

Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale

# biologia ambientale

3-4  
maggio-agosto 1995

BOLLETTINO C.I.S.B.A.



Spediz. abbon. post. 50% Reggio Emilia. Tassa pagata - Taxe perçue

Bimestrale, anno IX, n. 3-4, maggio-agosto 1995.

La raccolta comprende i metodi previsti dalla Legge 10 maggio 1976, n. 319 e dal D. Lgs. 25 gennaio 1992, n. 130





# biologia ambientale

Bollettino C.I.S.B.A. n. 3-4/1995

Autorizzazione del Tribunale di  
Reggio Emilia n. 837 del 14 maggio 1993

proprietario

**Paola Manzini**

(Presidente del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale)

direttore responsabile

**Rossella Azzoni**

REDAZIONE

**Rossella Azzoni**

responsabile di redazione

**Giuseppe Sansoni**

responsabile grafico

**Roberto Spaggiari**

responsabile di segreteria

Il C.I.S.B.A. - Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale  
si propone di:

- divenire un punto di riferimento nazionale per la formazione e l'informazione sui temi di biologia ambientale, fornendo agli operatori pubblici uno strumento di documentazione, di aggiornamento e di collegamento con interlocutori qualificati
- favorire il collegamento fra il mondo della ricerca e quello applicativo, promuovendo i rapporti tecnico-scientifici con i Ministeri, il CNR, l'Università ed altri organismi pubblici e privati interessati allo studio ed alla gestione dell'ambiente
- orientare le linee di ricerca degli Istituti Scientifici del Paese e la didattica universitaria, facendo della biologia ambientale un tema di interesse nazionale
- favorire il recepimento dei principi e dei metodi della sorveglianza ecologica nelle normative regionali e nazionale concernenti la tutela ambientale.

Per iscriversi al C.I.S.B.A. o per informazioni scrivere al:

*Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale,  
via Amendola 2, 42100 Reggio Emilia*

o telefonare al Segretario:

*Roberto Spaggiari: 0522/295460; fax 0522/295446*

Quote annuali di iscrizione al Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale: socio ordinario: £ 70.000; socio collaboratore £ 50.000; socio sostenitore £ 600.000.

conto corrente postale n. 10833424 intestato a: CISBA, RE

I soci ricevono il bollettino *Biologia Ambientale* e vengono tempestivamente informati sui corsi di formazione e sulle altre iniziative del C.I.S.B.A.

Gli articoli originali e altri contributi vanno inviati alla Redazione:  
*Rossella Azzoni Gastaldi, via Cola di Rienzo, 26 - 20144 Milano.*

I dattiloscritti, compreso il materiale illustrativo, saranno sottoposti a revisori per l'approvazione e non verranno restituiti, salvo specifica richiesta dell'Autore all'atto dell'invio del materiale.

Le opinioni espresse dagli Autori negli articoli firmati non rispecchiano necessariamente le posizioni del C.I.S.B.A.

*Riproduzione parziale da:*

**CNR-ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE, ROMA**

**Metodi analitici per le acque**

*Quaderno n. 100*

Comitato di redazione: C.M. Blundo, L. Campanella, S.

Capri, T. La Noce, A. Liberatori, R. Pagnotta e M. Pettine

Stampato da Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, 1994

## EDITORIALE



*N*ello scusarsi per il ritardo con cui viene dato alle stampe il presente numero del bollettino –ma certa di rendere un servizio utile a tutti i Soci del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale– la Redazione propone la riproduzione dei metodi microbiologici e tossicologici pubblicati dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del C.N.R. nella nuova edizione dei *Metodi Analitici per le acque*.

Come noto, l'analisi microbiologica si rende indispensabile non solo per il controllo delle acque destinate all'approvvigionamento idrico-potabile o di quelle di superficie destinate ad usi a rilevanza igienico-sanitaria, ma anche per il controllo delle acque reflue che vanno a modificare la qualità del corpo idrico recettore. Questo tema di lavoro, che storicamente compare fra le competenze del biologo, è patrimonio di tutti i servizi pubblici che tutelano la salute dell'uomo e dell'ambiente.

L'analisi tossicologica con animali acquatici, invece, ha lo scopo di valutare se un composto o un campione di acqua di scarico sono tossici, definirne il grado di tossicità ed i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica stessa. Questo tema di lavoro, relativamente recente, vede impegnato un numero sempre crescente di operatori ed è ancora in fase evolutiva, soprattutto per ciò che concerne lo sviluppo di "saggi multispecie".

La tossicologia ambientale è da anni ricompresa nei programmi di studio e d'aggiornamento del C.I.S.B.A. che, forte della sua collaborazione con l'I.R.S.A. a far tempo dai primi esercizi di intercalibrazione relativi al saggio con *Daphnia magna*, suggerisce agli addetti al controllo ambientale ai sensi della legge 319/76 di valutare l'accettabilità degli effluenti adottando sia le condizioni operative derivate dalla vigente normativa, sia quelle che assicurano al parametro "saggio di tossicità" un maggior livello di protezione. Tale suggerimento, che nasce dall'esperienza maturata in questi anni da numerosi tecnici operanti in varie sedi del territorio nazionale nel controllo delle acque usate, ha come scopo ultimo quello di creare un archivio di dati sul quale confrontarsi in sede di riformulazione legislativa del parametro "Saggio di tossicità", al fine di rendere sempre più elevato il grado di protettività dei dati ottenuti in laboratorio.

Biologia Ambientale  
La Redazione





# PRESENTAZIONE

*Il controllo delle caratteristiche di qualità delle acque costituisce un elemento fondamentale per la soluzione dei problemi legati alla gestione delle risorse idriche.*

*Nel corso degli anni 70, allo scopo di mettere a punto un valido strumento per il controllo analitico della qualità delle acque, l'Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche ha pubblicato il manuale «Metodi Analitici per le Acque». L'opera in tre volumi, risultato di un vasto programma di selezione ed elaborazione effettuato da un gruppo di lavoro ad hoc insediato presso l'Istituto, comprende metodi di analisi per la caratterizzazione fisica, chimica, biologica e microbiologica delle acque.*

*Con l'entrata in vigore della legge 10.5.76 n. 319 «Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento» che affida all'IRSA il compito di definire le metodologie analitiche per i parametri per i quali erano stati fissati limiti agli effluenti, tali metodi hanno assunto il carattere di ufficialità per il controllo della qualità delle acque di scarico.*

*Con questa nuova edizione, che si presenta rinnovata oltre che nei contenuti anche dal punto di vista grafico e di allestimento, l'IRSA intende dare un nuovo impulso all'attività relativa alla messa a punto e standardizzazione dei metodi analitici per le acque. Sull'esempio di quanto avviene in altri Paesi ad elevato grado di cultura ambientale, è prevista una periodica riedizione del manuale che amplii, anche alla luce dell'evoluzione della normativa ambientale, il numero dei parametri considerati e che recepisca gli elementi di novità che si manifesteranno a seguito dell'evoluzione scientifica e tecnologica riguardante l'analitica delle acque.*

*Le principali novità di questa edizione riguardano:*

- *una parte generale nella quale sono ampiamente trattate le problematiche relative alle strutture, attrezzature di laboratorio e caratteristiche dei reattivi, alle tecniche analitiche da utilizzare, all'elaborazione e presentazione dei risultati e soprattutto ai metodi di campionamento, prima e delicatissima fase dell'intero procedimento analitico;*
- *la descrizione di tecniche analitiche non riportate nella precedente edizione; in particolare vengono proposti metodi cromatografici per la determinazione degli inquinanti organici;*
- *una profonda revisione dei test di tossicità e l'inserimento, a livello di proposta sperimentale, del test su «Daphnia magna».*

*Per affrontare il lavoro di revisione, aggiornamento e messa a punto di nuovi metodi analitici, l'Istituto ha operato attraverso una Commissione, della quale hanno fatto parte rappresentanti delle più importanti istituzioni scientifiche nazionali sia pubbliche che private, ed attraverso Gruppi di Lavoro che hanno affrontato specifici aspetti delle varie problematiche analitiche. La realizzazione di questa opera è quindi stata resa possibile grazie ad una lunga e disinteressata collaborazione prestata in vario modo ed a vari livelli da numerosi colleghi del CNR, dell'Università e di altri Enti pubblici e privati. Ad essi, i cui nominativi sono riportati nel seguito, desidero far pervenire il mio personale ringraziamento.*

*Mi sia consentito infine esprimere la soddisfazione mia e di tutti i collaboratori dell'IRSA per il raggiungimento, con il presente manuale, del numero 100 della collana «Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque», collana che, nata nel 1968, ha trattato i più svariati temi relativi all'ambiente idrico ed alla sua gestione e conservazione*

Roberto Passino

*Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque*

Roma, Settembre 1994

# INDICE

- 1000 METODI FISICI, CHIMICI E CHIMICO-FISICI**  
1010 Strutture, attrezzature e reattivi  
1020 Lineamenti di tecniche analitiche  
1030 Metodi di campionamento  
1040 Elaborazione dei risultati
- 2000 PARAMETRI FISICI, CHIMICI E CHIMICO-FISICI**  
2010 Acidità e basicità  
2020 Colore A(3)  
2030 Conducibilità B  
2040 Durezza B  
2050 Materiali in sospensione A(7); B; C(4)  
2060 Materiali sedimentabili A(6)  
2070 Odore A(4)  
2080 pH A(1); C(3)  
2090 Salinità  
2100 Sapore  
2110 Temperatura A(2); B; C(1)  
2120 Torbidità
- 3000 METALLI E SPECIE METALLICHE**  
3010 Alluminio A(11)  
3020 Arsenico A(12); C(14)  
3030 Bario A(13)  
3040 Berillio  
3050 Boro A(14)  
3060 Cadmio A(15); B; C(15)  
3070 Calcio B  
3080 Cromo A(16.17); B; C(16)  
3090 Ferro A(18); B  
3100 Litio  
3110 Magnesio  
3120 Manganese A(19)  
3130 Mercurio A(20); B; C(17)  
3140 Nichel A(21); C(18)  
3150 Piombo A(22); B; C(19)  
3160 Potassio B  
3170 Rame A(23); B; C(20)  
3180 Selenio A(24)  
3190 Sodio B  
3200 Stagno A(25)  
3210 Tallio  
3220 Tellurio  
3230 Zinco A(26); B; C(21)
- 4000 COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI**  
4010 Azoto ammoniacale A(35); B; C(11)  
4020 Azoto nitrico A(37); B  
4030 Azoto nitroso A(36); B; C(7)  
4040 Biossido di carbonio  
4050 Cianuri A(27)  
4060 Cloro A(28); C(12)  
4070 Cloruri A(32); B  
4080 Fluoruri A(33)  
4090 Fosforo A(34); B; C(6)  
4100 Ossigeno disciolto B; C(2)  
4110 Silice  
4120 Solfati A(31); B  
4130 Solfiti A(30)  
4140 Solfuri A(29)
- 5000 COSTITUENTI ORGANICI**  
5010 Aldeidi alifatiche A(41)  
5020 Ammine alifatiche  
5030 Azoto organico  
5040 Carbonio organico  
5050 Erbicidi azotati A  
5060 Fenoli A(40); C(8)  
5070 Pesticidi clorurati A(ex 46)  
5080 Pesticidi fosforati A(47)  
5090 Policlorobifenili e policloroterfenili A  
5100 Richiesta biochimica di ossigeno (BOD) A(8); B; C(5)  
5110 Richiesta chimica di ossigeno (COD) A(9)  
5120 Solventi aromatici A(42)  
5130 Solventi clorurati A(44)  
5140 Sostanze oleose [Grassi e oli animali e vegetali A(38); Oli minerali A(39); B; C(9)]  
5150 Tensioattivi anionici A(45); C(13)  
5160 Tensioattivi non ionici A(45)
- 6000 METODI MICROBIOLOGICI**  
6010 Metodi di campionamento  
6020 Strutture ed attrezzature di laboratorio  
6030 Terreni di coltura  
6040 Lineamenti di tecniche analitiche
- 7000 PARAMETRI MICROBIOLOGICI**  
7010 Coliformi totali A(49); B  
7020 Coliformi fecali A(50); B  
7030 *Escherichia coli*  
7040 Streptococchi fecali A(51)  
7050 Conta batterica a 36 °C e a 22 °C  
7060 Spore di clostridi solfito-riduttori  
7070 Batteriofagi anti *Escherichia coli*
- 8000 PARAMETRI TOSSICOLOGICI**  
8010 Metodi di valutazione della tossicità con pesci A(48)  
8020 Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*

## NOTA

A= Tabella A, Legge n. 319 del 10.5.1976 e successive modifiche ed integrazioni

B= Decreto Consiglio Ministri del 4.2.1977: Criteri, metodologie e norme tecniche generali di cui all'art. 2, lettere b, d ed e della Legge n. 319 del 10.5.1976

C= Decreto legislativo n. 130 del 25.1.1992

( )= Il numero in parentesi è quello con cui è indicato il parametro nelle leggi



## 6000 - METODI MICROBIOLOGICI

Per "analisi microbiologica delle acque" si intende l'individuazione dei microrganismi presenti in esse, generalmente congiunta alla loro valutazione quantitativa. Ciò si ottiene mediante tecniche analitiche basate di solito sullo sviluppo di microrganismi, considerati pertanto espressione del grado di inquinamento cui le acque sono soggette, su terreni colturali idonei alla loro crescita.

L'analisi microbiologica riveste particolare importanza quando si considerino acque destinate all'approvvigionamento idrico-potabile sia in relazione alla loro qualità in funzione del trattamento di disinfezione cui debbono essere sottoposte, sia dopo la loro immissione nella rete idrica. Analogamente, con il controllo microbiologico si definisce la qualità di acque di superficie quando vengano destinate ad usi a rilevanza igienico-sanitaria (molluschicoltura, usi ricreativi, particolari usi agricoli).

Controlli microbiologici vengono anche effettuati su acque reflue che, con il loro apporto inquinante, influenzano e modificano le caratteristiche del corpo idrico recettore (fiume, lago, mare).

È evidente che l'unico controllo microbiologico efficace sarebbe costituito dalla ricerca dei patogeni (batteri e virus). Diverse difficoltà pratiche si oppongono però all'adozione "routinaria" di tale tipo di indagini nel controllo delle acque. Tuttavia, in casi particolari e disponendo di laboratori sufficientemente attrezzati, potrà essere opportuno effettuare la ricerca dei patogeni, e in primo luogo degli enterobatteri patogeni.

La ricerca dei patogeni deve essere effettuata su quantitativi relativamente elevati del campione di acqua da analizzare ma, mentre il loro rilevamento testimonia ovviamente della loro sicura presenza, non si può dire che un risultato negativo deponga sicuramente per la loro assenza. Infatti i patogeni possono essere presenti con discontinuità negli effluenti e conseguentemente nei corpi idrici riceventi; in aggiunta, la abbondante presenza di flora contaminante accessoria interferisce spesso con la reale possibilità di evidenziare i patogeni anche quando essi siano presenti.

Pertanto, a causa della discontinuità della loro presenza e delle difficoltà tecniche legate al loro isolamento nell'ambiente idrico, la ricerca dei patogeni non potrà tanto avere il significato di controllare la qualità delle acque, quanto finalità epidemiologiche, offrendo la possibilità di individuare uno degli anelli della catena attraverso la quale avviene la diffusione degli agenti patogeni responsabili delle malattie infettive di origini idrica.

Per quanto riguarda la ricerca degli enterovirus, è opportuno sottolineare che essa può essere praticata solo presso laboratori specificamente attrezzati.

L'esame microbiologico delle acque si basa essenzialmente sulla possibilità di coltivare su idonei terreni, ed in idonee condizioni colturali, i batteri contenuti nell'acqua in esame, utilizzando particolari metodologie finalizzate alla individuazione differenziale di specie o di gruppi microbici che si ritengono significativi ai fini del giudizio igienico e/o di qualità delle acque in esame.

I metodi tradizionali sono basati sulla semina in idonei terreni di coltura, in genere liquidi, e sulla incubazione in specifiche condizioni di aliquote dell'acqua da esaminare. Dopo incubazione la presenza o l'assenza del microrganismo ricercato nell'aliquota di campione seminata viene messa in evidenza sulla base della eventuale variazione subita dal terreno insemato (intorbidimento, cambiamento di colore, ecc.) e può costituire una prova presuntiva. Eventuali prove successive, partendo dalla coltura iniziale, costituiscono prove di conferma, alle quali possono fare seguito ulteriori saggi per la definitiva identificazione dei microrganismi ricercati.

Utilizzando terreni differenti ed opportune temperature di incubazione, è possibile rendere selettivo il metodo al fine di coltivare solo i gruppi microbici di interesse e, talora, una singola specie batterica.

Una variante introdotta da tempo nel metodo tradizionale è costituita dalla semina di quantità scalari del campione al fine di pervenire ad una stima probabilistica del numero di microrganismi presenti (metodo MPN o del numero più probabile o dei tubi

multipli).

Un'altra tecnica consiste nella semina di aliquote del campione da analizzare utilizzando specifici terreni solidificati all'agar. Dopo opportuna incubazione, si conta il numero delle colonie sviluppate, il quale permette di risalire al numero di batteri presenti per unità di volume del campione, partendo dal presupposto che ogni colonia abbia origine da un solo microrganismo.

La semina può essere effettuata sulla superficie di terreno agarizzato già solidificato in piastra di Petri o nella compagine del terreno all'agar. In questo caso la semina si effettua in piastra Petri e il terreno, mantenuto fuso a 45-50 °C, viene versato successivamente e lasciato poi solidificare (sistema dell'agargermi o pour plate): con la semina nella compagine del terreno, possono essere seminate aliquote di campione non superiori a 2 mL.

Nel caso della semina in superficie, non è ordinariamente possibile seminare aliquote superiori a 0,1 - 0,5 mL. È pertanto evidente che questa metodica è

utilizzabile solo per mettere in evidenza microrganismi presenti nel campione in numero relativamente elevato e che quindi siano in numero consistente in volumi ridotti.

Larga diffusione ha il metodo delle membrane filtranti. Esso permetterebbe anche l'esame di volumi illimitati di acqua. Tuttavia la presenza di materiali in sospensione nell'acqua analizzata può causare l'intasamento dei pori della membrana e costituisce il limite alla filtrazione di quantitativi di acqua troppo elevati.

Comunque, la metodica delle membrane filtranti, oltre a consentire l'esame di notevoli volumi di acqua, presenta i seguenti vantaggi:

1. Semplifica notevolmente le procedure di laboratorio, ne abbrevia i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione;
2. Consente, ordinariamente, di rilevare direttamente (per conta diretta) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato, contando le colonie sviluppatesi su membrana;
3. È agevolmente adattabile a situazioni di emergenza.



## 6010 - METODI DI CAMPIONAMENTO

Una corretta metodologia di campionamento e di trasporto dell'acqua da analizzare costituisce il presupposto indispensabile al fine di ottenere risultati analitici attendibili. Modalità non corrette di prelievo e di trasporto possono essere causa di errori analitici usualmente molto più sensibili di quelli legati a non corrette tecniche di laboratorio.

### 1 - Rappresentatività del campione

Il campione raccolto deve essere quanto più possibile rappresentativo al fine di fornire dati utili alla individuazione delle caratteristiche di qualità dell'acqua da esaminare. Tale esigenza deve essere soddisfatta tenendo conto della tipologia del corpo idrico.

Nel caso delle acque marine e di lago si dovranno tenere nel debito conto le variazioni sia spaziali che temporali cui la qualità dell'acqua può essere sottoposta a causa delle correnti, del moto ondoso, ecc.. In relazione all'estensione degli specchi acquei marini e talvolta anche di quelli lacustri, è di estrema importanza l'esatta identificazione del punto di campionamento.

Tale precisa identificazione dovrebbe essere preferibilmente effettuata sulla base delle coordinate geografiche. Tuttavia essa non è sempre realizzabile in quanto richiede strumentazioni e conoscenze che non sono sempre disponibili da parte di chi effettua il prelievo.

È pertanto opportuno fare riferimento, nella identificazione del punto di campionamento, a punti fissi a terra, indicando, comunque, la distanza da riva alla quale è stato effettuato il campionamento. Per le acque destinate all'uso balneare si dovrà fare riferimento al DPR 470/82.

Per i corsi d'acqua, in linea generale si dovrà prendere nota delle caratteristiche di portata (anche se approssimativamente stimata) e di quanto altro possa essere utile ad una corretta interpretazione dei risultati analitici.

Nel caso che le acque superficiali sia lacustri che fluviali siano destinate all'uso potabile, dopo tratta-

mento di potabilizzazione, si dovrà tenere conto di quanto disposto dal DPR 515/82 e dal Decreto del Ministero della Sanità del 15 febbraio 1983 (disposizioni relative ai metodi di misura, alla frequenza dei campionamenti e delle analisi delle acque superficiali destinate all'approvvigionamento idrico-potabile) emanato ai sensi dell'articolo 9 del sopracitato DPR 515/82. Per quanto riguarda il campionamento di acque destinate all'uso potabile, si rinvia a quanto specificamente disposto dal DPR 236/88.

Nel caso di acque di scarico, va anzitutto ricordato che, in base all'articolo 9 della legge 319/76, "la misurazione degli scarichi si intende effettuata subito a monte del punto di immissione nei corpi recettori". Inoltre la stessa legge 319/76, in nota alla tabella A, prescrive che "le determinazioni analitiche sono effettuate o su campione istantaneo o su campione medio prelevato ad intervalli di tempo variabili in rapporto al tipo di ciclo produttivo, ai tempi ed ai modi di sversamento, alla portata e alla durata degli scarichi".

La scelta tra campione istantaneo o campione medio e, ancor più, nel caso di campione medio, l'individuazione degli intervalli di tempo da utilizzare, è scelta difficile che può essere operata solo sulla base di una adeguata conoscenza delle condizioni non solo dello scarico, ma anche del ciclo produttivo. Ne consegue che tale tipo di scelta non può essere operata dal personale ordinariamente addetto alle operazioni di campionamento, ma implica conoscenze tecnologiche sufficientemente approfondite. Pertanto è opportuno che, in generale, il campionamento venga effettuato per mezzo del campione istantaneo, riservando prelievi per un campione medio ai casi nei quali l'operatore si possa giovare della indispensabile collaborazione di personale dotato di conoscenze soprattutto relative ai cicli tecnologici e alle modalità con le quali viene effettuato lo scarico.

### 2 - Modalità del campionamento

Il prelievo dei campioni per l'esame microbiologico deve essere sempre effettuato con recipienti sterili

e seguendo le usuali norme di asepsi.

