di Reggio Emilia, che si ringrazia per la collaborazione fornita nella fase del prelievo. I campioni hanno presentato percentuali di sostanza secca variabile tra lo 0,1% e il 26%, collocandosi pertanto nella vasta tipologia che va dai fanghi pompabili fino a quelli palabili, pur avendo subito

* Presidio Multizonale di Prevenzione di Reggio Emilia

tutti un processo di trattamento, così come previsto dall'articolo 3 del decreto legislativo sopra citato.

La metodica utilizzata è descritta nell'appendice. Il prearricchimento del campione è stato realizzato in Selenite Brilliant Green allo scopo di rivitalizzare gli organismi "injured" e, nel contempo, favorire l'abbattimento della flora batterica indesiderata.

Per l'arricchimento, aliquote del medium precedente sono state trasferite in Selenite Broth, in Tetrastationato Broth ed in Rappaport-Vassiliadis Broth, incubando -secondo le indicazioni della letteratura- alla temperatura di 37 °C e 42 °C per 24 e 48 ore.

Il maggior recupero di salmonelle è stato ottenuto con l'uso del Selenite Broth; i titoli relativi hanno oscillato tra la negatività -registrata nel 50% dei casi- ed il valore massimo di 550 salmonelle/g ss.

Gli impianti di depurazione selezionati erano molto eterogenei: alcuni erano adibiti al trattamento di scarichi provenienti esclusivamente da insediamenti civili mentre altri ricevevano scarichi civili e produttivi o zootecnici. Un aspetto interessante emerso dallo studio è stata la relazione inversa tra il numero di salmonelle e la sostanza secca, evidenziando così un rischio maggiore per i campioni pompabili.

Tale riscontro può essere messo in relazione con i diversi tempi di maturazione del fango che, favorendo processi di concorrenza vitale e fermentazioni nei cumuli con conseguente innalzamento della temperatura, determinano un abbattimento delle enterobatteriacee ricercate.

BIBLIOGRAFIA

- L. Bonadonna - 1989. Salmonelle nell'ambito idrico. Quaderni di tecniche di protezione ambientale, n. 6, Pitagora ed., Bologna.
- P. Nappi - 1984. Metodiche microbiologiche - C 16 Salmonelle - Metodi analitici. Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente, Torino.
- L. Villa - 1983. Microrganismi indicatori di inquinamento fecale. Quaderni IRSA, n. 64 "Metodi analitici per i fanghi. Vol. I - Parametri biochimici e biologici", IRSA-CNR, Roma.
- L. Volterra et al. - 1986. Ricerca degli enterobatteri patogeni: Salmonelle e Shigelle. ISTISAN 86/20 "Acque destinate al consumo umano: tecniche per la ricerca dei parametri microbiologici accessori", Istituto Superiore di Sanità, Roma.
- L. Volterra, I. Di Girolamo - 1990. Riutilizzo agricolo dei reflui di depurazione: aspetti igienico-sanitari. ISTISAN 90/1, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

APPENDICE

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE SALMONELLE NEI FANGHI DEGLI IMPIANTI BIOLOGICI DI DEPURAZIONE

Principio

Tecnica dei tubi multipli MPN (Most Probable Number)

Materiali

- Mezzo di coltura per il prearricchimento: SBG - Selenite Brilliant Green Enrichment Broth
- Mezzo di coltura per l'arricchimento: Selenite Broth
- Mezzo di coltura per l'isolamento: Hektoen Enteric Agar
- Mezzo di coltura per l'identificazione: TSI - Triple Sugar Iron Agar
- Mezzo di diluizione: Acqua Triptonata allo 0,1 %
- Saggi di conferma: Prove biochimiche e sierologiche.

Procedimento

1- Prearricchimento

Allestire:

- 3 beute da 500 mL di SBG alla conc. di 1,5 x;
- 3 tubi da 20 mL di SBG alla conc. di 1,5 x;
- 3 tubi da 10 mL di SBG alla conc. di 1 x;
- 3 tubi da 10 mL di SBG alla conc. di 1 x;

Seminare rispettivamente 100, 10, 1 e 0,1 grammi di fango e incubare a 42 °C per 24 ore. La quarta serie di tubi viene allestita per garantire da subito una ulteriore diluizione del campione nel caso che le tre triplette precedenti dovessero risultare tutte positive.

2- Arricchimento

Trapiantare 0,5 mL di sospensione da ciascuna delle diluizioni che presentano torbidità in altrettanti tubi contenenti 10 mL di Selenite Broth alla concentrazione di 1 x ed incubare per 24 e 48 ore a 42 °C.

3- Isolamento

Da ogni tubo di SBG a 24 h e di Selenite a 24 e 48 h, isolare su Hektoen ed incubare a 37 °C per 24 h.

4- Identificazione

Le colonie sospette vengono coltivate per infissione a 37 °C per 24 h su TSI solidificato a becco di clarino.

5- Saggi di conferma

Sugli stipiti sospetti si procede alla identificazione attraverso le usuali prove biochimiche e sierologiche.

6- Espressione dei risultati

Per il calcolo si utilizza la tabella MPN nella configurazione 3-3-3 ricavata applicando la formula di Thomas.

Se vengono considerate le prime tre serie di prove il valore si esprime come N/1.000 g sul tal quale; se, invece, vengono utilizzate le ultime tre serie il risultato diviene N·10/ 1.000 g t.q. In entrambi i casi, il numero trovato o calcolato deve essere riportato all'unità grammo t.q. e, successivamente, al grammo di sostanza secca con la seguente formula:

$$N \frac{100}{\% \text{ ss}} = \text{Salmonelle/g ss}$$