Nel caso di acque destinate all'uso potabile tali norme di asepsi dovranno essere seguite scrupolosamente. Tali norme non devono necessariamente includere il "flambaggio" del rubinetto. Mentre infatti un flambaggio superficiale e fugace non esplica alcun effetto sul contenuto microbico (mentre esplica un effetto psicologico rassicurante su eventuali osservatori presenti), un flambaggio intenso del rubinetto può provocare danni allo stesso, in particolare alle guarnizioni e comunque alle parti infiammabili. Particolare cura dovrà invece essere prestata alla rimozione dal rubinetto di eventuali tubi di gomma o plastica, alla pulizia meccanica della bocca del rubinetto ed alla effettuazione del prelievo dopo aver fatto scorrere l'acqua per almeno 1 minuto, evitando di modificare l'apertura del rubinetto durante la raccolta del campione.

L'osservanza scrupolosa delle norme di asepsi non è richiesta per il prelievo di campioni di acqua per gli altri usi.

L'impiego di cautele igieniche a salvaguardia dell'operatore è invece richiesto nel caso di campionamento di acque inquinate e, particolarmente, di acque di scarico.

Qualora si abbia motivo di ritenere che l'acqua da esaminare contenga cloro, le bottiglie dovranno contenere una soluzione al 10% di sodio tiosolfato, nella quantità di 0,1 mL per ogni 100 mL di capacità della bottiglia aggiunto prima della sterilizzazione.

Considerando che la presenza di tiosolfato, nelle quantità indicate, non interferisce con i risultati delle analisi microbiologiche, è buona norma utilizzare sempre bottiglie cui sia stata aggiunta la soluzione di tiosolfato nella quantità e secondo le modalità sopra indicate.

Per l'esecuzione delle analisi microbiologiche si dovrà provvedere al prelievo dei quantitativi minimi sotto elencati, fermo restando che, ove siano richieste particolari indagini microbiologiche accessorie, è necessario procedere al prelievo di quantitativi notevolmente maggiori:

- Acque per uso potabile = 2 litri
- Acque da sottoporre a trattamento potabilizzante = 6 litri nel caso di acque di categoria A<sub>1</sub>; 2 litri nel caso di acque di categoria A<sub>2</sub>; 0,5 litri nel caso di

acque di categoria A<sub>3</sub>.

- Acque per uso balneare = 1 litro
- Acque di scarico = 2 litri.

All'atto del prelievo, la bottiglia sterile dovrà essere aperta avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo della bottiglia e si dovrà provvedere all'immediata chiusura della stessa subito dopo il prelievo.

Le bottiglie utilizzate per prelevare campioni per analisi microbiologiche, non devono mai essere sciacquate all'atto del prelievo. Il risciacquo oltre ad esporre la bottiglia a possibili contaminazioni, asporterebbe dalla bottiglia il tiosolfato eventualmente presente.

Per i prelievi da effettuare per immersione della bottiglia (mare, laghi, fiumi, raccolte idriche in genere) la bottiglia sarà afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema, previa apertura del tappo, e sarà immersa nell'acqua da prelevare e richiusa con le usuali cautele di asepsi. Nel caso di prelievo di acque per uso potabile (serbatoi, ecc.) da effettuare per immersione, si dovranno usare bottiglie incartate prima della sterilizzazione e la pinza o altro sistema idoneo dovranno essere sterilizzati alla fiamma prima dell'uso.

Nell'eseguire prelievi per l'esame microbiologico, si dovrà sempre avere cura di non riempire completamente la bottiglia, ma di lasciare uno "spazio d'aria" fra la superficie libera dell'acqua ed il tappo, al fine di consentire una efficace agitazione del campione, in laboratorio, al momento dell'analisi.

Per i prelievi da effettuarsi in profondità è necessario servirsi di speciali apparecchiature che consentono l'apertura a comando della bottiglia per mezzo di vari dispositivi.

### 3 - Parametri da rilevare all'atto del campionamento

La raccolta del campione deve essere accompagnata da alcune determinazioni da effettuare preferibilmente (alcune obbligatoriamente) sul luogo. Si tratta di determinazioni di alcuni parametri i quali durante la conservazione ed il trattamento vanno incontro a variazioni tali da non consentire più la loro corretta misurazione in laboratorio. I parametri da rilevare sul luogo variano molto in relazione al tipo di acqua,



all'uso ed al tipo di analisi.

La temperatura, la cui determinazione è richiesta obbligatoriamente per alcuni usi (ad esempio acqua potabile e balneare) o per alcune tipologie (ad esempio acque di scarico), va misurata in situ, all'atto del prelievo utilizzando un comune termometro di idonea sensibilità o una di quelle sonde che presentano il vantaggio, rispetto al termometro, di rilevare la temperatura dell'acqua anche a differenti profondità, al di sotto del pelo libero dell'acqua (mari, laghi, ecc.). Il termometro classicamente utilizzato per il rilevamento della temperatura dell'acqua è il cosiddetto termometro a pozzetto. Esso è dotato di un piccolo recipiente, alla sua estremità, dalla parte del bulbo del termometro, solidale con il termometro stesso, nel quale si raccoglie l'acqua prelevata con l'immersione. Consente alla colonnina termometrica (in genere di mercurio) di rimanere al livello corrispondente alla temperatura del campione, per il tempo necessario ad effettuare la lettura, in quanto il bulbo del termometro continua ad essere immerso nell'acqua campionata.

La concentrazione di ossigeno disciolto, anch'essa richiesta obbligatoriamente per alcuni usi (ad esempio acque di balneazione), fa parte di quei parametri che durante la conservazione ed il trasporto del campione possono andare incontro a modifiche che possono togliere significato alla determinazione effettuata in laboratorio. La determinazione in loco si effettua con apposite sonde (metodo elettrometrico) alcune delle quali (le sonde multiparametriche) hanno il vantaggio di consentire il rilevamento di più parametri.

La concentrazione di cloro attivo, anch'essa richiesta obbligatoriamente in alcuni casi (acque potabili, acque di scarico ecc.), deve essere effettuata in loco. Infatti l'eventuale presenza di sostanze riducenti (in primo luogo le sostanze organiche) determina un progressivo consumo di cloro, durante la conservazione ed il trasporto, tale che la determinazione effettuata in laboratorio darebbe valori nettamente inferiori (fino all'assenza) di cloro-attivo rispetto ai valori presenti nel campione all'origine.

La determinazione del pH, richiesta obbligatoriamente in molti casi (ad esempio acque potabili, acque di balneazione, acque di scarico, ecc.), deve essere effettuata in loco soprattutto in quei casi in cui (come nelle acque di scarico) la presenza concomitante di sostanze interferenti, non sempre note, può provo-

care sensibili variazioni del valore del pH durante la conservazione ed il trasporto. La determinazione in loco del pH deve essere effettuata preferibilmente con il metodo elettrometrico. La determinazione con metodi colorimetrici (cartine per la misura del pH la cui colorazione assunta, a contatto con l'acqua, viene raffrontata ad una scala cromatica) è da ritenere estremamente imprecisa e da tenere in considerazione solo in situazioni di emergenza.

La trasparenza, quando richiesta (obbligatoriamente, ad esempio, per le acque di balneazione) è un parametro che viene misurato in loco con il disco Secchi per mezzo del quale si misura a quale profondità dal pelo libero dell'acqua è ancora visibile il disco. La misura viene espressa in metri. Si tratta di una misurazione molto imprecisa in quanto soggetta a cause di errore oggettive e soggettive e che, nel caso delle acque potabili, si tende a sostituire con la determinazione della torbidità, in laboratorio.

La verifica in loco degli oli minerali (acque di balneazione) viene effettuata con l'ispezione visiva (presenza di pellicola visibile sulla superficie dell'acqua) e olfattiva (presenza di odore caratteristico). Una valutazione più precisa, peraltro obbligatoriamente richiesta nel caso delle acque potabili e delle acque di scarico, è quella effettuata in laboratorio.

Analogamente alla verifica della presenza di oli minerali, nelle acque di balneazione la presenza di tensioattivi viene effettuata in loco accertando, all'ispezione visiva, la presenza, di schiuma persistente. Anche in questo caso, una valutazione più precisa, peraltro obbligatoriamente richiesta per le acque potabili e per le acque di scarico, è quella effettuata in laboratorio.

#### **4 - Etichettatura ed identificazione dei campioni**

Il campione prelevato deve essere etichettato in modo chiaro con tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua, la precisa annotazione del punto in cui si è effettuato il prelievo e dovranno altresì essere trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra osservazione che possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio.

## 5 - Modalità e tempi di trasporto e conservazione

Tutti i campioni d'acqua, indipendentemente dalla loro natura, devono essere esaminati nel minore tempo possibile. Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra + 4° e + 10 °C.

Le alterazioni cui possono andare incontro i campioni prelevati, in seguito alla inosservanza dei tempi e/o delle modalità di trasporto, sono influenzate dalla composizione chimica dell'acqua, dal pH, dall'azoto proteico, dalla qualità e dalla quantità della flora batterica presente e da altri fattori indeterminati. Tra il momento del prelievo e l'esecuzione delle analisi microbiologiche, i tempi massimi consentiti dovrebbero essere i seguenti:

- Acque potabili = 24 ore
- Acque dolci superficiali, acque marine, acque di scarico = 6 ore.

A tal fine i campionamenti dovranno essere programmati tenendo conto delle disponibilità del laboratorio, in particolare dell'orario di lavoro del personale,

o meglio gli orari di lavoro dovranno essere armonizzati con le esigenze tecniche lavorative. Quando non sia possibile rispettare i tempi massimi sopracitati, dovrà essere considerata la possibilità di utilizzare, almeno per alcune indagini microbiologiche, idonei sistemi analitici portatili o laboratori mobili.

Al fine di consentire il mantenimento della temperatura richiesta (fra + 4° e + 10 °C) è necessario usare contenitori termoisolanti (tipo contenitori frigoriferi da picnic) utilizzando, per il mantenimento della temperatura, apposite piastre frigorifere del commercio, o ghiaccio secco o ghiaccio di acqua.

Nel caso venga utilizzato ghiaccio secco si dovrà evitare il contatto diretto con i campioni prelevati al fine di evitare il congelamento dell'acqua contenuta. Nel caso venga utilizzato ghiaccio di acqua, è necessario che il ghiaccio sia posto in un idoneo recipiente impermeabile all'acqua al fine di evitare che l'acqua di scongelamento possa contaminare i campioni.

Durante il trasporto le bottiglie dovranno essere collocate nel contenitore in modo da impedire il loro rovesciamento e, fra le bottiglie, dovranno essere collocati idonei sistemi di separazione (in genere fogli di carta bibula) per evitare rotture.

## 6020 - STRUTTURE ED ATTREZZATURE DI LABORATORIO

Le indagini microbiologiche da effettuare su campioni di acqua presuppongono l'uso delle normali attrezzature dei laboratori microbiologici.

Nel campo della microbiologia delle acque, negli ultimi anni ha avuto un notevole sviluppo la tecnica delle membrane filtranti che ha trovato applicazione sia nella ricerca degli indicatori, sia nelle indagini microbiologiche supplementari, in particolare finalizzate alla ricerca di microrganismi patogeni.

La tecnica della filtrazione su membrana, della quale si parlerà diffusamente, abbrevia notevolmente i tempi richiesti per l'esecuzione delle analisi, richiede spazi molto più contenuti per l'incubazione e si presta facilmente all'utilizzo in condizioni di emergenza, come attrezzatura portatile e su laboratori mobili.

### 1 - Armadi termostatici e camere termostatiche

Dovranno assicurare nei vari scomparti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti  $\pm 0,5$  °C. Sono preferibili gli armadi termostatici a camicia d'acqua. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata.

È opportuno che gli armadi termostatici e le camere termostatiche siano provvisti inoltre di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di  $0,5$  °C e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione. Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.

È altresì opportuno che gli armadi e le camere termostatiche siano provviste di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compre-

so fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo dell'armadio. Per i piccoli incubatori si possono utilizzare fogli di carta bibula o altro materiale idrofilo, opportunamente riforniti periodicamente di acqua.

La temperatura di esercizio degli armadi termostatici e delle camere termostatiche dovrà normalmente essere fissata a  $36 \pm 0,5$  °C. Per procedure di incubazione che richiedono temperature diverse si dovrà disporre di armadi termostatici supplementari. Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione del calore e non essere eccessivamente ammassato.

### 2 - Incubatori ad alta temperatura

Per incubatori a temperature superiori a  $40$  °C sono senz'altro da preferire i bagnomaria termostatici che devono controllare la temperatura entro limiti non eccedenti  $\pm 0,2$  °C.

Il bagno termoregolato dovrà essere provvisto di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. I bagni termoregolati dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di  $0,1$  °C, di termometro a massima e minima con una sensibilità di  $0,2$  °C, e possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione. Essi dovranno essere inoltre dotati di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. È opportuno utilizzare acqua distillata. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo.

Eventuali depositi di ruggine nel bagnomaria possono esplicare una azione termoisolante e devono essere rimossi. L'aggiunta di 2 g di bicromato di potassio e di 0,5 g di sodio carbonato (o di 1,0 g di sodio bicarbonato) per un litro di acqua è efficace per impedire la formazione di ruggine (il bicromato ed il



carbonato o bicarbonato devono essere aggiunti separatamente per evitare una violenta reazione esotermica).

Eventuale sviluppo di alghe o i funghi nell'acqua del bagnomaria possono essere eliminati mediante l'uso di composti ammoniacali quaternari che si fanno agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

### 3 - Frigoriferi e congelatori

Possono essere utilizzati frigoriferi e congelatori normalmente impiegati per l'uso domestico. I frigoriferi devono assicurare una temperatura di  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ed i congelatori una temperatura non superiore a  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Particolare attenzione dovrà essere prestata alla scelta di frigoriferi e congelatori di dimensioni idonee in relazione alla quantità di materiale da conservare.

### 4 - Apparecchi per sterilizzazione

#### STUFE A SECCO

Devono consentire il raggiungimento della temperatura di  $+170 \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 2 ore. È necessario che siano corredati di un termometro a gambo lungo, di precisione accettabile nell'intervallo fra  $160$  e  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  e di un idoneo sistema di termoregolazione. È altresì opportuno che siano forniti di un sistema di interruttore a tempo che consenta di programmare il tempo di sterilizzazione.

Le stufe a secco devono avere sufficiente capacità in modo da evitare eccessivo accumulo di materiale da sterilizzare.

#### AUTOCLAVI

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (terreni di coltura, bottiglie da prelievo, attrezzature filtranti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. Dovranno possedere buone caratteristiche costruttive e di funzionamento. Sono ormai preferiti i modelli che permettono il controllo automatico della temperatura, della pressione e del tempo consentendo, fra l'altro, la loro

regolazione in relazione alle specifiche esigenze del materiale da sterilizzare. L'uso di autoclavi verticali, di cui esistono modelli idonei, potrà rispondere bene in situazioni particolari.

In condizioni di emergenza sono utilizzabili anche le comuni pentole a pressione per uso domestico; di esse esistono anche modelli di capacità relativamente elevata (20 litri). È però essenziale che esse siano fornite anche di termometro, il cui bulbo dovrà trovarsi a circa 2-3 cm al di sopra del livello dell'acqua.

#### ALTRI APPARECCHI PER STERILIZZAZIONE

Le apparecchiature per la filtrazione su membrana devono normalmente essere sterilizzate in autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti, dopo accurato lavaggio e adeguato confezionamento.

Per la sterilizzazione degli imbuti filtranti, fra una filtrazione e l'altra, sono particolarmente idonei i sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (U.V.). Il materiale deve essere lavato e, successivamente, esposto ai raggi ultravioletti per 5 minuti.

È da tenere presente che la vita media di una lampada U.V. è di circa 5000 ore. Inoltre è necessario prendere le dovute precauzioni per evitare gli effetti nocivi degli U.V. sugli occhi e sulla pelle degli operatori e l'effetto battericida su eventuali colture batteriche accidentalmente esposte alle radiazioni U.V.

### 5 - Bilance

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con sensibilità di 1 g. Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di una bilancia analitica con una sensibilità di 1 mg.

### 6 - Apparecchiature per la misura del pH

Il pH dei terreni di coltura può essere determinato per via colorimetrica con l'uso di appropriati indicatori (quando non vi siano interferenze provocate dal colore del terreno) effettuando la lettura con l'impiego di comparatori muniti degli appositi dischi o con altro dispositivo appropriato. Le determinazioni possono essere effettuate con migliore precisione e spedimen-

te per via potenziometrica con l'uso di piaccametri.

## 7 - Vetreria e materiale vario

È da preferire la vetreria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione (da effettuare in stufa a secco alla temperatura di 170 °C per almeno 1 ora o in autoclave a 121 °C per 30 minuti) la vetreria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Dopo lavaggio e asciugatura la vetreria, per essere sterilizzata, deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.

Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di mano d'opera che altrimenti doveva essere impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro.

I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti ed avere segni di calibrazione che corrispondano a precise indicazioni volumetriche. Esistono in commercio articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

### BOTTIGLIE PER PRELIEVO

Possono essere di vetro neutro, resistenti alla sterilizzazione, da chiudere con tappo smerigliato o con idoneo tappo a vite. Prima della sterilizzazione, le bottiglie con tappo smerigliato debbono essere provviste di un cappuccio di copertura di carta resistente ed impermeabile o di un foglio di alluminio. Tale tipo di protezione non è richiesto per le bottiglie munite di tappo a vite. Per il campionamento possono essere anche utilizzate bottiglie monouso in materiale plastico, disponibili in commercio già sterili, in genere in confezioni multiple.

Le bottiglie per prelievo dovranno comunque essere di capacità idonea per raccogliere i quantitativi di acqua necessari per l'esecuzione delle analisi

microbiologiche.

### BOTTIGLIE E TUBI PER DILUIZIONE

Sono utilizzabili bottiglie e tubi preferibilmente in vetro, resistenti alla sterilizzazione. Particolarmente pratiche sono le bottiglie della capacità di poco superiore a 100 mL che presentano un segno di taratura in corrispondenza del volume 99 mL; ugualmente pratici sono i tubi con un segno di taratura in corrispondenza del volume di 9 mL: con l'aggiunta di 1 mL di campione si ottengono rispettivamente diluizioni 1:100 e 1:10.

Le bottiglie e i tubi per diluizione dovranno essere provvisti di tappo smerigliato, di tappo di gomma o di tappo a vite. Possono essere impiegate anche bottiglie (o tubi) di plastica, fabbricate con materiale idoneo e non tossico e resistenti alla sterilizzazione.

### PIPETTE

Per le varie operazioni occorrono pipette di varia capacità (da 1, da 5 e da 10 mL) graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL. Dovranno essere scartate le pipette con la punta rotta. Prima della sterilizzazione saranno munite di filtro di cotone grezzo all'estremità superiore, al fine di prevenire l'ingestione accidentale di sostanze pericolose, inclusi i germi patogeni, da parte dell'operatore. A tal fine è preferibile utilizzare sistemi di aspirazione tipo pompe aspiranti a bulbo di gomma o pipettatrici automatiche. Le pipette vanno sterilizzate in confezione singola (montata in provetta) o multipla (in apposite custodie di metallo preferibilmente di acciaio inossidabile, o in vetro). Sono disponibili in commercio confezioni di pipette monouso in materiale plastico, di varia misura, già sterili.

### TUBI PER CULTURA

I tubi vengono usati per la tecnica dei tubi multipli, per l'esecuzione di test biochimici, per la conservazione di colture batteriche, ecc. Si utilizzano tubi di diverse dimensioni in relazione all'utilizzo. I tubi devono essere chiusi utilizzando preferibilmente tappi in metallo, in materiale plastico o in cotone grezzo. Sono decisamente da preferire i tubi in vetro

resistente alla corrosione ed alla sterilizzazione, mentre i tubi monouso sono sconsigliabili a causa di possibili interazioni fra tubo e terreni di coltura durante la conservazione.

#### PIASTRE DI PETRI

L'uso delle piastre di Petri è indispensabile per l'esecuzione del conteggio delle colonie su agar, per l'isolamento di colture batteriche e per le colture su membrana filtrante. Vengono utilizzate piastre di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm ed un'altezza di 15 mm e viene ordinariamente utilizzato per le semine e per le colture in agar germi. Per la tecnica delle membrane filtranti, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di membrane di 47 mm di diametro, si usano piastre del diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.

Piastre di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre in materia plastica che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate. L'uso di queste piastre in plastica monouso si è fortemente diffuso a causa del loro basso costo, della eliminazione delle operazioni di lavaggio e di sterilizzazione e della eliminazione dei rischi di rottura.

Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le piastre di Petri devono essere perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie, con il fondo perfettamente piano e, utilizzando la tecnica delle membrane filtranti, si debbono utilizzare piastre il cui coperchio realizzi una chiusura a tenuta al fine di ridurre l'evaporazione dei terreni durante l'incubazione.

### 8 - Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione

#### MEMBRANE FILTRANTI

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono costituite da dischi di esteri di cellulosa con pori, uniformemente distribuiti. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro di  $0,45 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,02 \mu\text{m}$ ). A causa della loro polarità hanno la capacità di trattenere sulla loro

superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua. Disponendo quindi le membrane o su dischi assorbenti imbevuti di liquido colturale o su terreno di coltura agarizzato, il passaggio per capillarità dei principi del terreno permette lo sviluppo di colonie batteriche sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione.

Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico delle acque vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47 mm. In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate in autoclave, con raggi gamma o con ossido di etilene.

Le membrane si differenziano a seconda della ditta di produzione. Problemi si possono verificare in relazione al tipo di membrane utilizzate: inibizione batterica in corrispondenza della linea del reticolo, scioglimento delle colonie, crescita lungo la linea del reticolo, presenza di zone idrofobiche. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, sarebbe consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

#### APPARECCHIATURE PER LA FILTRAZIONE CON MEMBRANE FILTRANTI

Esistono numerosi tipi di apparecchiature da impiegare con le membrane filtranti, utilizzabili per diversi usi di laboratorio. Nel caso dell'esame batteriologico delle acque, vanno utilizzate apparecchiature idonee per l'impiego delle membrane filtranti del diametro di 47 mm.

Dette apparecchiature possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Esse devono essere sterilizzate in autoclave a  $121^\circ\text{C}$  per 15 minuti, dopo accurato lavaggio ed asciugatura. Prima della sterilizzazione vanno avvolte in carta idonea per mantenere la sterilità durante la conservazione.

Durante l'esecuzione di analisi routinarie, fra una filtrazione e la successiva, la sterilizzazione può essere effettuata con i raggi ultravioletti per almeno 5 minuti. Possono essere impiegate apparecchiature filtranti singole o in serie, utilizzando come sistema aspirante, una pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua. È essenziale che fra sistema filtrante e sistema aspirante sia interposto un idoneo sistema di cattura dell'acqua filtrata.



## 6030 - TERRENI DI COLTURA

L'allestimento dei terreni colturali secondo formule e modalità rigorosamente definite è di primaria importanza per assicurare la ripetibilità e la comparabilità dei risultati ottenuti. A questo scopo è consigliabile utilizzare i terreni forniti in forma disidratata, in polvere o in granuli, disponibili in commercio. Essi sono meno soggetti a modificazioni nella composizione che eventualmente può verificarsi quando si vengono a pesare i singoli ingredienti. In più, oltre a fornire una maggiore uniformità nella composizione, vengono anche ridotti significativamente i tempi ed i costi di preparazione.

In generale, vengono utilizzati terreni a formulazione completa. In alcuni casi, tuttavia, vengono forniti terreni-base da integrare al momento della preparazione con l'aggiunta dei componenti mancanti (antibiotici, alcoli, ecc.). In ogni caso l'allestimento di ciascun terreno deve essere effettuato secondo le specifiche.

I terreni forniti sotto forma disidratata rimangono tuttavia stabili per tempi definiti. Alcuni componenti possono alterarsi, modificando così le caratteristiche del terreno stesso. È necessario evitare che vengano conservati in ambienti umidi, in quanto igroscopici. Anche l'imperfetta chiusura del contenitore può comportare una modifica del tenore di umidità.

Un terreno in polvere, lasciato a lungo in ambiente umido, diventa compatto o, in alcuni casi, assume una consistenza viscosa e una diversa colorazione. In ogni caso, il terreno può fornire risultati modificati in funzione delle alterazioni biochimiche subite. Pertanto la fornitura del laboratorio di terreni disidratati dovrebbe essere rinnovata ogni anno ed in ogni caso è consigliabile rifornirsi di limitate quantità di terreno (commercialmente sono disponibili quantitativi di 500 g).

I terreni disidratati sono ricostituiti aggiungendo ad un quantitativo specifico di polvere uno specifico volume di acqua distillata, esente da tracce di metalli e di sostanze batteriostatiche o battericide. Il terreno

viene sciolto agitando e portandolo a completa soluzione.

In tempi recenti è entrato nell'uso corrente, soprattutto per semplificare il lavoro di laboratorio, l'impiego di terreni sotto forma di dischetti nutrienti. Si tratta di cartoncini, di forma circolare con diametro di circa 50 mm, adsorbiti di terreno di coltura, sterili, disidratati che vengono reidratati con acqua distillata sterile al momento dell'uso. Si conservano a temperatura ambiente ed hanno una durata di efficienza di circa 1 anno. Sono adatti soprattutto per applicazioni in laboratori non pienamente equipaggiati per i controlli microbiologici. Inoltre, possono essere utili per controlli di routine in quanto riducono il lavoro e il tempo necessario altrimenti occorrenti per preparare i terreni disidratati in polvere.

In alcuni casi, si può verificare l'evenienza di preparare terreni di coltura a partire dai singoli componenti. In questo caso è necessario che questi siano di buona qualità e che i terreni allestiti diano risultati analoghi a quelli ottenibili con i terreni disidratati di riferimento. Tutte le sostanze impiegate, inclusi gli zuccheri e i coloranti, dovranno possedere i necessari requisiti di qualità e di purezza che dovranno essere valutati possibilmente in prove preliminari.

I terreni preparati possono essere conservati in beute, tubi e piastre di Petri, in un luogo a riparo dalla luce diretta e refrigerati o a temperatura ambiente. In ogni caso, lunghi tempi di conservazione possono alterare le caratteristiche del terreno e favorire la contaminazione.

Come già in precedenza esposto tra le procedure standard per la determinazione quantitativa dei microrganismi presenti nelle acque, il metodo della conta diretta su membrane filtranti (MF) e quello del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) sono i più diffusi. In alcuni casi, possono essere impiegati i metodi dell'agar-germi o della semina in superficie. La scelta della tecnica più idonea da utilizzare per l'esame microbiologico è in funzione del tipo di acqua da esaminare.

## 6040 - LINEAMENTI DI TECNICHE ANALITICHE

### METODO A - Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

La tecnica MPN è consigliabile per l'analisi di acque reflue clorate e non, e può essere usata per l'esame di acque superficiali e marine. Questa tecnica può essere impiegata come alternativa a quella delle membrane filtranti nei casi in cui si analizzi acqua che presenti in sospensione del particolato (sabbia, argilla, ammassi gelatinosi, ecc.) e che comunque superi il valore di 1 unità nefelometrica di torbidità (NTU). I volumi d'acqua che possono essere esaminati con questa tecnica sono ridotti in considerazione delle difficoltà tecniche di preparazione e distribuzione di aliquote elevate del campione di acqua da esaminare.

Il metodo dei tubi multipli fornisce una stima statistica della densità batterica del campione analizzato. Si basa infatti sulla combinazione dei tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemmentati con l'acqua in esame. Infatti, a meno che non venga esaminato un gran numero di aliquote di acqua, la precisione del risultato è piuttosto bassa.

In considerazione del fatto che i microrganismi sono distribuiti in modo casuale nel campione, ci si può aspettare che, anche quando il campione contenga una cellula microbica per mL, circa il 37% dei tubi insemmentati con 1 mL del campione possa essere negativo. Infatti, a causa della distribuzione casuale dei batteri nel campione stesso, la positività nei tubi può essere dovuta all'inoculo di 1 o più microrganismi. Il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$\text{MPN}/100 \text{ ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ di tubi positivi} \times 100}{\sqrt{\frac{\text{mL di campione nei tubi negativi}}{\text{mL di campione in tutti i tubi}}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, da una apposita tabella già predisposta (Tab. 1). Essa riporta il valore dell'indice MPN

corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei batteri.

#### PROCEDURA

In 3 serie di 5 tubi contenenti terreno colturale liquido si inoculano aliquote scalari del campione o di una sua diluizione. La descrizione della preparazione delle diluizioni è riportata in Fig. 1. In ciascuno dei primi 5 tubi si seminano 10 mL dell'acqua in esame, nei successivi 5 tubi 1 mL ciascuno e in ciascuno degli ultimi 5 tubi 0,1 mL. Tale sistema permette di rilevare valori dell'indice MPN compresi tra 0 e 1609 per 100 mL di acqua. Nell'eventualità che si inoculino 3 serie di 3 tubi con le stesse aliquote il valore dell'indice MPN può oscillare tra 0 e 1100 per 100 mL di campione. Quando l'acqua in esame ha una bassa carica microbica è necessario analizzare volumi più grandi. In questo caso, da una semina di 100, 10 e 1 mL si otterrà un valore dell'indice MPN ricavato dalla tabella che dovrà essere moltiplicato per 0,1. Se, d'altra parte, le quantità seminate saranno 1 - 0,1 e 0,01 mL, il valore riportato in Tab. 1 dovrà essere moltiplicato 10 (oppure 100 volte se le aliquote seminate saranno di 0,1 - 0,01 e 0,001 mL).

Quando non è possibile prevedere il grado di contaminazione di un campione di acqua, è necessario utilizzare più di 3 serie di tubi. Si potranno utilizzare 5 serie di 5 tubi ciascuno, seminando nella prima serie 10 mL di campione per tubo, nella seconda serie 1 mL per tubo, nella terza 0,1 mL per tubo, nella quarta 0,01 mL per tubo e nella quinta 0,001 mL per tubo. Con questo sistema si possono rilevare indici MPN fino a 160900 per 100 mL.

Per calcolare l'indice MPN sono significative però, soltanto 3 delle 5 serie impiegate. Per selezionare le 3 serie da tenere in considerazione per il calcolo dell'indice MPN, si individua quella con l'inoculo più basso in cui tutti e 5 i tubi sono risultati positivi e le 2 serie successive con gli inoculi di aliquote scalari più

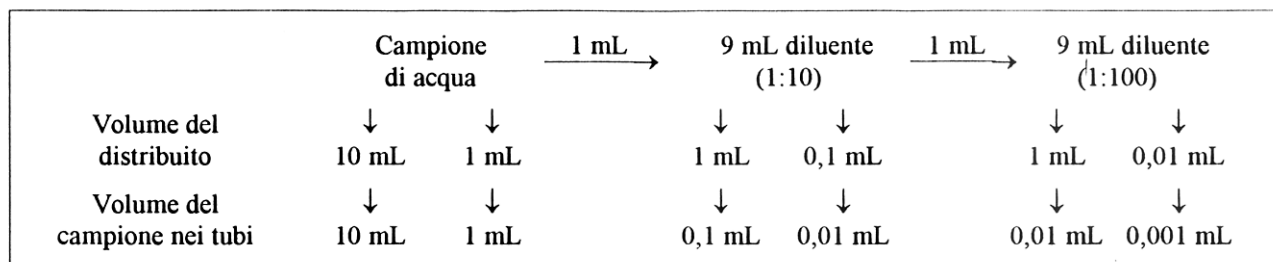


Fig. 1 - Preparazione delle diluizioni.

Tab. 1 - Indice M.P.N. e limiti di fiducia al 95% per varie combinazioni di risultati positivi, quando i tubi vengono inoculati con le diluizioni di 10 mL, 1 mL e 0,1 mL.

Combinaz. positive	Diluizione nei tubi					
	3			5		
	MPN index 100 mL	Limite di fiducia al 95%		MPN index 100 mL	Limite di fiducia al 95%	
		inferiore	superiore		inferiore	superiore
0-0-0	<3	-	-	<2	-	-
0-0-1	3	<0.5	9	2	<0.5	7
0-1-0	3	<0.5	13	2	<0.5	7
0-2-0	-	-	-	4	<0.5	11
1-0-0	4	<0.5	20	2	<0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0.5	15
2-0-0	9	1	36	4	<0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	-	-	-
2-3-0	-	-	-	12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	59	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380	-	-	-
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	-	-	-
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	-	-	-
3-3-0	240	36	1.300	-	-	-
3-3-1	460	71	2.400	-	-	-
3-3-2	1.100	150	4.800	-	-	-
3-3-3	≤2.400	-	-	-	-	-
4-0-0	-	-	-	13	3	31
4-0-1	-	-	-	17	5	46
4-1-0	-	-	-	17	5	46

Combinaz. positive	Diluizione nei tubi					
	3			5		
	MPN index 100 mL	Limite di fiducia al 95%		MPN index 100 mL	Limite di fiducia al 95%	
		inferiore	superiore		inferiore	superiore
4-1-1	-	-	-	21	7	63
4-1-2	-	-	-	26	9	78
4-2-0	-	-	-	22	7	67
4-2-1	-	-	-	26	9	78
4-3-0	-	-	-	27	9	80
4-3-1	-	-	-	33	11	93
4-4-0	-	-	-	34	12	93
5-0-0	-	-	-	23	7	70
5-0-1	-	-	-	31	11	89
5-0-2	-	-	-	43	15	110
5-1-0	-	-	-	33	11	93
5-1-1	-	-	-	46	16	120
5-1-2	-	-	-	63	21	150
5-2-0	-	-	-	49	17	130
5-2-1	-	-	-	70	23	170
5-2-2	-	-	-	94	28	220
5-3-0	-	-	-	79	25	190
5-3-1	-	-	-	110	31	250
5-3-2	-	-	-	140	37	340
5-3-3	-	-	-	180	44	500
5-4-0	-	-	-	130	35	300
5-4-1	-	-	-	170	43	490
5-4-2	-	-	-	220	57	700
5-4-3	-	-	-	280	90	850
5-4-4	-	-	-	350	120	1.000
5-5-0	-	-	-	240	68	750
5-5-1	-	-	-	350	120	1.000
5-5-2	-	-	-	540	180	1.400
5-5-3	-	-	-	920	300	3.200
5-5-4	-	-	-	1.609	640	5.800
5-5-5	-	-	-	≤2.400	-	-



basse. Nel caso in cui, oltre alle 3 serie di tubi considerate, esista una quarta serie con qualche tubo positivo, il numero dei tubi positivi di quest'ultima serie si somma al numero dei tubi positivi della serie immediatamente precedente (la terza ed ultima).

#### **METODO B - Tecnica delle membrane filtranti (MF)**

La metodica delle membrane filtranti si adatta a tutti i tipi di acqua, tranne che a quelle particolarmente torbide. È evidente che, nel caso in cui si analizzano acque di elevata qualità, è necessario effettuare la ricerca degli indicatori microbici o, ancor più, dei patogeni in grandi volumi d'acqua (da 1 L a 10-100 L, rispettivamente). A questa evenienza si può far fronte con l'uso di questa tecnica che consente anche di ottenere risultati in tempi più brevi rispetto a quelli richiesti con il metodo MPN.

La procedura della filtrazione su membrana permette di contare i microrganismi che, presenti in un campione d'acqua, sulla superficie della membrana posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie. Poiché non è possibile determinare se una colonia individuale sia formata da 1, 2, 3 o più cellule batteriche, il numero di colonie ottenuto si riporta come "unità formanti colonia" (UFC).

Tuttavia si assume generalmente che una cellula batterica produca un colonia e che la conta si riferisca direttamente al numero dei batteri. L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, infatti, che il numero delle colonie sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie della membrana compreso generalmente tra 20 e 80 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato. Entro questo ambito, più alto è il numero delle colonie, più alta è la precisione. Il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato si ottiene dalla equazione seguente:

$$\text{UFC}/100 \text{ mL} = \frac{\text{N delle colonie} \cdot 100}{\text{mL di campione filtrato}}$$

Se l'esame è svolto in doppio, in triplo, ecc. il risultato si ottiene calcolando la media aritmetica del numero di colonie contate su ciascuna membrana e riportando il valore numerico ottenuto al volume di 100 mL. Nel calcolo del numero di microrganismi deve essere considerata l'eventuale diluizione effettuata.

#### **PROCEDURA**

Con una pinzetta sterile prendere, in condizioni di asepsi, una membrana filtrante e, con il lato quadrato verso l'alto, centrarla sulla base di un supporto filtrante. Fissare con l'idonea pinza il bicchiere (di vetro Pirex, di acciaio inossidabile o di polycarbonato) al supporto. Dopo avere adeguatamente agitato il campione di acqua o l'eventuale sua diluizione, prelevare, con una pipetta o un cilindro sterili, il volume di acqua da analizzare.

Filtrare attraverso la membrana utilizzando una pompa da vuoto o una pompa ad acqua. Sciacquare i bordi del bicchiere versando acqua distillata sterile o soluzione diluente. Dopo la filtrazione trasferire la membrana attraverso cui è stata filtrata l'acqua, su idoneo terreno di coltura agarizzato in piastra Petri, con il lato quadrato verso l'alto.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- CLARK, H.F., E.E. GELDREICH, H.L. JETER AND P.W. KABLER. (1951): "The Membrane filter in sanitary bacteriology", *Pub. Health Rep.* 66:951.
- DALLA VALLE, J.M.(1941): "Notes on the most probable number index as used in bacteriology", *Pub. Health Rep.* 56:299
- DPR 24 MAGGIO 1988 n. 236. "Attuazione della direttiva CEE 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'articolo 15 della legge 6 aprile 1987 n. 183." *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 30 giugno 1988 n. 60.
- DPR 3 LUGLIO 1982 n. 515. "Attuazione della direttiva CEE n. 75/440 concernente la qualità delle acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile". *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 7 agosto 1982 n. 216.
- DPR 8 GIUGNO 1982 n. 470. "Attuazione della direttiva CEE n. 160/76 relativa alle acque di balneazione". *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 26 luglio 1982 n. 203.
- DUTKA, B.D. ed. (1981): "Membrane filtration applications. Techniques and problems". Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- HALVORSON, H.O. AND ZIEGLER N.R. (1933): "Application of statistics to problems in bacteriology." *J. Bacteriol.* 25:101.
- LEGGE 10 MAGGIO 1976 n. 319. "Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento." *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 29 maggio 1976 n. 141.

## 7000 - PARAMETRI MICROBIOLOGICI

Dalla difficoltà di utilizzare di routine tecniche finalizzate alla ricerca di tutti i possibili microrganismi patogeni, è sorta la necessità di ricercare, per la definizione della qualità di un'acqua, microrganismi indicatori di contaminazione, la cui presenza può essere indice della presenza di patogeni. I microrganismi considerati indicatori di inquinamento fecale che vengono ricercati comunemente per la definizione della qualità di acque di diversa tipologia e a diversa destinazione d'uso (acque reflue, superficiali, marine, potabili) sono:

- Coliformi Totali;
- Coliformi Fecali (di cui fa parte *Escherichia coli*);
- Streptococchi Fecali.

Inoltre, l'analisi delle acque destinate al consumo umano comprende anche il conteggio delle colonie su agar (conta batterica) e, tra i parametri accessori, la conta delle spore di Clostridi solfito riduttori e la ricerca dei batteriofagi anti-*Escherichia coli*.

Tenuto conto di quanto sopra detto la successiva descrizione dei metodi per ciascun parametro non verrà riportata in ordine alfabetico, bensì nell'ordine sopra riferito.

Per quanto riguarda le strutture di laboratorio, le tecniche di campionamento e quelle di analisi più generali, nonché la valutazione dei dati, si fa riferimento al capitolo 6000.

Nell'ambito di ciascun metodo è indicata la composizione dei terreni colturali in lingua inglese, in quanto la gran parte dei substrati distribuiti in commercio riportano solo questa lingua.

## 7010 - COLIFORMI TOTALI

Si tratta di un gruppo di microrganismi a forma di bastoncello, gram-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni che fermentano il lattosio con produzione di gas e acido, alla temperatura di 35 °C in 48 ore.

I coliformi totali sono presenti nel materiale fecale di origine umana ad una concentrazione media di 10<sup>9</sup> UFC/g e appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Sono però anche largamente presenti nel suolo, sulle piante, nell'aria e nell'ambiente acquatico. Pertanto se la loro presenza nel caso di acque potabili è indice di contaminazione, non riveste invece un particolare significato nel caso delle acque superficiali.

Le più recenti normative in materia tendono a non considerare questo parametro fra quelli da ricercare obbligatoriamente nelle acque di superficie e negli effluenti. Tuttavia considerando che la ricerca dei coliformi totali è richiesta dalla Legge 319/76 e dal DPR 470/82 così come dal DPR 236/88, saranno ugualmente indicate le metodiche per la loro ricerca.

Di seguito vengono descritti i metodi per il loro rilevamento e, in aggiunta, viene riportata la descrizione di alcune prove biochimiche di base, utili per l'accertamento e la verifica delle colonie isolate.

### METODO A - Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi in campione di acqua tramite la formula probabilistica (6040 - Metodo A) che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

Di seguito viene riportata la descrizione del metodo che può comunque essere utilizzato con due terreni di coltura diversi. Il primo è il metodo "tradizionale", basato sulla fermentazione del lattosio (metodo al verde brillante), il secondo (metodo con il

substrato cromogeno) si basa sullo sfruttamento di attività enzimatiche specifiche.

### SCELTA DELLE DILUIZIONI MULTIPLE

L'analisi di acque potabili con la tecnica MPN consiste nell'inoculo di terreno per la prova presuntiva (Brodo al Lauril Triptosio o Brodo Lattosato) con volumi di 10 o 100 mL di campione.

Nel caso di acque superficiali è necessario utilizzare un minimo di 3 diluizioni decimali al fine di ottenere risultati quantitativi significativi. In assenza di dati pregressi della densità microbica del campione, sono necessarie 5 diluizioni decimali per avere la certezza di ottenere una serie di tubi positivi e negativi.

I risultati di un'analisi in cui tutte le diluizioni sono positive indicano solo che la densità dei coliformi è maggiore del limite superiore delle diluizioni effettuate e pertanto non hanno valore nella analisi statistica. In Tab. 1 sono indicate le diluizioni iniziali per alcune tipologie di acque.

La descrizione della preparazione delle diluizioni è riportata in Fig. 1 in 6040.

**Tab. 1** - Volumi proposti per l'analisi di acque di diversa qualità con il metodo MPN per il rilevamento quantitativo dei coliformi

Tipo di Acqua	Volumi (mL) per la prova MPN				
	10	1	0,1	0,01	0,001
Sorgente	x				
Lago	x.....x				
Torrente		x.....x			
Fiume		x.....x			
Refluo					
clorata		x.....x			
tratt. second.		x.....x			
tratt. prim.				x.....x	
grezza					x.....x



## A 1 - Metodo al verde brillante

### I - PROVA PRESUNTIVA

Disporre in una rastrelliera i tubi contenenti la campanella di Durham e il terreno colturale idoneo alla ricerca dei coliformi con la prova presuntiva (Brodo al Lauril Triptosio o Brodo Lattosato) e contrassegnarli indicando il numero del campione e l'aliquota inocolata. Il numero di file per ogni serie di 3 o 5 diluizioni e i volumi selezionati del campione da esaminare dipendono dalla qualità dell'acqua da esaminare (Tab. 1).

Prima di procedere all'inoculo di aliquote del campione nei tubi, agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Inoculare i volumi selezionati nelle diverse serie di diluizioni prescelte utilizzando pipette graduate. Per volumi di campioni inferiori a 0,1 mL è preferibile inoculare il volume necessario partendo da una diluizione decimale del campione originale secondo quanto indicato nella Fig. 1 (6040 - Metodo A).

Procedere all'inoculo dei tubi contenenti Brodo Lattosato o Brodo al Lauril Triptosio secondo quanto descritto in precedenza. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 min. Incubare a  $35 \pm 0,5$  °C. Dopo  $24 \pm 2$  ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore.

Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas. La produzione di gas entro le  $48 \pm 3$  ore costituisce una reazione positiva presuntiva. I tubi risultati positivi vengono sottoposti alla prova di conferma.

#### Brodo al Lauril Triptosio (Lauryl Tryptose Broth)

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptose	20 g
Lactose	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	2.75 g
Potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ )	2.75 g
Sodium chloride	5 g
Sodium lauryl sulfate	0.1 g

pH 6.8 dopo sterilizzazione (121°C per 15 min.).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il terreno si usa per la prova presuntiva del metodo MPN. Prima della sterilizzazione distribuire il terreno nei tubi (10 mL/tubo) contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Preparare il terreno a concentrazione tale (concentrazione normale o doppia concentrazione) che inoculi superiori a 10 mL non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard, come esposto secondo lo schema riportato in Tab. 2.

Tab. 2 - Preparazione del Brodo al Lauril Triptosio

Inoculo (mL)	Vol. di terreno nel tubo (mL)	Vol. di terreno + inoculo (mL)	Brodo al Lauril Triptosio pesato (g/L)
1	10 o più	11 o più	35,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
100	50	150	106,8

Incubare i tubi inoculati a  $35 \pm 0,5$  °C.

Dopo  $24 \pm 2$  ore agitare leggermente ciascun tubo e verificare la presenza di gas. In assenza di gas incubare di nuovo per altre  $24 \pm 2$  ore. La produzione di gas costituisce una reazione positiva presuntiva. I tubi risultati positivi sono sottoposti alla prova di conferma.

#### Brodo Lattosato (Lactose Broth)

Composizione per 1 L di terreno:

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Lactose	5 g

pH 6.9 dopo sterilizzazione (121 °C per 12 min.).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il terreno si usa per la prova presuntiva del metodo MPN. Prima della sterilizzazione distribuire il terreno (10 mL/tubo) nei tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Preparare il terreno a concentrazione tale che inoculi superiori a 10 mL non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard, secondo lo schema riportato in Tab. 3.

Tab. 3 - Preparazione del Brodo Lattosato

Inoculo (mL)	Volume di terreno nel tubo (mL)	Volume di terreno + inoculo (mL)	Brodo al Lattosio pesato (g/L)
1	10 o più	11 o più	13
10	10	20	26
10	20	30	19,5
100	50	150	39

Incubare i tubi inoculati a  $35 \pm 0,5$  °C.

Dopo  $24 \pm 2$  ore agitare leggermente ciascun tubo e verificare la presenza di gas. In assenza di gas incubare di nuovo per altre  $24 \pm 2$  ore. La produzione di gas costituisce una reazione positiva presuntiva. I tubi risultati positivi sono sottoposti alla prova di conferma.

## 2 - Prova di conferma

Sottoporre tutti i tubi di Brodo Lattosato o di Brodo al Lauril Triptosio in cui è stata osservata la presenza di gas entro le  $48 \pm 3$  ore alla prova di conferma. Prima dell'inoculo agitare leggermente i tubi positivi.

Procedere all'inoculo in tubi di Brodo Lattosato Bile Verde Brillante per l'evidenziazione di coliformi totali. Trasferire un'ansata o 0,1 mL di brodocoltura con una pipetta sterile graduata da un tubo positivo ad un corrispondente tubo contenente il terreno per la prova di conferma. Incubare a  $35 \pm 0,5$  °C per  $48 \pm 3$  ore i tubi di Brodo Lattosato Bile Verde Brillante per evidenziare la presenza di coliformi totali. La formazione di gas nelle campanelle entro le  $48 \pm 3$  ore costituisce una reazione positiva per i coliformi totali. Calcolare l'indice MPN in base al numero di tubi positivi di Brodo Lattosato Bile Verde Brillante secondo la Tab. 1 (6040 - Metodo A).

### Brodo Lattosato Bile Verde Brillante (Brilliant Green Lactose Bile Broth)

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Oxgall	20 g
Brilliant green	13,3 g
pH 7.2 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il terreno si usa per la prova di conferma del metodo MPN. Prima della sterilizzazione distribuire il terreno nei tubi (10 mL/tubo) contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Incubare i tubi inoculati, secondo la procedura esposta, a  $35 \pm 0,5$  °C per  $48 \pm 3$  ore per il rilevamento dei coliformi totali.

La produzione di gas nelle campanelle entro le  $48 \pm 3$  ore costituisce una reazione positiva. Calcolare il valore dell'indice MPN dal numero di tubi risultati positivi come descritto in 6040 - Metodo A in base alla Tab. 1.

## A 2 - Metodo con il substrato al cromogeno

Il substrato permette il rilevamento in 24 ore dei coliformi totali ma anche, e contemporaneamente, di *Escherichia coli* con il metodo dei tubi multipli (MPN) senza necessità di effettuare prove di conferma. Disporre i tubi contenenti il substrato in polvere in base alle serie di diluizioni selezionate per effettuare l'analisi con il metodo MPN. Aggiungere sterilmente a ciascun tubo 10 mL del campione o di una sua diluizione secondo la metodica dell'MPN. Tuttavia, è da sottolineare che anche nel caso in cui si usi una diluizione il volume totale da inoculare deve risultare uguale a 10 mL. Tappare e mescolare vigorosamente fino a dissoluzione del substrato. La miscela rimane incolore. Incubare per 24 ore a  $35 \pm 0,5$  °C.

Dopo incubazione esaminare i tubi confrontandoli con il controllo già fornito dalla ditta produttrice. I tubi che presentano colorazione gialla e fluorescenza, alla lampada di Wood, risultano positivi per la presenza di coliformi totali ed *Escherichia coli*, rispettivamente. L'intensità del colore deve essere maggiore o uguale a quella del tubo comparatore; se il colore è meno intenso o assente la prova è negativa. Procedere al calcolo del valore dell'indice MPN in base alla Tab. 1 (6040 - Metodo A).

### Substrato al cromogeno

Composizione per 1 L di terreno:

Ammonium sulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	20 g
Manganese sulfate (MnSO <sub>4</sub> )	0.5 g

Zinc sulfate (ZnSO <sub>4</sub> )	0.5 mg
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> )	0.1 g
Sodium chloride (NaCl)	10 g
Calcium chloride (CaCl <sub>2</sub> )	0.05 g
Sodium sulfite (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	0.04 g
Amphotericin B	1 mg
O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	0.5 g
4-methylumbelliferil 1-β-D-glucuronide	75 mg
Solanium	0.5 g
Hepes buffer	
Sodium salt	5.3 g
Organic acid	6.9 g

Il terreno in questa composizione viene distribuito in commercio in tubi già predisposti con il substrato prepesato in quantità idonee per l'esame di 10 mL di campione o di una sua diluizione. L'uso di questo substrato è particolarmente raccomandato per il rilevamento di coliformi totali e *Escherichia coli* in acque potabili e comunque per campioni di acque poco contaminate. L'analisi si basa sulla capacità dei coliformi di produrre l'enzima β-galattosidasi che idrolizza e rompe lo specifico substrato o-nitrofenil-β-D-galattopiranoside (ONPG) rilasciando o-nitrofenile che produce colore giallo nella brodocoltura. In aggiunta, l'enzima β-glucuronidasi, prodotto da *Escherichia coli*, produce una sostanza fluorescente quando idrolizza il 4-metilumbelliferil β-D-glucuronide (MUG), evidenziabile con la lampada di Wood.

## METODO B -

### Tecnica delle membrane filtranti (MF)

Il metodo delle membrane filtranti permette di effettuare un conteggio quantitativo diretto dei microrganismi ricercati. La procedura di analisi è stata indicata in 6040 - Metodo B. Questa tecnica permette di esaminare volumi di acqua normalmente superiori rispetto a quelli analizzabili con la tecnica dei tubi multipli (MPN) e le aliquote da filtrare sono scelte in funzione della qualità del campione da analizzare. In Tab. 4 sono proposti alcuni volumi indicativi per l'analisi dei coliformi con il metodo delle membrane filtranti per acque di diversa tipologia. Per lo svolgimento del metodo delle membrane filtranti si fa riferimento a quanto descritto in 6040 - Metodo B. Di seguito viene riportata la descrizione del metodo che può comunque essere utilizzato con due terreni coltu-

rali diversi. Il primo è il metodo "tradizionale" basato sulla fermentazione del lattosio e sull'attività del deossicolato e del laurilsolfato (metodo al laurilsolfato), il secondo (metodo con il substrato cromogeno agarizzato) si basa sullo sfruttamento di attività enzimatiche specifiche.

### B1 - Metodo al laurilsolfato

#### m-Endo Agar Les

Composizione per 1 L di terreno:

Yeast extract	1.2 g
Casitone o trypticase	3.7 g
Thiopeptone o thiotone	3.7 g
Tryptose	7.5 g
Lactose	9.4 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	3.3 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.0 g
Sodium chloride (NaCl)	3.7 g
Sodium desoxycholate	0.1 g
Sodium lauryl sulfate	0.05 g
Sodium sulfite (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	1.6 g
Basic fuchsin	0.8 g
Agar	15 g

pH 7.2 dopo dissoluzione degli ingredienti (non si sterilizza).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si reidrata la polvere in 1 L di acqua distillata contenente 20 mL di etanolo al 95%. Si distribuisce in capsule Petri, non si sterilizza, non si deve esporre alla luce. Si conserva in frigorifero per 2 settimane. Il terreno si usa per l'enumerazione dei coliformi totali con il metodo delle membrane filtranti. Dopo la filtrazione del campione la membrana viene

Tab. 4 - Volumi di campioni indicativi per l'analisi dei coliformi per vari tipi di acque

Tipo di Acqua	Volume da filtrare (mL)							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Acqua potabile	x							
Pozzi, sorgenti	x	x	x					
Laghi		x	x					
Fiumi				x	x	x	x	
Scarichi clorati				x	x	x		
Scarichi grezzi						x	x	x

posta su piastre Petri contenenti il terreno solidificato, si procede all'incubazione in termostato a  $35 \pm 0,5$  °C per 18-24 ore.

Sono generalmente considerate coliformi totali le colonie cresciute entro le 24 ore di colore dal rosso al rosso scuro con riflesso metallico verde-dorato che può interessare l'intera colonia o essere limitato alla zona centrale (colonie tipiche).

Può verificarsi l'eventualità che colonie tipiche non siano formate da microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi, così come colonie atipiche (rosa, rosse senza riflesso metallico) possano essere formate da batteri coliformi. È consigliabile pertanto sottoporre a verifica le colonie isolate tramite le seguenti prove di conferma:

- fermentazione del lattosio (positiva, con produzione di gas e acido);
- prova della citocromossidasi (CO) (negativa);
- prova della  $\beta$ -D-galattosidasi (ONPG) (positiva).

Prima di effettuare ciascuna prova è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare ciascuna colonia su idoneo terreno di crescita ed eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo. Il terreno colturale da utilizzare è quello la cui formulazione è riportata in seguito (Tryptic Soy Agar).

### 1 - Fermentazione del lattosio

Inoculare la colonia pura da saggiare in un tubo di Brodo Lattosato Bile Verde Brillante e incubare a 36 °C per 24-48 ore. I batteri appartenenti al gruppo dei coliformi fermentano il lattosio con produzione di gas che si evidenzia nella campanella di Durham.

### 2 - Prova della citocromossidasi

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

#### Tryptic Soy agar (TSA)

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptone 15 g

Soytone 5 g  
Sodium chloride (NaCl) 5 g  
Agar 20 g

pH 7.3 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.)

#### Reattivo alla tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Tetrametil - parafenilendiamina dicloridrato 1 g  
Acqua distillata 100 mL

Effettuare uno striscio della colonia da saggiare sulla superficie del terreno Tryptic Soy Agar in piastra. Incubare a 37 °C per 24 ore. Preparare la soluzione del reattivo al momento dell'uso e imbibire con alcune gocce di soluzione una carta da filtro. Prelevare con un'ansa di platino o di plastica una colonia dalla superficie del terreno e strisciarla sulla carta da filtro. La reazione positiva si evidenzia quando si sviluppa, entro 10 secondi, una colorazione viola; la reazione negativa è data dalla mancanza di sviluppo del colore.

### 3 - Prova della D-galattosidasi (ONPG)

Preparare una soluzione di monosodio fosfato 1 M: sciogliere 6,9 g di monosodio fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) in 45 mL di acqua distillata e aggiungere 3 mL di sodio idrossido (NaOH) al 30% aggiustando la soluzione a pH 7. Portare il volume a 50 mL e conservare a + 4 °C. Preparare una soluzione di o-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside (ONPG) sciogliendone 80 mg in 15 mL di acqua a 37 °C e aggiungendo 5 mL della soluzione di monosodio fosfato 1 M (la soluzione deve essere incolore). Conservare a + 4 °C.

Saggiare la colonia da verificare aggiungendo 1 goccia di toluene e lasciando per 5 minuti a 35 °C in bagnomaria. Aggiungere 0,25 mL della soluzione ONPG e incubare di nuovo a 35 °C in bagnomaria. Leggere la reazione dopo 30 e 60 minuti e dopo 24 ore. Un risultato positivo è evidenziato dallo sviluppo di un colore giallo. I batteri appartenenti al gruppo dei coliformi danno una reazione positiva.

### B 2 - Metodo con il substrato cromogeno agarizzato

Il substrato permette il rilevamento in 18-20 ore dei coliformi totali, ma anche *Escherichia coli* (7030) con il metodo della filtrazione su membrana. Infatti



contiene, per l'evidenziazione dei coliformi totali, il composto attivo 5-Br-4Cl-3indolil-D-galattopiranoside (X-GAL) idrolizzato dall'enzima  $\beta$ -galattosidasi prodotto dai coliformi, e il 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) che viene idrolizzato dall'enzima  $\beta$ -glucuronidasi prodotto da *E. coli*. Per lo svolgimento del metodo delle membrane filtranti si fa riferimento a quanto descritto nel capitolo 6040-metodo B.

### C-EC-MF

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptose	10 g
Tryptophan	1 g
Peptocomplex	5 g
Yeast extract	3 g
Sodium chloride	5 g
Bile salt n. 3	1.50 g
IPTG	0.10 g
X-GAL	0.08 g
MUG	0.05 g
Agar Bios LL	13 g

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

Dopo la filtrazione, per la ricerca dei Coliformi totali si procede all'incubazione in termostato a  $35 \pm 0,5$  °C per 18-20 ore. Sono considerate di coliformi totali le colonie di colore verde-blu.

Per l'evidenziazione di *E. coli* si procede all'incubazione in termostato a  $44 \pm 0,5$  °C per 18-20 ore. *Escherichia coli* sviluppa colonie di colore verde-blu che appaiono fluorescenti alla lampada di Wood.

### BIBLIOGRAFIA

- A.P.H.A. (1966) "Recommended methods for the microbiological examination of foods", 2nd ed. Scharf J.M. (ed.). New York.
- A.P.H.A., AWWA, WEF. (1992) "Standard methods for the examination of water and wastewater", 18th ed. Washington, APHA.
- BONADONNA, L. & VILLA, L. (1993): "Un substrato cromogeno per l'isolamento dei Coliformi totali nelle acque: il C-EC-MF. *Notiziario metodi analitici per le acque*, IRSA, 13, 3.
- EDBERG, S.C. & EDBERG, M.M. (1988): "A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution", *Yale J. Biol. Med.* 61, 389.
- FIFIELD, C.W. & SHAUFIUS, C.P (1958): "Improved membrane filter medium for the detection of coliform organisms," *J. Am. Water Works Ass.* 50, 193.
- WILLIAMS ed. (1984). "Official methods of analysis of the AOAC", 14 ed. AOAC, Arlington, Va.

## 7020 - COLIFORMI FECALI

Si tratta di un gruppo di microrganismi a forma di bastoncello (sottogruppo dei coliformi totali), gram-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni che fermentano il lattosio con produzione di gas alla temperatura di 44.5 °C in 24 ore.

I coliformi fecali costituiscono quella frazione di coliformi totali, evidenziabili con le tecniche che saranno di seguito indicate, che costituisce un indubbio indice di contaminazione fecale dell'acqua esaminata. Essi sono presenti nel materiale fecale ad una concentrazione media di  $10^7$  UFC/g.

### METODO A - Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi in campioni di acque tramite la formula probabilistica (6040-Metodo A) che definisce il numero più probabile di batteri coliformi in grado di produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

#### 1 - Prova presuntiva

#### 2 - Prova di conferma

Sottoporre tutti i tubi di Brodo lattosato o di Brodo al lauril triptosio in cui è stata osservata la presenza di gas entro le  $48 \pm 3$  ore alla prova di conferma. Prima dell'inoculo agitare leggermente i tubi positivi. Procedere all'inoculo in tubi di terreno EC o Brodo Lattosato Bile Verde Brillante (7010 A1) per l'evidenziazione dei coliformi fecali.

Trasferire un'ansata o 0,1 mL di brodocoltura con una pipetta sterile graduata da un tubo positivo ad un corrispondente tubo contenente il terreno per la prova di conferma. Incubare in bagnomaria a  $44,5 \pm 0,2$  °C per  $24 \pm 2$  ore i tubi inoculati per evidenziare la presenza di coliformi fecali. La formazione di gas nelle campanelle entro le  $24 \pm 2$  ore costituisce una reazione positiva per i coliformi fecali. Calcolare il valore dell'indice MPN in base al numero di tubi positivi

secondo la Tab. 1 (6040- Metodo A).

### Terreno EC (EC medium)

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptose o trypticase	20 g
Lactose	5 g
Bile salts n. 3	1.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	4 g
Potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ )	1.5 g
Sodium chloride (NaCl)	5 g

pH 6.9 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.)

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il terreno si usa per la prova di conferma del metodo MPN. Prima della sterilizzazione distribuire il terreno nei tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Incubare i tubi inoculati, secondo la procedura esposta in 6040- Metodo A a  $44,5 \pm 0,2$  °C per  $24 \pm 2$  ore per il rilevamento dei coliformi fecali. La produzione di gas nelle campanelle entro  $24 \pm 2$  ore costituisce una reazione positiva. Calcolare il valore MPN dal numero di tubi risultati positivi come descritto in 6040 in base alla Tab. 1.

### METODO B - Tecnica delle membrane filtranti

Per lo svolgimento del metodo delle membrane filtranti si fa riferimento a quanto descritto in 6040 - Metodo B.

### mFC Agar

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptose	10 g
Protease peptone n. 3 o polypeptone	5 g
Yeast extract	3 g
Sodium chloride (NaCl)	5 g
Lactose	12.5 g
Bile salts	1.5 g
Aniline blue	0.1 g

Agar

15 g

pH 7.4 dopo dissoluzione degli ingredienti (non si sterilizza).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si reidrata in acqua distillata contenente 10 mL di acido rosolico all'1% in NaOH 0,2N. Non si sterilizza. Il terreno distribuito in capsule Petri si conserva in frigorifero per 2 settimane. Il terreno si usa per l'enumerazione dei coliformi fecali. Dopo la filtrazione del campione su membrana posta su piastre Petri contenenti il terreno si procede all'incubazione in termostato a  $44,5 \pm 0,2$  °C per  $24 \pm 2$  ore.

Le colonie di coliformi fecali che crescono su mFC agar sono blu, ma possono presentare diverse sfumature di colore. Alcuni *Escherichia coli* possono formare colonie atipiche di colore giallo chiaro. Colonie di colore grigio-crema sono formate dai coliformi non fecali. Per ottenere risultati più attendibili considerare le membrane che presentano un numero di colonie variabile da 20 a 60.

## BIBLIOGRAFIA

- GELDREICH, E.E., CLARK, H.F., HUFF C. B. AND BEST L. C. (1965) "Fecal-coliform organism medium for the membrane filter technique". *J. Am. Water Work Ass.* 57, 208.
- PERRY, C.A. AND HAJANA. A.A. (1933): "A modified Eijkman medium". *J. Bacteriol.* 26, 419.

## 7030 - *ESCHERICHIA COLI*

Mentre le denominazioni "coliformi totali" e "coliformi fecali" fanno riferimento a gruppi batterici eterogenei, il termine *Escherichia coli* corrisponde ad una specie tassonomicamente definita, a sua volta compresa nel più ampio gruppo dei coliformi. *E. coli* è un microrganismo a forma di bastoncino gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno che fermenta il lattosio con produzione di gas alla temperatura di 44,5 °C (analogamente al gruppo dei coliformi fecali del quale fa parte), produce indolo in terreni contenenti triptofano, presenta la reazione del Rosso-metile positiva, negativa la reazione di Voges-Proskauer e idrolizza il 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG).

La precisa identificazione di *E. coli* richiede una serie di prove che non vengono usualmente impiegate nel campo dell'analisi microbiologica delle acque. Pertanto la sua ricerca viene effettuata con gli usuali metodi analitici, consente una diagnosi presuntiva, però largamente sufficiente, unitamente alle altre indagini, per dare un quadro della qualità dell'acqua esaminata.

*E. coli* può essere messo in evidenza sia con il metodo dei tubi multipli (7010 A1), sia con il metodo delle membrane filtranti dove è rilevabile sul terreno agarizzato (7020-Metodo B). Inoltre può essere evidenziato con il substrato indicato in 7010-B2.

Per verificare il suo isolamento è necessario procedere ad una serie di prove successive di seguito indicate e la sua identificazione si effettua con sistemi miniaturizzati di prove biochimiche.

### Produzione di indolo

Dai tubi di Brodo Lattosato (7010-A1) risultati positivi si procede all'inoculo di circa 0,1 mL di brodocoltura in tubi contenenti circa 5 mL di Brodo Triptofano. Si incuba a 44,5  $\pm$  0,5 °C per 24  $\pm$  2 ore.

Dopo incubazione aggiungere 0,2-0,3 mL del reagente alla p-dimetilaminobenzaldeide. Dopo 10 min. osservare la reazione: lo sviluppo di un colore rosso

scuro sulla superficie della brodocoltura nello strato superficiale alcoolico costituisce una reazione positiva per la produzione di indolo; una colorazione gialla indica reazione negativa. In relazione alla produzione di indolo a partire dal Triptofano, gli organismi del gruppo dei coliformi si pongono come segue:

<i>Escherichia coli</i>	+ (una limitata percentuale -)
<i>Citrobacter freundii</i>	-
<i>Klebsiella/Enterobacter</i>	+ o -

### Brodo Triptofano (Tryptophane Broth)

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptone o Trypticase	10 g
Prima della sterilizzazione (121 °C per 15 min.) distribuire il terreno in tubi (5 mL/tubo).	

### Reattivo alla p-dimetilaminobenzaldeide

p-dimethyl-aminobenzaldehyde	5 g
isoamyl alcohol	75 mL
HCl al 90%	25 mL

Il reagente, una volta preparato, deve essere di colore giallo.

### Prova di Voges Proskauer (VP)

Il test si basa sulla produzione di acetoina da parte di alcuni coliformi come derivato del metabolismo del glucosio. È usato per distinguere *Escherichia coli* dal gruppo *Klebsiella/Enterobacter*.

Nei tubi contenenti il terreno di Voges Proskauer (5 mL/tubo) viene inoculato il microrganismo da saggiare. Incubare per 48 ore a 35  $\pm$  0,5 °C. Dopo incubazione, 1 mL della brodocoltura si trasferisce in una provetta a cui vengono aggiunti 0,6 mL di soluzione di  $\alpha$ -naftolo e 0,2 mL di soluzione di idrossido di potassio. Lo sviluppo di una colorazione rosa entro 5' costituisce una reazione positiva. I risultati ottenuti dopo più di 5' non sono affidabili.

**Terreno di Voges Proskauer/Rosso metile**

Composizione per 1 L di terreno:

Polypeptone o proteoseptone	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5 g
Glucose	5 g

pH 6.9 dopo sterilizzazione.

Sciogliere gli ingredienti in 1 litro di acqua distillata e distribuire in tubi (5 mL/tubo). Sterilizzare a 121 °C per 12 minuti.

**Reattivo all'α-naftolo**

α-naftolo	5 g
Ethyl alcohol	100 mL

Sciogliere l'α-naftolo nell'alcool etilico. La soluzione si conserva in frigorifero per 2 settimane.

**Reattivo all'idrossido di potassio**

La soluzione di idrossido di potassio si prepara sciogliendo 40 g di idrossido di potassio (KOH) in 100 mL di acqua distillata.

**Prova del Rosso Metile**

Il test si basa sull'uso di un indicatore di pH, il rosso metile, per determinare la presenza di ioni idrogeno, cioè per verificare la produzione stabile di acido da parte di alcuni coliformi nella fermentazione del glucosio. Tutti i membri delle Enterobatteriacee sono per definizione glucosio fermentanti, pertanto, dopo 18-14 ore di incubazione, tutti i microrganismi compresi in questo gruppo danno una reazione positiva. Tuttavia per ottenere i risultati della prova del rosso metile è richiesto un periodo di incubazione più lungo (2-5 giorni).

Alcuni organismi, positivi per il test del rosso metile, continuano a produrre acido con conseguente abbassamento del pH del mezzo (circa 4,2). I microrganismi che risultano negativi alla prova continuano a metabolizzare i prodotti iniziali della fermentazione (es. acidi organici) con formazione di carbonati e CO<sub>2</sub> innalzando così il pH a valori intorno alla neutralità. Il terreno è lo stesso utilizzato per la prova di Voges Proskauer.

Inoculare nel terreno, distribuito in ragione di 10

mL/tubo, una coltura pura del microrganismo da saggiare. Incubare a 35 °C per 5 giorni. Dopo incubazione in ogni tubo contenente la brodocoltura si aggiungono 5 gocce della soluzione al rosso metile. Per alcuni microrganismi il periodo di incubazione può essere ridotto a 2 giorni, tuttavia la reazione deve essere necessariamente ben distinguibile.

Una colorazione rossa definita indica reazione positiva al rosso metile, mentre una colorazione gialla è indice di reazione negativa. In Tab. 1 sono riassunte le prove sopra descritte per alcuni membri dei coliformi.

Il terreno è lo stesso utilizzato per la prova di Voges Proskauer.

**Soluzione idroalcolica al rosso metile**

Methyl red	0,1 g
Ethyl alcohol	300 mL

Sciogliere il rosso metile nell'alcool etilico e portare a 500 mL con acqua distillata.

Tab. 1 - Prove per caratterizzare i coliformi

Microrganismo	INDOLO	VOGES PROSKAUER	ROSSO METILE
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
<i>Klebsiella/Enterobacter</i>	-	+	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	+

**BIBLIOGRAFIA**

FINEGOLD J.R. & BARON, E.E. (1986): "Bailey and Scott's diagnostic microbiology", 7th ed., The C.V. Mosby Co.; St. Louis.



## 7040 - STREPTOCOCCHI FECALI

Gli streptococchi fecali costituiscono, analogamente ai coliformi totali ed ai coliformi fecali, un gruppo di microrganismi eterogeneo. Sono cocchi gram-positivi, con tendenza a disporsi a catena in terreni liquidi, aerobi ed anaerobi facoltativi, catalasi negativi. Appartengono al genere "*Streptococcus*", gruppo sierologico D di Lancefield. Al gruppo degli Streptococchi fecali appartengono varie specie che si distinguono fra loro sulla base di caratteristiche biochimiche e colturali. L'identificazione delle singole specie non è ordinariamente richiesta nell'esame microbiologico delle acque.

Tradizionalmente considerati, come indicatori di contaminazione fecale recente delle acque distribuite per scopo potabile, sono attualmente considerati indicatori estremamente importanti nel caso delle acque marine e nel caso di acque sottoposte a trattamento disinfettante con cloro. In acqua di mare essi presentano infatti una capacità di sopravvivenza maggiore di quella degli altri indicatori. La loro resistenza all'azione disinfettante del cloro sembra si avvicini a quella degli enterovirus per cui la loro presenza sembra essere indice di possibile presenza di contaminanti virali.

### METODO A -Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità degli streptococchi fecali in campioni di acque tramite la formula probabilistica (6040-Metodo A) che definisce il numero di streptococchi fecali in grado di produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

La procedura di analisi è stata indicata in 6040-Metodo A. Il metodo dei tubi multipli è indicato particolarmente per l'analisi di acque grezze clorate e acque superficiali comunque torbide.

### 1 - PROVA PRESUNTIVA

#### Brodo all'Azide Destrosio (Azide Dextrose Broth)

Composizione per 1 L di terreno:

Beef Extract	4.5 g
Tryptone or polypeptone	15 g
Glucose	7.5 g
Sodium chloride (NaCl)	7.5 g
Sodium azide (NaN <sub>3</sub> )	0.2 g

pH 7.2 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il terreno si usa per la prova presuntiva del metodo MPN. Prima della sterilizzazione distribuire il terreno nei tubi (10 mL/tubo).

Preparare il terreno a concentrazione tale (concentrazione normale o doppia concentrazione) che inoculi superiori a 10 mL non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard. Alcune possibili combinazioni per quanto riguarda le aliquote di campione da inoculare o le quantità di terreno da utilizzare sono indicate in Tab. 1.

Tab. 1 - Preparazione del Brodo all'Azide Destrosio

Inoculo (mL)	Vol. di terreno nel tubo (mL)	Vol. di terreno + inoculo (mL)	Brodo Azide Destrosio pesato (g/L)
1	10	11	34,7
10	10	20	64,9
10	20	30	52,0
100	50	150	104,1

Incubare i tubi inoculati a  $35 \pm 0,5$  °C. Esaminare ciascun tubo per verificare la presenza di torbidità (risultato positivo) alla fine delle  $24 \pm 2$  ore. Eventualmente reincubare e leggere i risultati alla fine delle  $48 \pm 3$  ore. Annotare i risultati e sottoporre i tubi positivi alla prova di conferma.

## 2 - Prova di conferma

Sottoporre tutti i tubi di Brodo all'Azide Destrosio in cui è stata osservata torbidità entro le 48 ore di incubazione alla prova di conferma.

Procedere all'inoculo in tubi di Brodo all'Etil Violetto con Azide e Destrosio. Da ciascun tubo di brodo all'Azide Destrosio risultato positivo si trasferisce con una pipetta sterile 0,1 mL in Brodo all'Etil violetto con azide e destrosio. Incubare a  $35 \pm 0,5$  °C per  $48 \pm 3$  ore.

Si considerano positivi i tubi che presentano intorbidimento accompagnato da un deposito grigio-violetto sul fondo del tubo. Sulla base dei risultati ottenuti si consulta la Tab. 1 (6040-Metodo A) che riporta il valore come MPN/100 mL. Tenere in considerazione, nel calcolo dell'indice MPN, le eventuali diluizioni effettuate.

### Brodo all'Etil Violetto con Azide e Destrosio (Ethyl Violet Azide Dextrose Broth)

*Composizione per 1 L di terreno:*

Peptone (tryptone o trypticase)	20 g
Dextrose	5 g
Sodium chloride (NaCl)	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	2.7 g
Potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ )	2.7 g
Sodium azide ( $NaN_3$ )	0.4 g
Ethyl violet	0.83 g

pH 7 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Prima della sterilizzazione si distribuisce in tubi (10 mL/tubo). Si conserva in frigorifero per 2 settimane. Il terreno si usa per la prova di conferma per gli streptococchi fecali secondo la procedura sopra esposta.

### METODO B - Tecnica delle membrane filtranti

Il metodo delle membrane filtranti permette di effettuare un conteggio quantitativo diretto dei microrganismi ricercati. La procedura di analisi è indicata in 640-Metodo B. Questa tecnica permette di esaminare volumi di acqua normalmente superiori a quelli analiz-

zabili con la tecnica dei tubi multipli (MPN). Il rilevamento degli streptococchi fecali può essere effettuato con uno dei due terreni agarizzati riportati di seguito. Le aliquote da filtrare sono scelte in funzione della qualità del campione da analizzare.

### m-Enterococcus Agar (Slanetz-Bartley Agar)

*Composizione per 1 L di terreno:*

Tryptose	20 g
Yeast extract	5 g
Dextrose	2 g
Dipotassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ )	4 g
Sodium azide ( $NaN_3$ )	0.4 g
2,3,4 triphenyl tetrazolium chloride	0.1 g
Agar	10 g

pH 7 dopo dissoluzione degli ingredienti (non si sterilizza).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizza. Si distribuisce in capsule di Petri e, conservato in frigorifero, si mantiene per 1 settimana. Il terreno si usa per l'enumerazione degli streptococchi fecali.

Dopo la filtrazione del campione su membrana posta su piastre Petri contenenti il terreno solidificato, si procede all'incubazione in termostato a  $35 \pm 0,5$  °C per 48 ore.

Sono enumerate come streptococchi fecali le colonie rosso scuro e rosso chiaro.

### KF Streptococcal Agar

*Composizione per 1 L di terreno:*

Protease peptone	10 g
Yeast extract	10 g
Sodium chloride (NaCl)	5 g
Sodium glicerophosphate	10 g
Maltose	20 g
Lactose	1g
Sodium azide	0.4 g
Bromocresol purple	0.015 g
Agar	20 g

pH 7 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si distribuisce in capsule di Petri e si conserva, in frigorifero, per 1 settimana. Il terreno si

usa per l'enumerazione degli streptococchi fecali con il metodo delle membrane filtranti.

Dopo la filtrazione del campione su membrana posta su piastre Petri contenenti il terreno solidificato, si procede all'incubazione in termostato a  $35 \pm 0,5$  °C per 48 ore.

Sono enumerate come streptococchi fecali le colonie rosse.

Per un'ulteriore verifica delle colonie cresciute sulle membrane poste sia su m-Enterococcus Agar, sia su KF Streptococcal Agar si possono eseguire prove biochimiche, quali l'idrolisi dell'esculina e la prova della catalasi, di seguito indicate.

### 1 - Idrolisi dell'esculina

Le membrane su cui sono sviluppate le colonie di presunti streptococchi fecali si trasferiscono sul terreno all'esculina. Dopo incubazione a  $41 \pm 0,5$  °C per 20-40' si considerano streptococchi fecali quelli che hanno formato, sul terreno di isolamento, colonie in corrispondenza delle quali sul terreno all'esculina compare sul retro della membrana e sull'agar un alone nero-marrone.

#### Terreno all'Esculina (Esculin Iron Agar, EIA substrate)

Composizione per 1 L di terreno:

Esculin	1.0 g
Ferric citrate	0.5 g
Agar	15 g

pH 7.1 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si distribuisce in capsule Petri e si mantiene in frigorifero per 4 settimane.

### 2 - Prova della catalasi

Isolare la colonia da saggiare, cresciuta sul terreno di isolamento per gli streptococchi fecali, su terreno agarizzato all'infuso di cuore e cervello (Brain-Heart Infusion Agar).

Stemperare un'ansata di una colonia ben isolata cresciuta su Brain-Heart infusion Agar su un vetrino e

aggiungere qualche goccia di acqua ossigenata al 3%. L'assenza della formazione di bolle costituisce una prova positiva per la caratterizzazione degli streptococchi fecali che mancano di catalasi.

#### Agar all'infuso di cuore e cervello (Brain-Heart Infusion Agar)

Composizione per 1 L di terreno:

Brain Heart Infusion from solids	8 g
Peptic digest of animals tissue	5 g
Pancreatic digest of casein	16 g
Sodium chloride (NaCl)	5 g
Dextrose	2 g
Disodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ )	2.5 g
Agar	15 g

pH 7.4 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Incubare a  $35 \pm 0,5$  °C per 24-48 ore.

### BIBLIOGRAFIA

- DECRETO 12 AGOSTO 1985. "Ricerca degli streptococchi fecali in acque di balneazione con la tecnica delle membrane filtranti: prova finale alternativa". *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 3 settembre 1985, n. 207.
- LEVIN, M.A., FISHER J.R & CABELLI. V.J. (1975): "Membrane filter technique for enumeration of enterococci in marine water". *Appl. Microbiol.* **30**, 66.
- LITSKY, W., MALLMANN, W.L. & FIFIELD. C.W. (1953): "A new medium for the detection of enterococci in water". *Am. J. Publ. Health* **44**, 873.
- SLANETZ, L.W., & BARTLEY. C.H. (1957): "Numbers of enterococci in water sewage, feces determined by the membrane filter technique with an improved medium". *J. Bacteriol.* **74**, 591.

## 7050 - CONTA BATTERICA A 36° E A 22 °C

Il conteggio delle colonie, una volta ritenuto l'esame più importante nell'ambito della microbiologia delle acque, ha un significato indicativo e permette di evidenziare microrganismi eterotrofi aerobi ed anaerobi facoltativi presenti nelle acque.

La flora che si sviluppa a 22 °C veniva tradizionalmente considerata espressione della flora batterica autoctona dell'acqua. La flora che si sviluppa a 36 °C era invece considerata espressione della presenza di batteri ospiti degli animali a sangue caldo. Attualmente tale distinzione non viene più considerata valida in senso stretto. Inoltre, la conta batterica deve essere considerata un indice di qualità integrativo ad altri parametri analitici.

Si tratta di un'indagine da utilizzare quasi esclusivamente nell'analisi delle acque per il consumo umano in considerazione della sua utilità per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti disinfettanti. Di seguito è riportata la metodica per il rilevamento di questo indice di qualità.

### Tecnica della semina in agar-germi

Questo metodo permette di contare il numero di batteri eterotrofi, presenti in un campione di acqua, in grado di moltiplicarsi su un terreno agarizzato. Le modalità generali di esecuzione del metodo sono riportate in 6000. La metodica permette di esaminare volumi di campione non superiori a 2 mL.

Nel caso dell'esame delle acque destinate al consumo umano, l'indagine deve essere effettuata su un'aliquota di campione di almeno 1 mL. È necessario selezionare le eventuali diluizioni del campione da analizzare allo scopo di ottenere un numero massimo di colonie compreso tra 30 e 300. Preparare le diluizioni come riportato in Fig. 1 (6040-Metodo A). Con una pipetta sterile, rispettando le regole di asepsi, porre un'aliquota del campione, tal quale o diluito, in funzione della qualità dell'acqua, sul fondo di almeno due capsule Petri per ciascun volume di campione o diluizione esaminato. Effettuare, quindi una semina in doppio. Versare sul fondo di ciascuna capsula circa 15

mL di terreno colturale agarizzato, sciolto e mantenuto alla temperatura di 45 °C. Mescolare con leggeri movimenti rotatori per amalgamare il substrato e il campione e lasciare solidificare.

La procedura di analisi per l'enumerazione degli eterotrofi a 36 °C e a 22 °C è la stessa per entrambi i parametri. Dopo solidificazione del substrato, incubare in termostato le piastre a 36 °C per 48 ore e un uguale numero di piastre in termostato a 22 °C per 5 giorni.

Alla fine del periodo di incubazione contare tutte le colonie cresciute a 36° e a 22 °C e riportare il valore medio del numero ottenuto come Unità Formanti Colonia per 1 mL di campione (UFC/mL).

### Plate Count Agar (PCA)

*Composizione per 1 L di terreno:*

Tryptone	5 g
Yeast extract	2.5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g

pH 7 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il substrato, ricco in nutrienti, fornisce conte più basse del terreno R2A se utilizzato per l'analisi di acque oligotrofe. Può essere utilizzato per la conta degli eterotrofi nell'analisi di reflui non trattati.

### R2A Agar

*Composizione per 1 L di terreno:*

Yeast extract	0.5 g
Proteose peptone n. 3 o polypeptone	0.5 g
Casamino acids	0.5 g
Glucose	0.5 g
Soluble starch	0.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.3 g
Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.05 g
Magnesium pyruvate	0.3 g

Agar

15 g

pH 7.2 (sterilizzare a 121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il substrato, con basse concentrazioni di nutrienti, fornisce alte conte, ma in tempi più lunghi del terreno Plate Count Agar. È particolarmente adatto per l'analisi di acque oligotrofe, quali acque potabili e comunque acque che hanno subito un trattamento di sanitizzazione.

#### BIBLIOGRAFIA

- A.P.H.A. (1990): "Standard methods for the examination of dairy products". 11th ed. (APHA, Washington).
- REASONER, D.J. AND GELDREICH, E.E. (1985): "A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water". *Appl. Environ. Microbiol.* **49**,1.



## 7060 - SPORE DI CLOSTRIDI SOLFITO RIDUTTORI

I clostridi solfito-riduttori costituiscono un gruppo eterogeneo di microrganismi a forma di bastoncello, gram-positivi, anaerobi, al quale appartiene *Clostridium perfringens*, indicatore specifico di inquinamento fecale. Producono spore a lungo resistenti nell'ambiente.

Le spore di clostridi solfito-riduttori sono tradizionalmente considerate, per le acque potabili, indicatori di inquinamento pregresso. La loro ricerca non viene attualmente richiesta, in genere, dalle normative vigenti in materia tranne che nel caso delle acque destinate al consumo umano (DPR 236/88). Le metodiche relative alla loro ricerca sono di seguito indicate.

### METODO A - Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità di spore di clostridi solfito-riduttori in campioni di acqua tramite la formula probabilistica (6040- Metodo A) che definisce il numero più probabile di spore di clostridi in grado di produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

Il metodo può essere utilizzato per l'analisi di acque che presentano materiale in sospensione. Le modalità generali di esecuzioni del metodo sono riportate in 6040- Metodo A.

#### Trypticase Sulfite Neomycin Agar

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone o tryptone	15 g
Sodium sulfite ((Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ))	1 g
Yeast extract	10 g
Neomycin sulfate	0.02 g
Polymyxin sulfate	0.05 g
Ferric citrate	0.5 g
Agar	13.5 g

pH 7.2 dopo sterilizzazione (118 °C per 20 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Preparare il terreno a concentrazione tale (concentrazione normale o doppia) che inoculi superiori a 10 mL non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard.

Prima della sterilizzazione distribuire il terreno in tubi (10 mL/tubo).

Il campione da esaminare deve essere pretrattato a 80 °C per 10 minuti per l'inattivazione delle forme vegetative. Inoculare una serie di tubi con il campione tal quale o con una sua diluizione in base alla procedura esposta in 6040 - Metodo A.

L'inoculo viene effettuato in tubi contenenti il terreno mantenuto disciolto alla temperatura di 45 °C e la miscela mescolata leggermente.

Dopo solidificazione del terreno aggiungere alcuni millimetri di olio di vasellina sterile e incubare a 36 °C per 24-48 ore.

Si considerano positivi i tubi che presentano nello spessore del terreno colonie che provocano annerimento del terreno. Calcolare il valore dell'indice MPN dal numero di tubi risultati positivi in base alla Tab. 1 (6040- Metodo A).

### METODO B - Tecnica delle membrane filtranti (MF)

Il metodo delle membrane filtranti permette di effettuare un conteggio quantitativo diretto dei microrganismi ricercati. La procedura di analisi è riportata in 6040- Metodo B. Questa tecnica permette di esaminare volumi di acqua normalmente superiori rispetto a quelli che si possono analizzare con il metodo dei tubi multipli. Le aliquote da analizzare sono scelte in funzione della qualità del campione da esaminare.

I terreni culturali di seguito indicati per l'enumerazione delle spore di clostridi solfito riduttori sono entrambi validi per la metodica delle membrane filtranti.

**Perfringens OPSP Agar**

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptone	15 g
Yeast extract	5 g
Soy Peptone	5 g
Liver extract	7 g
Ferric ammonium citrate	1 g
Sodium metabisulfite	1 g
Tris	1.5 g
Agar	10 g

pH 7.3 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. È consigliabile prepararlo al momento dell'uso. Dopo sterilizzazione portarlo alla temperatura di 50 °C e addizionarlo con:

- sulfadiazina sodica (100 mg/L);
- oleandomicina fosfato (0,5 mg/L);
- polimixina B solfato (10000 U.I./L).

I supplementi, in confezioni già predisposte, si trovano in commercio in forma disidratata. Dopo l'aggiunta dei supplementi mescolare accuratamente e distribuire in piastre Petri lasciando solidificare il terreno. Prima dell'analisi il campione da esaminare deve essere pretrattato a 80 °C per 10 minuti per l'inattivazione delle forme vegetative. Dopo filtrazione su membrana del campione, incubare le piastre a 37 °C per 24-48 ore utilizzando sistemi atti a garantire condizioni di anaerobiosi. Contare le colonie nere traslucide, di diametro 2-4 mm e riportare il numero a 100 mL considerando le eventuali diluizioni effettuate.

**SPS Agar**

Composizione per 1 L di terreno:

Sodium sulfite (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	0.5 g
Polymyxin sulfate	0.01 g
Sulfadiazine	0.12 g
Pancreatic digest of casein	15 g
Yeast extract	10 g
Agar	13.9 g
Ferric citrate	0.5 g

pH 7 dopo sterilizzazione (118 °C per 15 min.).

Il terreno si trova in commercio anche in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Prima dell'analisi il campione da esaminare deve essere pretrattato a 80 °C per 10 minuti per l'inattivazione delle forme vegetative.

Dopo la filtrazione su membrana del campione, incubare le piastre a 37 °C per 18-24 ore utilizzando sistemi atti a garantire condizioni di anaerobiosi. Contare le colonie nere traslucide e riportare il numero a 100 mL considerando le eventuali diluizioni effettuate.

**BIBLIOGRAFIA**

- HANFORD P.M. (1974): "Quantitation of *Clostridium perfringens*" *J. Appl. Bacteriol.* **37**, 559.
- MARSHALL R.S., STEENBERGER J.F. AND MC CLUNG, L.S. (1965): "Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*" *Appl. Microbiol.* **13**, 559.

## 7070 - BATTERIOFAGI ANTI-*ESCHERICHIA COLI*

I batteriofagi, o virus batterici, sono entità biologiche di per sé metabolicamente inattive. Non sono in grado, cioè, di utilizzare, da soli, fonti esterne di energia per sintetizzare molecole che servono alla loro crescita ed alla loro moltiplicazione. Come i virus degli organismi superiori, essi possono moltiplicarsi solo all'interno di una cellula ospite (la cellula batterica).

La loro presenza nelle feci è stata messa in evidenza nel 1917 ed essi sono stati successivamente trovati in relazione alla presenza di contaminazione fecale. La loro concentrazione nelle acque grezze di scarico è stata valutata tra  $10^2$  e  $10^5$  UFP/mL (Unità Formanti Placca) in funzione del ceppo *Escherichia coli* marcatore usato per il loro rilevamento. La loro presenza è riscontrata anche in acque superficiali e acque marine e dove comunque siano presenti batteri che possono essere da essi infettati.

La normativa italiana sulle acque destinate al consumo umano (DPR 236/88) ha incluso i batteriofagi anti- *E. coli* tra i parametri accessori da ricercare per definire la qualità di questo tipo di acque. A causa delle difficoltà attualmente connesse al rilevamento degli enterovirus, si è presa in considerazione la possibilità di ricorrere ad un indicatore di inquinamento virale, quale i batteriofagi, per valutare l'effetto dei disinfettanti sulle particelle virali.

Comunque la ricerca dei batteriofagi può avere anche un suo significato per saggiare la qualità di acque reflue sottoposte a trattamento di depurazione. Di seguito sono riportati i metodi per il loro rilevamento.

### METODO A - Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità di batteriofagi anti-*Escherichia coli* in campioni di acqua tramite la formula probabilistica (6040- Metodo A) che definisce il numero più probabile di batteriofagi in grado di produrre combinazioni positive e negative

in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è indicato particolarmente per l'analisi di acque reflue e comunque di acque torbide. I volumi da analizzare per acque di diversa tipologia possono essere quelli riportati in Tab. 1

Tab. 1 - Volumi di acqua suggeriti per l'analisi di acque di diversa qualità per la ricerca quantitativa dei batteriofagi anti-*Escherichia coli*

Tipo di Acqua	Volumi da analizzare				
	1-20 L	100 mL	10 mL	1 mL	0.1-0.001 mL
Acqua potabile	x				
Pozzi, sorgenti		x	x		
Laghi		x	x	x	
Fiumi			x	x	
Scarichi clorati				x	x
Scarichi grezzi					x

Le eventuali diluizioni vengono effettuate come indicato nella Fig. 1 del 6040-Metodo A. Grossi volumi devono essere analizzati nel caso di acque di buona qualità. In questi casi, si deve procedere alla concentrazione del campione onde ottenere volumi più ridotti per l'esecuzione del metodo. È necessario che alla concentrazione del campione faccia seguito l'aggiunta di una soluzione al 3% del volume del campione di Beef Extract a pH 9, che ha funzione di stabilizzante delle particelle virali e limita fenomeni di adsorbimento meccanico dei virioni.

Il ceppo di *E. coli* fago-sensibile, utilizzato come marcatore, deve essere inoculato in un'aliquota (10-100 mL) di Brodo fagi e incubato a 37 °C per 18-24 ore, prima dello svolgimento dell'analisi. La moltiplicazione del ceppo batterico marcatore è rilevata, al termine dell'incubazione, dall'intorbidimento del terreno. È importante che il ceppo marcatore sia in fase logaritmica al momento dell'analisi.

### 1 - Fase di arricchimento

Le modalità generali di esecuzione del metodo sono riportate in 6040. Dopo avere selezionato i volu-

mi da analizzare, i campioni vengono inoculati in tubi di Brodo Fagi, utilizzato come terreno di arricchimento. Inoltre, in ciascun tubo si aggiungono:

- 0,1 mL di una soluzione all'1,5% di  $\text{CaCl}_2$  sterilizzato mediante filtrazione;
- 0,1 mL della brodocoltura del ceppo di *E. coli*, usato come marcatore;

Si incuba a 37 °C per 18-24 ore.

### Brodo Fagi (BF)

Composizione per 1 L di terreno:

Bacto peptone	3 g
Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ )	0.2 g
Manganese sulfate ( $\text{MnSO}_4$ )	0.05 g
pH 6.9 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).	

Il terreno si prepara a partire dai singoli ingredienti. Si prepara a concentrazione tale (concentrazione normale o doppia) che inoculi superiori a 10 mL non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard. Prima della sterilizzazione si distribuisce in tubi (10 mL/tubo). Si mantiene a + 4 °C per un mese. Dopo incubazione tutti i tubi inoculati, che presentino o meno torbidità, vengono sottoposti alla prova di conferma.

## 2 - Prova di conferma

Sottoporre tutti i tubi di Brodo Fagi inoculati con il campione alla prova di conferma. Dopo incubazione porre i tubi di Brodo Fagi a bagnomaria a 60 °C per 10 minuti al fine di inattivare le forme vegetative batteriche. Quindi, un'ansata per ogni tubo è saggiata per la presenza/assenza di batteriofagi.

A seguito dell'infissione di un'ansata della miscela di arricchimento, si sviluppano sulla superficie del terreno Agar Fagi -addizionato, secondo il metodo dell'agar germi (6000), di 1 mL della brodocoltura del ceppo di *E. coli* utilizzato nella fase di arricchimento per ciascun tubo in cui erano presenti batteriofagi anti *E. coli* - aree di lisi dopo 24 ore di incubazione a 37 °C.

Dalla combinazione dei positivi e negativi sulla superficie del terreno solido si ricava il valore dell'indice MPN come esposto in 6040-Metodo A in base alla Tab. 1.

### Agar Fagi (AF)

Composizione per 1 L di terreno:

Bacto peptone	3 g
Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ )	0.2 g
Manganese sulfate ( $\text{MnSO}_4$ )	0.05 g
Agar	15 g

pH 6.9 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il terreno si prepara a partire dai singoli ingredienti. Il terreno, dopo sterilizzazione, viene mantenuto in beuta fino al momento dell'uso e si può conservare a + 4 °C per un mese. Al momento dell'analisi si preparano piastre Petri contenenti il terreno, sciolto alla temperatura di 46 °C, e 1 mL della brodocoltura di *E. coli* secondo la procedura della semina in agar germi (6000) e si lasciano solidificare. Dopo incubazione delle piastre inoculate con il campione secondo quanto sopra esposto, le placche di lisi si evidenziano sulla superficie dell'agar come aree trasparenti nella continuità opaca della crescita batterica. Nel calcolo dell'indice MPN considerare le eventuali diluizioni effettuate.

### METODO B - Tecnica della conta diretta su piastra

Il metodo della conta diretta permette di calcolare la densità di batteriofagi anti *E. coli* in un campione di acqua in base al numero delle placche di lisi che vengono ad evidenziarsi sulla superficie di un doppio strato di terreno agarizzato. Il metodo può essere applicato all'analisi di acque potabili, di scarico e superficiali, ma comunque con acque poco torbide. Volumi indicativi, da analizzare per acque di diversa tipologia, sono elencati in Tab. 1.

La procedura per la preparazione delle diluizioni eventualmente da effettuare è indicata in Fig. 1 (6040-Metodo A). Grossi volumi devono essere analizzati nel caso di acque di buona qualità (es. acqua potabili). In questi casi, si deve procedere alla concentrazione del campione onde ottenere volumi più ridotti per l'esecuzione del metodo. Infatti, la tecnica permette di analizzare un massimo di 100 mL di campione.

È necessario che alla concentrazione del campione faccia seguito l'aggiunta di una soluzione al 3% del volume del campione di Beef Extract a pH 9, che ha

funzione di stabilizzante delle particelle virali e limita fenomeni di adsorbimento meccanico dei virioni. Il ceppo di *E. coli* fago-sensibile, utilizzato come marcatore deve essere inoculato in un'aliquota (10-100 mL) di Brodo fagi e incubato a 37 °C per 18-24 ore, prima dello svolgimento dell'analisi. La moltiplicazione del ceppo batterico marcatore è rilevata, al termine dell'incubazione, dall'intorbidimento del terreno.

### Brodo Fagi (BF)

Composizione per 1 L di terreno:

Bacto peptone	3 g
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> )	0.2 g
Manganese sulfate (MnSO <sub>4</sub> )	0.05 g
pH 6.9 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).	

Il terreno si prepara a partire dai singoli ingredienti. Si può mantenere a + 4 °C per un mese.

### Trypticase Yeast extract Glucose agar (TYG)

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptone	10 g
Yeast extract	1 g
Sodium chloride (NaCl)	8 g
Glucose	8 g
Agar	15 o 9 g

pH 6.7 dopo sterilizzazione (121 °C per 15 min.).

Il substrato si prepara a partire dai singoli ingredienti. I terreni, uno agarizzato all'1,5%, l'altro allo 0,9% si preparano con gli stessi componenti e si differenziano per la concentrazione di agar.

Il terreno agarizzato all'1,5% viene preparato in beuta, quello con agar allo 0,9%, viene distribuito, prima della sterilizzazione, in tubi (5 mL/tubo) oppure in beuta (fino a 100 mL/beuta) in funzione dell'aliquota di campione da analizzare.

Al terreno agarizzato all'1,5%, raffreddato alla temperatura di 50 °C, dopo sterilizzazione, viene aggiunto CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,3 g/L). Il terreno viene distribuito in piastre Petri e lasciato solidificare, pronto per l'uso. Si può mantenere a + 4 °C per un mese.

Al momento dell'uso il terreno agarizzato allo 0,9% è sciolto a bagnomaria, portato alla temperatura di 48 °C e addizionato con:

- una aliquota di una soluzione di CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,3

g/L);

- una aliquota della brodocoltura del ceppo marcatore di *E. coli* in fase logaritmica;
- un volume del campione da analizzare tal quale, concentrato o diluito in funzione della qualità dell'acqua da analizzare.

Il terreno allo 0,9% si prepara a concentrazione tale (concentrazione normale o doppia concentrazione) che gli inoculi del campione non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard.

In Tab. 2 sono riportati alcuni esempi dei volumi da utilizzare con questa tecnica per i diversi tipi di acque.

Tab. 2 - Volumi di campioni da analizzare e di componenti da aggiungere ai volumi substrato allo 0,9% di agar

Tipo di acqua	Volumi finali (mL)			
	substrato allo 0,9%	campione di acqua	soluzione di CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	brodocoltura del marcatore
Potabile	100	100 conc.	1	5
Pozzi, sorgenti	100	100	1	5
Laghi, fiumi	10	10	0,1	2
Scarichi clorati	5	1	0,05	1
Reflua grezza	5	1 diluito	0,05	1

La miscela, dopo leggera agitazione, è quindi versata sul terreno, all'1,5% di agar, già solidificato in piastra, e distribuita uniformemente. Dopo solidificazione dello strato superficiale, le piastre sono incubate a 37 °C per 7-8 ore. Dopo incubazione, si contano le aree di lisi riportando il numero come Unità Formanti Placca (UFP). Le placche sono visibili come aree trasparenti nella continuità opaca del substrato colturale. Considerare le piastre che presentano un massimo di 100 placche e in cui le aree di lisi non siano confluenti.

### BIBLIOGRAFIA

- DEL VECCHIO, G. & D'ARCA SIMONETTI A. (1959): "Il metodo del Most Probable Number (MPN) e la sua importanza nella colimetria delle acque con particolare riguardo a quelle destinate ad uso potabile". *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* 10, 441.
- HAVELAAR, A.H. & W.M. HOGEBOM (1983): "Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters". *Antonie Van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* 49, 387.



## 8000 - PARAMETRI TOSSICOLOGICI

I saggi di tossicità con animali acquatici vengono effettuati per valutare se un dato composto, una miscela di composti o un campione d'acqua di scarico sono tossici e, in caso positivo, per definire il grado di tossicità e i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica.

Tali saggi sono stati condotti fino ad oggi con organismi di una sola specie; allo scopo di aumentare il grado di protettività del dato ottenuto, si tende oggi a sviluppare saggi "multispecie" e, cioè, condotti con organismi di livelli trofici diversi (batteri, alghe, crostacei, pesci).

È questa la direzione che dovrà essere presa anche in sede di normativa italiana (che, attualmente, prevede due sole specie di pesci da utilizzare singolarmente) e verso la quale l'IRSA intende indirizzare le prossime edizioni del volume dei metodi di analisi delle acque tra i quali dovrà comparire anche il saggio per le acque di mare previsto dalla legge.

In questo volume sono riportate le metodiche relative a due saggi di tossicità con pesci e due con il

crostaceo *Daphnia magna*. Il primo dei due saggi con pesci (metodo A) consente di valutare la tossicità di un composto o di un campione d'acqua in termini di LC50 (concentrazione letale); il secondo (metodo B) è invece impostato nei termini richiesti dalla legge 319/76.

Dei due metodi con *Daphnia*, il primo (metodo A) permette di individuare la EC50 (concentrazione di effetto) mentre il secondo (metodo B) consente di valutare l'accettabilità di un effluente. È opportuno sottolineare che, al presente, solo il metodo B con pesci ha valore legale.

Nei saggi con *Daphnia* si riportano, in appendice, i metodi per l'allevamento dell'organismo test ed i metodi per i calcoli della EC.

In considerazione della specificità di questo raggruppamento rispetto ai precedenti (Metodi fisici, chimici e chimico-fisici e Metodi microbiologici) tutti gli aspetti di carattere generale quali campionamento, attrezzature, reattivi e metodi di calcolo sono trattati nei singoli saggi.

## 8010 - METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON PESCI

### METODO A - Valutazione della LC50

#### 1 - Generalità

##### 1.1 - PRINCIPIO DEL METODO

Questo metodo, adottato nei casi in cui si presenti la necessità di salvaguardare ambienti biologici specifici od organismi particolari, si basa sulla determinazione della tossicità acuta espressa dalla LC50, che è la diluizione alla quale il 50% degli animali considerati decede in un tempo prestabilito (24-48 ore o più). Tale diluizione viene determinata con un saggio preliminare ed uno definitivo: il saggio preliminare serve ad individuare l'ambito approssimato di diluizione entro il quale si trova la LC50; il saggio definitivo invece permette di precisarne il valore. Per stabilire quali sono i rapporti di diluizione che debbono essere rispettati perché l'ambiente biologico che riceverà le acque esaminate sia salvaguardato nella sua funzionalità, occorrerà infine che dalla LC50 venga calcolata la "diluizione di sicurezza".

##### 1.2 - INTERFERENZE

Nella valutazione della tossicità le principali interferenze possono essere rappresentate da mortalità dovute a livelli troppo bassi di ossigeno, da perdite di sostanze tossiche (per esempio volatili) o da altre cause che aumentino o riducano la tossicità del campione (per esempio precipitazione di sali di metalli pesanti, variazioni di pH, ecc.).

Quando l'analisi chimica abbia dimostrato che queste interferenze effettivamente esistono, la loro eliminazione potrà aver luogo essenzialmente in due modi:

- 1) sostituendo le soluzioni in esame con frequenza maggiore di quella prevista dal metodo, oppure operando con apparecchiature che permettano un ricambio continuo della soluzione in esame;
- 2) fornendo l'ossigeno necessario in modo tale da compensare quello utilizzato nei processi ossidati-

vi dell'acqua e per la respirazione degli animali.

Controlli dovranno assicurare che durante tutto il periodo delle prove il livello di ossigeno si mantenga fra il 60 e 100% della saturazione.

##### 1.3 - RACCOLTA E CONSERVAZIONE CAMPIONI

Il volume del liquido necessario alle prove dipende dalla composizione e dal grado di tossicità del liquido stesso (in genere 10 ÷ 20 litri sono sufficienti). I campioni vanno raccolti in recipienti riempiti completamente e conservati a circa 4 °C.

#### 2 - Apparecchiature

Per le prove di tossicità di tipo convenzionale (e cioè a liquido non ricambiato in modo continuo), le apparecchiature necessarie sono rappresentate da vasche di vetro o bottiglie a collo largo. Ne occorre una serie di almeno 8, della capacità minima di 4 litri (per il saggio preliminare), ed una serie di almeno 4 della capacità minima di 10 litri (per il saggio definitivo). La forma dei recipienti non ha grande importanza, a condizione che la profondità del liquido non sia inferiore ai 15 cm. È inoltre indispensabile poter regolare (con bagni o camere termostate) la temperatura dei liquidi in esame durante tutto il tempo della prova. L'ambito di temperatura utile va, orientativamente, da 15 a 25 °C, con oscillazioni intorno a  $\pm 1$  °C. Le temperature d'esperimento saranno prestabilite in funzione della temperatura massima osservata nel recipiente in cui verrà scaricata l'acqua in esame. Occorrono infine vasche di stabulazione, nelle quali conservare gli animali prima del loro impiego. L'acqua di queste vasche dovrà essere portata gradualmente alla temperatura alla quale si effettueranno le prove, curando che rimanga limpida (con riciclo su carbone o con ricambio in maniera continua) e ad un adeguato livello di ossigenazione (60 ÷ 100%) ottenibile con gorgogliamento d'aria. Nel caso di vasche a riciclo, occorrerà sostituire l'acqua di stabulazione con una

frequenza che dipende dalla densità degli animali, e dalle loro esigenze. Analisi di alcune caratteristiche chimiche dell'acqua (per esempio  $N-NH_3$ ) eseguite in tempi successivi, potranno dare utili indicazioni sulla frequenza del ricambio. Questo sistema di stabulazione è comunque da adottarsi solo quando manchi ogni possibilità di un continuo ricambio. In queste circostanze il periodo di stabulazione dovrà essere ridotto al minimo indispensabile.

### 3 - Animali per il saggio e le soluzioni

#### 3.1 - ANIMALI PER IL SAGGIO

Il metodo A, per definizione, richiede che gli animali da usare nelle prove di tossicità vengano scelti in base all'interesse locale e contingente. Tale scelta cade generalmente sui pesci, ma anche altri rappresentanti della biocenosi acquatica possono essere utilizzati con successo (crostacei, insetti, ecc.) purché sufficientemente sensibili e tali da garantire la sopravvivenza anche delle altre componenti della biocenosi. In tutti i casi è condizione indispensabile che i soggetti prescelti sopportino bene le condizioni di acquario, e questa possibilità va controllata in base al loro comportamento e alla mortalità osservata durante il periodo di acclimatazione che precede le prove. Quando la mortalità naturale supera il 10%, il lotto intero di animali deve essere accantonato e rimesso in uso solo quando detta mortalità receda. Occorre inoltre che gli animali siano assolutamente sani e di dimensioni omogenee: nel caso dei pesci sono preferibili soggetti di lunghezza corporea tra 5 e 10 cm. È inoltre indispensabile che la loro classificazione sia effettuata con esattezza e che il nome scientifico sia indicato fino alla specie. Nell'ambito nazionale le specie di Pesci cui si fa generalmente ricorso per prove tossicologiche sono le seguenti: *Salmo gairdnerii* (trota iridea) attualmente denominata *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario* (trota di fiume), *Phoxinus laevis* (sanguinerola), *Alburnus albidus* (alborella), *Leuciscus cephalus cabeda* (cavedano). Queste specie si possono ottenere dalle piscicoltura o raccogliere nella maggior parte delle acque italiane. Durante il periodo di stabulazione, gli animali devono essere regolarmente ed opportunamente alimentati (sospendendo la somministrazione del cibo il giorno prima che inizino le prove e durante le prove stesse) e acclimatati alla temperatura alla

quale si effettuerà il test.

#### 3.2 - NUMERO DI ANIMALI E VOLUME DI LIQUIDO

Nel test preliminare, il numero minimo di animali da usare può essere di 2 per ogni diluizione e, in questo caso, anche il volume del liquido in esame potrà essere ridotto a 4 litri. Per la prova definitiva occorreranno invece almeno 10 soggetti per ogni diluizione a meno di non operare con organismi diversi dai pesci (crostacei, insetti ecc.) per i quali il numero dovrà essere più elevato (oltre 20). Il rapporto tra il peso complessivo degli animali ed il volume di acqua che li contiene dovrà essere stabilito in funzione di numerosi fattori, e soprattutto con determinazioni del contenuto di ossigeno residuo. Poiché usando 10 animali ciascuno del peso di 10 grammi occorrerebbero volumi di liquido notevoli, si consiglia di superare le difficoltà che comporta l'uso di grandi vasche, operando con animali di minori dimensioni o areando il liquido in esame.

#### 3.3 - ACQUA DI DILUIZIONE

In questo metodo, la condizione ideale sarebbe quella di poter effettuare le necessarie diluizioni del campione con l'acqua prelevata in una zona pura dello stesso corpo recipiente. Poiché, ciò è raramente possibile (il corpo recipiente può essere già contaminato oppure possono essere necessari volumi d'acqua troppo elevati), il diluente dovrà essere ricavato da altra fonte e corretto nelle sue principali caratteristiche (ad esempio pH, alcalinità e durezza) fino ad avere una composizione chimica simile a quella media del corpo recipiente.

### 4 - Procedimento

#### 4.1 - SAGGIO PRELIMINARE

Tale saggio deve indicare se esiste una tossicità e, in caso positivo, quale sia dopo 24 ore l'ambito di diluizione entro il quale si trova la LC50. A questo scopo si prepara, con gli accorgimenti indicati in precedenza, una vasca di 4 litri contenente il campione in esame tal quale (al 100%) e si controlla se il campione è tossico, introducendovi un piccolo gruppo di animali (per esempio 2 pesci). Se il campione non è tossico, il controllo di non tossicità viene continuato

per 48 ore, se invece entro le 24 ore si sono avuti esiti parziali o totali di mortalità, si procede all'allestimento delle diluizioni secondo una serie ad intervalli logaritmici uguali.

Per esempio: 100 - 89,1 - 79,4 - 70,8 - 63,1 - 56,3 - 50,1 - 44,7 - 39,8 - 35,5 - 31,6 - 28,2 - 25,1 - 22,4 - 19,9 - 17,8 - 15,8 - 14,1 - 12,6 - 11,2 - 10 ecc\*.

Esattamente a 24 ore di distanza dall'introduzione degli animali, la prova effettuata permetterà di individuare l'intervallo compreso tra la diluizione in cui la totalità o una parte soltanto (più della metà) degli animali usati è deceduta e quella che ha causato la morte solo di una parte (inferiore alla metà) o di nessuno degli animali usati. È evidente che, quando il saggio preliminare venga condotto con un elevato numero di intervalli di diluizioni, l'ambito cercato (e cioè quello in cui si trova la LC50) sarà più ristretto e la prova definitiva più agevole da effettuare.

#### 4.2 - SAGGIO DEFINITIVO

Quando nei recipienti contenenti il campione tal quale (100%) la sopravvivenza sia totale anche dopo 48 ore, il saggio definitivo consisterà semplicemente nel ripetere la prova con un numero maggiore di animali (almeno 10) con un maggiore volume di liquido. Quando invece con il saggio preliminare sia stato individuato l'ambito in cui si trova la LC50, il saggio definitivo dovrà servire ad indicare quali sono le diluizioni che determinano, dopo 24 e 48 ore, percentuali di sopravvivenza inferiori (ma non nulle) al 50% e superiori (ma non totali) al 50%. Allo scopo si preparano alcune soluzioni nell'ambito individuato con le prove preliminari, diluendo secondo lo schema degli intervalli logaritmici e vi si introducono gli animali, annotando dopo le 24 le percentuali di sopravvivenza come nel caso precedente e protraendo l'osservazione a 48 ore (gli animali che decedono devono essere rimossi dalle vasche appena possibile). Se dopo i tempi indica-

\* L'andamento del saggio effettuato con il campione tal quale, dà in linea di massima già un'indicazione da scegliere: per esempio con un campione che al 100% abbia causato la morte in circa 2 ore di tutti gli animali si potrà allestire la serie delle diluizioni alle concentrazioni del 25,1 - 12,6 - 6,31 - 3,16 e 1,58% mentre con un campione poco tossico si potrà utilizzare la serie 100 - 79,4 - 63,1 - 50,1. Quando una scelta a priori non sia possibile, occorrerà allestire una serie di prove tra 100 e 0,1%, per esempio 100 - 31,6 - 10 - 3,16 - 1 - 0,361 - 0,1.

ti si ottengono i risultati necessari si può procedere al calcolo della LC50. Diversamente, occorre ripetere la prova selezionando altri intervalli di diluizione.

#### 5 - Determinazione grafica della LC50

Si portano su carta logaritmica le percentuali di sopravvivenza osservate a due diluizioni successive (diluizioni sulla carta logaritmica) dopo 24 ore. Si uniscono con una retta i due punti (che devono essere situati, per quanto detto in precedenza, sopra e sotto la linea del 50%) e, dal punto in cui la retta interseca la linea del 50%, si traccia una perpendicolare all'asse delle diluizioni, ottenendo un valore corrispondente alla LC50-24 ore. Lo stesso procedimento si segue utilizzando le percentuali di sopravvivenza annotate a 48 ore, ottenendo così la LC50-48 ore (Fig. 1).

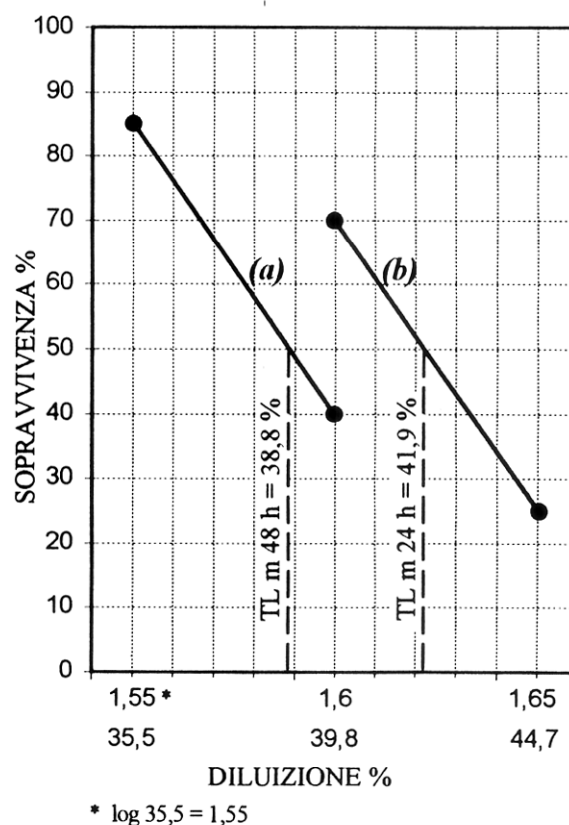


Fig. 1 - Determinazione grafica della LC50

\* I valori di sopravvivenza più indicativi e più corretti per il calcolo della LC50 sono quelli che si trovano, per le diluizioni, tra il 20 e l'80%.

Valutazioni più accurate della LC50 possono essere effettuate con le metodologie di calcolo riportate in appendice ai metodi che utilizzano la *Daphnia*.

### 6 - Calcolo della diluizione di sicurezza

La LC50 calcolata con il metodo descritto non è evidentemente utilizzabile tal quale; essa non prevede, tra l'altro, che la sopravvivenza del 50% della popolazione animale mentre non solo si esige che il 100% di detta popolazione sopravviva, ma occorre prevenire gli eventuali effetti nocivi che si potrebbero verificare in un tempo maggiore di quello previsto dal metodo A. I valori di LC50 24 e 48 h vengono a questo scopo elaborati come segue:

$$D = \frac{LC50_{48h} \cdot 0,3}{\left[ \frac{LC50_{24h}}{LC50_{48h}} \right]^2}$$

dove D è la diluizione di sicurezza cercata.

Questa diluizione, adottando animali molto sensibili, quali ad esempio i Salmonidi, può dare sufficienti garanzie ai fini della protezione dell'intero ambiente biologico.

*Esempio:* Un campione di acqua contaminata deve essere immesso in fiume di cui occorre salvaguardare l'intera biocenosi. Occorre stabilire, di conseguenza, quale è, nel caso specifico, la diluizione di sicurezza, adeguando il più possibile le condizioni sperimentabili e quelle del corpo recipiente (temperatura, caratteristiche del diluente, specie di animali da utilizzare ecc.). La ricerca si conduce in due tempi:

#### SAGGIO PRELIMINARE:

(Si può eseguire con 2 animali per diluizione). La prova del campione tal quale dà il seguente esito: entrambi gli animali decedono in 6 ore. Si procede di conseguenza all'allestimento di almeno 4 diluizioni, per esempio quelle comprese tra il 79,4 e il 19,9% (e cioè 79,4 - 50,1 - 31,6 - 19,9%. Se è il caso i valori possono essere approssimati). A 24 ore di distanza la prova preliminare dà il seguente esito: alle diluizioni 79,4 e 50,1 si ha sopravvivenza nulla; alle diluizioni 31,6 e 19,9 si ha sopravvivenza totale. Di conseguenza la LC50 si troverà tra 50,1 e 31,6%.

#### SAGGIO DEFINITIVO:

(Si può eseguire con 20 animali per ogni diluizione). Si preparano 3 diluizioni comprese tra 50,1 e 31,6% ad intervalli logaritmici eguali e cioè 44,7 - 39,8 e 35,5%. Si introducono 20 animali per ogni diluizione e si annotano i sopravvissuti a 24, 48 e 96 ore. Nell'esempio gli esiti di questa prova sono:

Diluizione	44,7%	39,8%	35,5%
Animali sopravvissuti a 24 h	5 (25%)	14 (70%)	20 (100%)
Animali sopravvissuti a 48 h	0 (-)	8 (40%)	17 (85%)

Si portano su un grafico semilogaritmico (cfr. Fig. 1) le diluizioni (sulla scala logaritmica) e le % di sopravvivenza osservate alle 24 ore (il 100% di sopravvivenza non è utilizzabile così come lo 0%). Si congiungono i due punti con una retta (*a* nella figura). Dal punto di intersezione con la linea del 50% si traccia la perpendicolare all'asse delle diluizioni ottenendo il valore logaritmico 1.622 il cui corrispondente in % è la LC50 24 h = 41,9%. Con analogo procedimento si trova la LC50 a 48 ore che è 38,8% (*b* nella figura). La diluizione di sicurezza, applicando l'equazione riportata al paragrafo 6, di conseguenza è:

$$D = \frac{0,3 \cdot 38,8}{\left[ \frac{41,9}{38,8} \right]^2} = 9,98\%$$

Se lo scarico in questione ha una portata per esempio di 8 litri al secondo si potrà così calcolare la portata minima (Q) che il corpo recipiente dovrà avere perché non abbiano luogo fatti tossici di nessun genere:

$$Q = \frac{8 (100 - 9,98)}{9,98} = 72 \text{ litri / secondo}$$

Dopo diluizione la portata sarà quindi di 80 litri al secondo.

### 7 - Controlli e precisione del metodo

Le prove di tossicità esigono controlli soprattutto quando la mortalità sia risultata, nel periodo che precede le prove, al limite del valore accettabile (10%).



I controlli vanno effettuati allestendo, con il solo diluente, delle vasche in condizioni identiche a quelle delle prove. Quando, durante la prova, si osservano tra gli animali di controllo mortalità superiori al 10%, la prova va ripetuta usando un altro lotto di animali.

La valutazione della LC50 può essere resa più precisa impiegando carta di probabilità o usando metodi statistici basati sul calcolo, anziché sull'estrapolazione grafica, della LC50.

Ai fini abituali per i quali vengono condotte queste determinazioni, il metodo descritto può essere tuttavia considerato soddisfacente. Incidono, però, sulla precisione del metodo anche altri fattori (numero e cariche degli animali, ampiezza dell'intervallo tra le diluizioni, uniformità della metodologia adottata, ecc.), che possono essere in buona parte ridotti aumentando il numero dei soggetti, riducendo gli intervalli tra le diluizioni ed adottando metodi con ricambio continuo o intervallato del liquido in esame.

## 8 - Espressione dei risultati

I risultati del saggio tossicologico vengono espressi in termini di LC50 a 24 a 48 ore (in volumi % del campione originale o altra unità). È indispensabile che accanto ai due valori di LC50 vengano indicate le condizioni sperimentali adottate e in particolare: specie usata, temperatura di esperimento, caratteristiche del diluente, modalità di ossigenazione, condizioni chimiche all'inizio e alla fine delle prove, volume del liquido usato, numero, dimensioni e peso degli animali.

## METODO B - Valutazione dell'accettabilità di un effluente

### 1 - Generalità

#### 1.1 - CAMPO DI APPLICAZIONE DEL METODO

Il metodo B si riferisce alla normativa in vigore in Italia (319/76) la quale richiede, per un giudizio di accettabilità delle acque di scarico, che il campione in esame, diluito 1:1 con acqua standard, consenta la sopravvivenza di almeno il 50% degli animali usati per il saggio, il carassio per la Tab. C e la trota per la Tab. A, per un periodo di 24 ore, alla temperatura di 20 °C o 15 °C nei due casi e in condizioni di aerazione.

Il metodo, quindi, a differenza di quello descritto in precedenza, è rigorosamente standardizzato, nella necessità di operare in condizioni confrontabili nell'esecuzione dei controlli con valore legale sui diversi scarichi.

#### 1.2 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consiste nel valutare il numero di animali che sopravvivono dopo un periodo di 24 ore a contatto con il campione di effluente, in condizioni sperimentali standard e ad un'unica diluizione (50% con acqua standard).

#### 1.3 - RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il volume del campione necessario per il saggio è di 20 litri. Di questi, 10 vengono utilizzati per il saggio e 10 vengono tenuti come riserva nel caso che quest'ultimo debba essere ripetuto.

Il campione va conservato a 4 °C per non oltre 2 giorni in recipiente riempito completamente.

## 2 - Apparecchiature, reagenti e animali per il saggio

### 2.1 - APPARECCHIATURE

Sono necessarie due vasche di vetro o di altro materiale inerte, di almeno 20 litri di capacità. La forma dei recipienti non ha grande importanza, a condizione che sia assicurato un battente di almeno 15 cm. Particolarmente adatte possono essere vasche di cm 50x25 di base e cm 20-30 di altezza.

Le vasche per il saggio con trota devono essere fornite di una ricopertura a rete. Per la termoregolazione sono necessari bagni o camere termostatiche alla temperatura di 15 °C (saggio con trota) e 20 °C (saggio con carassio).

Per quanto riguarda l'aerazione le vasche devono essere fornite di un gorgogliatore ad aria che consenta di mantenere la concentrazione dell'ossigeno tra il 40 e il 100% di saturazione durante tutto il saggio.

Per le vasche di stabulazione vedasi il punto 2 del metodo A.

### 2.2 - ACQUA STANDARD

L'acqua standard, da utilizzare per la diluizione

del campione di effluente e per il saggio di controllo, va preparata con i seguenti sali:

NaHCO <sub>3</sub>	mg/L 192
CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	mg/L 120
MgSO <sub>4</sub>	mg/L 120
KCl	mg/L 8

I sali elencati vanno disciolti, nelle quantità indicate, in acqua distillata o deionizzata e la soluzione va aerata prima dell'uso. Il pH che si ottiene dopo aerazione è di 7,8-8, la durezza è 160-180 mg/L CaCO<sub>3</sub> e l'alcalinità 110-120 mg/L CaCO<sub>3</sub>.

#### 2.3 - ANIMALI PER IL SAGGIO

Per il saggio con carassio si utilizzano animali della specie *Carassius auratus* di 5-6 cm di lunghezza.

Per il saggio con trota si impiegano animali della specie *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*) di 8-12 cm di lunghezza.

Per quanto riguarda le condizioni di stabulazione si rinvia ai paragrafi 2 e 3.1 del metodo A.

#### 2.4 - NUMERO DI ANIMALI E VOLUME DEL CAMPIONE

Per ogni prova sono necessari 10 animali che dovranno essere mantenuti in vasche contenenti 20 litri di campione da saggiare, opportunamente diluito, aerato e termostatato.

### 3 - Procedimento

Si preparano due contenitori per il saggio. In uno vengono travasati 10 litri del campione da saggiare e 10 di acqua standard; nell'altro 20 litri di acqua standard. Si procede all'aerazione e alla termostatazione a 15 °C (trota) o a 20 °C (carassio).

A condizioni operative raggiunte si trasferiscono dalle vasche di stabulazione (che devono avere la stessa temperatura del saggio) 10 animali nella vasca con il campione diluito e 10 in quella con il solo diluente (controllo). Il trasferimento va eseguito utilizzando un retino che consenta di effettuare tutte le operazioni con rapidità e senza eccessivo stress per gli animali.

A 2-3 ore dall'inizio del saggio si verificano le condizioni di ossigenazione e si regola l'aerazione in modo da mantenere la saturazione sopra il 40% nel caso del carassio e sopra il 60% in quello della trota.

Dopo 24 ore si rileva il numero degli animali sopravvissuti. Se durante la prova si osservano mortalità, gli organismi deceduti vanno rimossi dalle vasche.

### 4 - Risultato del saggio

Il campione in esame è giudicato accettabile se, al termine della prova, sopravvivono 5 o più animali. Se nella vasca di controllo si è registrato anche un solo decesso la prova va ripetuta.

## 8020 - METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON *DAPHNIA*

### 1 - Materiali e strumentazione per il saggio

I materiali si riducono di fatto ad una serie di recipienti aventi un volume utile di 50 mL. Per la valutazione della tossicità di sostanze volatili i recipienti devono poter essere ermeticamente chiusi. Come ogni altro oggetto destinato ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento o con i campioni da saggiare, non devono dar luogo a processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possano interferire con il saggio. A questo fine vengono utilizzati recipienti in vetro borosilicato o in plastiche fluorate.

Durante il saggio non è infrequente che alcuni animali si portino in superficie e, per ragioni di tensione superficiale o di adesione di bollicine d'aria alle strutture corporee, non possono ridiscendere nel liquido sottostante. Se l'inconveniente dovesse porsi con sistematicità, si potrà fare ricorso a reticelle in teflon di circa 1 mm di maglia mantenute sommerse a qualche mm sotto il pelo del liquido mediante un anello in teflon o altra struttura della forma interna dei recipienti usati per la prova.

Le soluzioni poste in questi recipienti devono essere mantenute a temperatura costante (20 °C) e, a tal fine, può essere utilizzato un bagno termostatico o altra soluzione idonea (camera termostatica) che consenta il mantenimento della temperatura dei liquidi in esame nell'ambito di  $20 \pm 2$  °C.

Il saggio viene eseguito in condizioni alterne di luce (16 ore) e di buio (8 ore) e, a tal fine, occorre disporre di una camera oscurabile e di un sistema di lampade fluorescenti (resa cromatica  $\geq 90$ ) che dia una illuminazione attenuata (circa 300 lux) al piano di lavoro. È opportuno che il sistema sia fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.

Oltre a questi materiali, l'esecuzione del saggio richiede la disponibilità della normale apparecchiatura di laboratorio. Richiede inoltre un misuratore di ossigeno disciolto il cui sensore abbia dimensioni tali

da permettere il rilevamento nei contenitori utilizzati per il saggio.

### 2 - Reagenti e acqua di diluizione

La preparazione delle soluzioni e la diluizione vengono effettuate con acqua che deve rispondere alle seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5; alcalinità 110-120 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  e durezza 140-160 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  e che si prepara nel seguente modo: a un litro di acqua deionizzata o distillata passata su colonna di carbone attivo vengono aggiunti, nell'ordine, 10 mg di KCl, 192 mg di  $\text{NaHCO}_3$ , 53 mg di  $\text{MgSO}_4$  e 183 mg  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Questa soluzione presenta le caratteristiche di pH, alcalinità e durezza sopra indicate e deve essere aerata per 24 ore prima del suo impiego, alla temperatura di 20 °C, con aria compressa priva di contaminanti.

### 3 - Organismi per il saggio

L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna* Straus, che può essere ottenuto dai laboratori di idrobiologia o di tossicologia acquatica. Per i saggi vengono utilizzati i neonati di età inferiore alle 24 ore. A questo scopo, prima dell'allestimento del saggio viene individuato nelle vasche di allevamento e isolato in acqua di diluizione, un numero adeguato di femmine adulte (4-5 mm di lunghezza corporea) prossime al parto, riconoscibili per il colore aranciato delle uova presenti nella camera di incubazione. Sono da scartare colture in riproduzione sessuata, con elevata mortalità, bassa natalità o con altri sintomi evidenti di condizioni culturali non adeguate. Queste femmine, quando rispondono ai suddetti requisiti di idoneità, potranno deporre un numero di neonati ciascuna, generalmente compreso tra 20 e 50.

**METODO A - Valutazione della EC<sub>50</sub>**

a) La soluzione del prodotto da esaminare va preparato utilizzando come solvente l'acqua standard debitamente aerata. Ai fini di una corretta conduzione del saggio è consigliabile acquisire alcune informazioni essenziali sui prodotti in esame, quali la solubilità in acqua e la tensione di vapore. Nel caso di tossici poco solubili sono da privilegiare i metodi di dispersione meccanica rispetto all'impiego di sostanze solubilizzanti. Qualora l'impiego di queste ultime si renda necessario, sono da utilizzare quelle a minore tossicità per la *Daphnia*. In ogni caso nella valutazione dei risultati va tenuto conto che questi possono essere dovuti all'azione combinata della sostanza in esame e dell'agente solubilizzante.

b) Per la valutazione della EC<sub>50</sub> di effluenti occorre disporre di un volume di almeno 1 L di campione. Se la prova viene allestita entro 6 ore, il campione non va refrigerato a 4 °C, necessità che invece si pone se la prova viene effettuata entro 48 ore dal prelievo. Si consiglia, tuttavia, l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile.

c) Il prodotto o l'effluente in esame vengono saggiati in un primo momento con una prova preliminare e successivamente con una prova definitiva. La prova preliminare si effettua operando con 5 diverse concentrazioni o diluizioni e una sola replica per ciascuna di esse. Il numero di contenitori necessari in questo caso è quindi sei, di cui uno di controllo con il solo liquido diluente. Queste concentrazioni di prodotto in esame o diluizioni di effluente, vengono scelte in progressione geometrica. Nel caso di effetti tossici del tutto ignoti, si può procedere secondo un fattore 10 e la serie delle 5 concentrazioni o diluizioni può essere indicativamente la seguente: 0,01-0,1-1-10-100 mg/L di prodotto o % (v/v) di effluente.

d) Individuato l'ambito di tossicità, viene allestita la prova definitiva, effettuata con quattro repliche e secondo una serie ad intervalli meno ampi (ad es. 0,1-0,4-0,8-1,6). Il numero di contenitori necessari in questo caso è 24, di cui 20 verranno usati per saggiare in quadruplo le 5 concentrazioni o diluizioni e 4 per la

prova di controllo con la sola acqua di diluizione. Nel caso di tossici volatili dovranno essere usati contenitori a chiusura ermetica e completamente riempiti. Il volume di questi recipienti deve essere tale che l'ossigeno disciolto, al termine della prova, non risulti inferiore a 2 mg/L.

e) In tutti i casi in cui sia possibile, è consigliato il controllo analitico delle concentrazioni del tossico in esame. Se lo scostamento tra la concentrazione misurata e quella nominale è superiore al 20%, i risultati del saggio dovranno essere basati sulla concentrazione misurata.

f) In ogni contenitore vengono trasferiti 50 mL della soluzione in esame.

g) In ciascuno dei 24 recipienti vengono quindi trasferiti 5 neonati di dafnia. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta in vetro dal diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le dafnie al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è opportuno che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei diversi recipienti fino a raggiungere il numero di 5, anziché completare un recipiente per poi passare al successivo.

h) A trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare il fotoperiodo al quale gli animali sono stati allevati.

i) Durante questo periodo agli animali non viene somministrata alcuna alimentazione.

l) Al termine del saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.

m) Se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%, il saggio va ripetuto.

n) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione dell'ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando le soluzioni in esame durante le 24 ore della prova, oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenza o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.

o) Con i dati raccolti nella prova a 24 ore può essere calcolata la 24hEC<sub>50</sub> (in mg/L oppure in % di diluizione) e i rispettivi limiti fiduciali. La condizione necessaria per questi calcoli è che vi siano almeno due casi di parziale immobilizzazione (diversi cioè da 0 e 100%) e prossimi, possibilmente, al 50%. Se questa condizione non è raggiunta si può fare ricorso ad altri metodi di calcolo oppure si può ripetere la prova operando in un ambito più idoneo di concentrazioni.

p) Il saggio può essere prolungato per la valutazione della EC<sub>50</sub> a 48 ore. A tal fine si procede al rinnovo delle 24 soluzioni con soluzioni fresche (ricorrendo, nel caso di un effluente, al campione refrigerato) nelle quali vengono trasferiti gli animali che già hanno soggiornato per 24 ore nelle soluzioni a concentrazione o diluizione corrispondente.

q) La procedura, le cautele ed i criteri per la seconda parte della prova sono gli stessi già descritti.

r) Al termine della prova può essere calcolata la 48hEC<sub>50</sub> seguendo i criteri indicati.

#### **METODO B - Valutazione della accettabilità di un effluente**

a) Il campione di circa 300 mL di effluente di cui deve essere valutata l'accettabilità, va utilizzato entro le 24 ore dalla raccolta e conservato alla temperatura di 4 °C. Si consiglia l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di

entità non prevedibile. In ogni caso è opportuno che il campione venga suddiviso in due aliquote di almeno 150 mL di cui una verrà utilizzata per il saggio e l'altra potrà tornare utile per ulteriori prove.

b) Eventuali solidi galleggianti vanno rimossi per filtrazione su lana di vetro o su rete di teflon a maglie di circa 1 mm.

c) Si procede quindi alla regolazione della temperatura del campione prima del suo trasferimento nei recipienti per il saggio (20 ± 2 °C).

d) Per il saggio si predispongono sei recipienti di cui tre contenenti ciascuno 25 mL di effluente più 25 di acqua di diluizione e tre 50 mL di sola acqua di diluizione utilizzata come controllo.

e) In ciascuno dei sei recipienti vengono trasferiti 10 neonati di dafnia. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta di vetro del diametro di 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le dafnie al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è consigliabile che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei sei recipienti fino a raggiungere il numero di 10, anziché completare un recipiente per poi passare al successivo.

f) A trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare i tempi di illuminazione ai quali gli animali sono stati allevati.

g) Durante le 24 ore della prova gli animali non vengono alimentati.

h) Al termine della saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche



dopo leggera agitazione del contenitore.

i) Il saggio va ripetuto se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%.

l) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione di ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando il liquido in esame durante le 24 ore della prova oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenze o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.

m) Il giudizio di accettabilità del campione in esame viene dato quando al termine delle 24 ore la somma degli organismi immobili dei tre recipienti contenenti il campione in esame, risulta inferiore o uguale al 50%; se è superiore il campione viene giudicato inaccettabile.

## APPENDICE 1

### ALLEVAMENTO DI *DAPHNIA MAGNA*

#### 1 - Strumentazione

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio sono necessari:

- un sistema di illuminazione che consenta di ottenere 1000 lux a livello delle vasche (lampade fluorescenti con indice di resa cromatica  $\geq 90$ ) fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- un sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di  $20 \pm 2$  °C;
- un sistema di aerazione a bassa portata e pressione fornito di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario;
- un misuratore di ossigeno disciolto;
- una camera di conta e microscopio o contatore

automatico di particelle;

- vasche in tutto vetro con una capacità di circa 5 L.

Tutti gli accessori destinati ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche. Vetro borosilicato e plastiche fluorurate sono da preferire in tutti i casi in cui sia possibile.

#### 2 - Acqua

Per l'allevamento della daphnia le acque di rete non clorate, di falda o di un corpo idrico superficiale sono tutte potenzialmente utilizzabili purché non contaminate. Sono da preferire quelle che presentano una sufficiente stabilità delle caratteristiche chimico fisiche.

Qualunque sia l'acqua prescelta, l'aerazione per 24 ore ed un trattamento con carbone attivo, preceduti nel caso di acque superficiali da filtrazione su membrane di 0,22  $\mu\text{m}$ , assicurano un netto miglioramento della qualità. Se necessario, l'acqua trattata va corretta in alcuni dei suoi costituenti maggiori per ottenere approssimativamente una durezza di 150 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , un rapporto  $\text{Ca/Mg}=4$  e  $\text{Na/K}=10$ . La diluizione viene effettuata con acqua deionizzata o distillata, filtrata su carbone attivo, o con acqua Milli Q, mentre gli aumenti di concentrazione si ottengono per aggiunta di sali di grado analitico (es.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KCl}$ , ecc.).

L'acqua così preparata va saggiata per verificare l'idoneità all'allevamento di *Daphnia magna*. A questo scopo si utilizza un gruppo di almeno dieci organismi, di età inferiore alle 24 ore, mantenuti in 500 mL di acqua ed alle condizioni previste per l'allevamento. Ogni 48 ore si provvede al trasferimento in altri 500 mL di mezzo fresco, all'aggiunta di cibo nelle quantità indicate ed alla conta, previa rimozione, dei dafnidi prodotti.

La prova ha una durata di circa 14 giorni, corrispondenti a tre schiuse. Le condizioni di idoneità dell'acqua di allevamento si hanno se:

- la prima schiusa avviene entro il nono giorno;
- il numero medio complessivo di neonati per femmina dopo tre chiuse è superiore a 20 e preferibilmente prossimo a 60;

- se la mortalità non supera il 20%.

Il prolungamento della prova oltre la terza schiusa è comunque consigliabile offrendo maggiori garanzie di idoneità.

### 3 - Termoregolazione

La temperatura per il mantenimento di *Daphnia magna* è di  $20 \pm 2$  °C.

### 4 - Illuminazione

Le vasche di allevamento vengono illuminate, con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

### 5 - Ossigenazione

Nelle vasche di allevamento viene mantenuta una concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 6 mg/L insufflando aria mediante dei diffusori. Quest'aria può contenere contaminanti che vanno rimossi per passaggio su cartuccia di carbone attivo o altro materiale adsorbente.

### 6 - Alimentazione e mantenimento

La dieta per il mantenimento in coltura di *Daphnia magna* è costituita da due organismi unicellulari, l'alga verde *Selenastrum capricornutum* e il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Sia la sospensione algale che quella di lievito vengono somministrate quotidianamente in quantità tali da assicurare una densità nelle vasche di allevamento di circa 300.000 cellule/mL per ciascuno dei due organismi. La somministrazione può avere luogo a giorni alterni e, in questo caso, i volumi delle sospensioni cellulari vanno raddoppiati. Il permanere della torbidità del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale rinviare la somministrazione del cibo.

Il rinnovo parziale o bisettimanale dell'acqua delle vasche come pure il controllo della densità ad un massimo di circa 100 individui/L costituiscono condizioni necessarie per una corretta conduzione dell'allevamento. A questo fine occorre inoltre effettuare il trasferimento periodico (15-20 giorni) di alcuni organismi, in attiva riproduzione partenogenetica, ad una

vasca contenente cibo e mezzo freschi.

È consigliabile mantenere contemporaneamente almeno due vasche, evitando in tal modo che un qualsiasi inconveniente comporti la perdita dell'organismo. L'allestimento di queste vasche è utile che sia sfalsato di alcuni giorni al fine di disporre in modo pressoché continuo dei dafnidi necessari alla sperimentazione.

### 7 - Coltura algale

La cloroficea *Selenastrum capricornutum* viene allevata in un mezzo di coltura allestito con le seguenti modalità. Si preparano quattro soluzioni in acqua bidistillata o Milli Q filtrata su membrana da  $0,22 \mu\text{m}$  dei sali di seguito elencati:

1 -	NaNO <sub>3</sub>	25,500 g/L
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12,164 g/L
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,410 g/L
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185,520 mg/L
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	415,380 mg/L
	ZnCl <sub>2</sub>	3,270 mg/L
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,428 mg/L
	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,012 mg/L
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,260 mg/L
	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	160,000 mg/L
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	300,000 mg/L
2 -	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,700 g/L
3 -	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,044 g/L
4 -	NaHCO <sub>3</sub>	15,000 g/L

Il mezzo di coltura è ottenuto diluendo 2 mL di ciascuna soluzione al volume finale di 1 litro, con acqua bidistillata o Milli Q filtrata su  $0,22 \mu\text{m}$ . Il mezzo viene inoculato in modo da ottenere una densità iniziale di circa 200.000 cellule/mL. Le alghe vengono incubate a  $20 \pm 2$  °C e con una illuminazione di circa 4000 lux fornita da lampade fluorescenti cool-white con fotoperiodo di 16 ore di luce.

La sospensione algale è mantenuta in agitazione continua insufflando aria filtrata e, dopo 5-6 giorni di incubazione, raggiunge di norma una densità prossima ai 9-10 milioni di cellule/mL. La biomassa algale viene separata dai residui del mezzo di coltura mediante centrifugazione (400 RCF per 5-10 min.). Il soprannatante viene scartato e le alghe ridisperse in acqua di allevamento con durezza ridotta a 30-50 mg CaCO<sub>3</sub>/

L. Si fa seguire una seconda centrifugazione e quindi si procede alla raccolta delle alghe.

Le cellule, risospese nello stesso tipo di acqua usata per i lavaggi in modo da ottenere una densità d'impiego che è di circa 100 milioni di cellule/mL, sono conservabili al buio ed alla temperatura di 4 °C. In tali condizioni le cellule algali si mantengono vitali per oltre 30 giorni e potranno essere utilizzate per inoculare la coltura successiva.

### 8 - Sospensione di lievito

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, reperibile in confezioni commercializzate per la panificazione, viene disperso in acqua di durezza 30-50 mg CaCO<sub>3</sub>/L ottenuta per miscelazione dell'acqua di allevamento con bidistillata o Milli Q. La densità di impiego è di circa 100 milioni di cellule/mL. Anche la sospensione di lievito è conservabile al buio ed alla temperatura di 4 °C.

### 9 - Idoneità degli organismi

È opportuno verificare periodicamente le condizioni generali di allevamento. A questo fine si può ricorrere all'esame visivo del contenuto lipidico degli organismi, indice lipidico, come pure ad una sostanza tossica di riferimento. Per quest'ultima si propone il bicromato di potassio di cui si determina la 24hEC<sub>50</sub> nelle condizioni sperimentali indicate dal metodo.

## APPENDICE 2 CALCOLO DELLA EC<sub>50</sub>

Vengono proposti tre metodi per il calcolo della EC<sub>50</sub> e dei relativi limiti fiduciali. La corretta applicazione del primo metodo richiede che i risultati del saggio comprendano almeno due effetti parziali, diversi cioè da immobilizzazione 0 e 100%, quantunque esso possa fornire una stima della EC<sub>50</sub> e dei limiti di confidenza anche con un solo risultato parziale. Il secondo metodo viene utilizzato in assenza di effetti intermedi fra 0 e 100% e quando non siano necessarie particolari informazioni sulla relazione concentrazione/effetto del tossico in esame. È proposto infine un terzo metodo di calcolo, disponibile come programma

per personal computer, la cui applicabilità necessita di almeno due risultati parziali.

### 1. Litchfield e Wilcoxon (metodo semplificato)

#### RETTE CONCENTRAZIONE/EFFETTO

Si tabulano le concentrazioni e le percentuali (v/v) di effluente saggiate e le corrispondenti percentuali cumulative di organismi immobilizzati (=100 x n/20). Non si considerano più di due concentrazioni consecutive che hanno causato la completa immobilizzazione (100%) e parimenti non più di due che hanno determinato effetto nullo (0%).

Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su carta logaritmo-probabilistica le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle concentrazioni corrispondenti. Queste ultime sono riportate sulla scala logaritmica e gli effetti sulla scala delle ordinate. Si traccia la retta che approssima i punti ottenuti, privilegiando quelli compresi fra il 40 e il 60% di effetto. Utilizzando la retta si leggono e si tabulano gli effetti attesi per ciascuna delle concentrazioni saggiate, scartando quelle il cui effetto atteso risulti inferiore a 0,01 o superiore a 99,99. Il grafico viene completato rappresentando anche le concentrazioni che hanno prodotto effetto 0 e 100%. A questo scopo si legge sulla retta tracciata l'effetto atteso per tali concentrazioni e si riporta in grafico il corrispondente valore corretto secondo le indicazioni della Tab. 1.

Se la retta ottenuta risultasse insoddisfacente si traccia una nuova retta e si ripetono i passaggi descritti.

#### TEST DEL CHI<sup>2</sup>

Si calcolano e si tabulano le differenze tra i valori osservati (o corretti) ed i valori attesi. Mediante il nomogramma di Fig. 1, per ciascuna differenza viene determinato e tabulato il corrispondente contributo al Chi<sup>2</sup>. Si sommano poi i singoli contributi e si moltiplica il totale per il numero medio di animali saggiati per concentrazione, calcolando a questo scopo, il rapporto fra il numero complessivo di organismi usati per le sole concentrazioni riportate in grafico e il numero delle medesime (=K).

Il dato così ottenuto rappresenta il valore del

Tab. 1 - Valori corretti per effetto 0 e 100%. Es.: Ad un valore atteso di 98,6% corrispondente un valore corretto di 99,5%.

Atteso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0.3	0.7	1.0	1.3	1.6	2.0	2.3	2.6	2.9
10	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	4.9	5.2	5.5	5.7
20	6.0	6.2	6.5	6.7	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.1
30	8.3	8.4	8.6	8.8	9.0	9.2	9.3	9.4	9.6	9.8
40	9.9	10.0	10.1	10.2	10.3	10.3	10.4	10.4	10.4	10.5
50	-	89.5	89.6	89.6	89.6	89.7	89.7	89.8	89.9	90.0
60	90.1	90.2	90.4	90.5	90.7	90.8	91.0	91.2	91.4	91.6
70	91.7	91.9	92.2	92.4	92.6	92.8	93.0	93.3	93.5	93.8
80	94.0	94.3	94.5	94.8	95.1	95.3	95.6	95.9	96.2	96.5
90	96.8	97.1	97.4	97.7	98.0	98.4	98.7	99.0	99.3	99.7

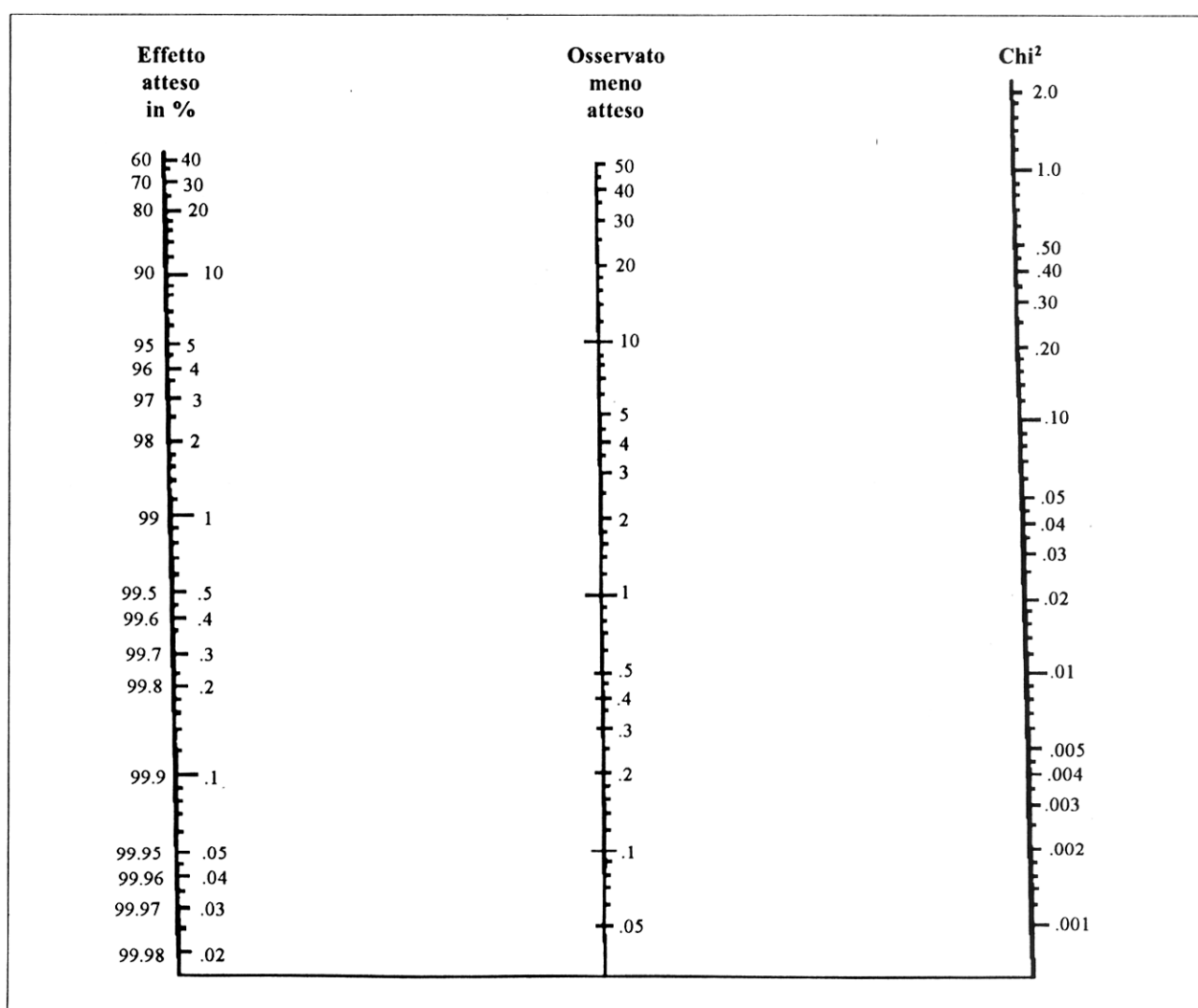


Fig. 1 - Nomogramma dei contributi al Chi<sup>2</sup>. La retta che congiunge il valore ottenuto dalla differenza tra l'effetto osservato e quello atteso con il corrispondente effetto atteso indica, nel punto di intersezione con la scala del Chi<sup>2</sup>, il contributo cercato.

Chi<sup>2</sup> della retta in esame. Il numero dei gradi di libertà è dato dal numero di concentrazioni rappresentate in grafico diminuito di due unità (G.L.=K-2). Se il Chi<sup>2</sup> della retta è inferiore al valore riportato in Tab. 2 per n gradi di libertà, significa che la retta tracciata approssima in modo soddisfacente i risultati sperimentali. In caso contrario si traccia una nuova retta che possa approssimare meglio i dati ottenuti e si ripete l'esame descritto.

Tab. 2 - Valori di Chi<sup>2</sup> (P=0,05)

Gradi di libertà (G.L.)	Chi <sup>2</sup>
1	3.84
2	5.99
3	7.82
4	9.49
5	11.1
6	12.6
7	14.1
8	15.5
9	16.9
10	18.8

#### EC<sub>50</sub> E LIMITI FIDUCIALI

Il valore di EC<sub>50</sub> (24 o 48h) è letto sulla scala logaritmica del grafico della retta, in corrispondenza all'effetto del 50%.

Mediante il grafico della retta si individuano le concentrazioni ad effetto 16 e 84% (EC<sub>16</sub>; EC<sub>84</sub>) e si calcola il valore della funzione S secondo la seguente espressione:

$$S = \frac{\left[ \left( \frac{EC_{84}}{EC_{50}} \right) + \left( \frac{EC_{50}}{EC_{16}} \right) \right]}{2}$$

Si determina il valore di N che rappresenta il numero complessivo di organismi saggati alle concentrazioni il cui effetto atteso è compreso fra 16 e 84% e si procede al calcolo del fattore "f" mediante la seguente espressione:

$$f_{EC50} = S \left( \frac{2.77}{\sqrt{N}} \right)$$

dove S e N hanno il significato già illustrato. I limiti fiduciali della EC<sub>50</sub> al 95% di probabilità si ottengono come segue:

$$\begin{aligned} \text{limite superiore} &= EC_{50} \cdot f_{EC50} \\ \text{limite inferiore} &= EC_{50} / f_{EC50} \end{aligned}$$

## 2- Media geometrica

### CALCOLO DELLA EC<sub>50</sub>

In assenza di risultati parziali la EC<sub>50</sub> può essere calcolata come segue:

$$EC_{50} = \sqrt{A \cdot B}$$

dove A è la massima concentrazione che non ha causato immobilizzazione (effetto 0%) e B è la minima che ha determinato la completa immobilizzazione degli organismi saggati (effetto 100%).

### LIMITI FIDUCIALI

Le due concentrazioni A e B rappresentano i limiti fiduciali della EC<sub>50</sub> con un livello di probabilità che dipende dal numero medio di organismi utilizzato per concentrazione (N). Il livello di probabilità associato ad A e B è calcolato con la seguente espressione:

$$P = 100 \cdot \left[ 1 - 2 \left( \frac{1}{2} \right)^N \right]$$

Con 20 organismi per concentrazione, come previsto dalla presente metodologia di saggio, il livello di probabilità associato ai limiti fiduciali A e B è superiore al 99,99%.

## 3 - Analisi dei probits

Questo terzo metodo è proposto come programma per personal computer con sistema operativo DOS versione 3.0 o successiva (Puddu, 1989).

Partendo dai risultati sperimentali, che devono comprendere due effetti intermedi tra 0 e 100%, il programma fornisce la EC<sub>50</sub> e la EC<sub>1</sub> con i relativi limiti fiduciali più una serie di informazioni sulla retta di regressione probit e sull'analisi statistica effettuata.



**BIBLIOGRAFIA**

- A.P.H.A., AWWA e WEF (1992): "Toxicity test procedure for *Daphnia* (tentative)". In: *Standard methods for the examination of water and wastewater*, XVIII Edition, Part 804 B, 739-742, (APHA, Washington).
- ASTM (1984): "Standard practice for conducting static acute toxicity test on wastewaters with *Daphnia*". American Society for Testing and Materials, E 4229-84.
- ISO (1982): "Water quality - Determination of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)". International Organisation of Standardisation, ISO 6341.
- MARCHETTI R. e VIGANÒ L. (1991): "Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*". In saggio di tossicità con *Daphnia*. *Quad. Ist. Ric. Acque*, **93**, 2.1-2.23.
- OECD (1984): "*Daphnia sp.*, acute immobilisation test and reproduction test". Guideline n. 202. In: *OECD Guidelines for testing of chemicals*, Effects on biotic systems, ISBN 92-64-12221-4.
- PUDDU A. (1989): "Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei Probits". *Notiz. Metodi Anal. Acque IRSA*, **9** (2), 19-37.
- VIGANÒ L. (1991): "Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-772.
- VIGANÒ L. (1993): "Reproductive strategy of *Daphnia magna* and toxicity of organic compounds". *Wat. Res.* **27**, 903-909.

### **NOTA DELLA REDAZIONE DI BIOLOGIA AMBIENTALE**

*Si suggerisce di considerare la presente stesura del capitolo 8020 alla luce di quanto espresso nell'introduzione dell'articolo di Marchetti e Viganò «Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*» pubblicato sul Quaderno dell'Istituto di Ricerca sulle Acque n. 93/1991 dal titolo **Saggio di Tossicità con *Daphnia***. Si consiglia pertanto di valutare l'accettabilità degli effluenti adottando sia le condizioni operative derivate dalla vigente normativa (campione diluito 1:1, motilità almeno 50%), sia quelle che assicurano al parametro "saggio di tossicità" un maggior livello di protezione (campione tal quale, motilità almeno 90%).*

*Ciò consentirà di creare un archivio di dati sul quale confrontarsi in sede di riformulazione legislativa del parametro "Saggio di tossicità".*