

DETERMINAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI*

0. Generalità e definizioni

Escherichia coli è stato descritto per la prima volta nel 1885 da Theodor Escherich col nome di *Bacterium coli*. Il microrganismo, bastoncello gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno, fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è inserito nel gruppo dei coliformi. Secondo la tradizionale classificazione, la specie produce indolo in terreni al triptofano ed è lattosio-fermentante distinguendosi dai coliformi non termotolleranti per la crescita alla temperatura di 44°C. Nell'ambito del gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ampiamente rappresentato ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, a differenza dei microrganismi di origine non necessariamente fecale, appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* e alle tante specie di coliformi psicrotrofi che si caratterizzano per uno spiccato potenziale di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità da oltre un decennio ha riconosciuto la specie *E. coli* come indicatore primario di contaminazione fecale delle acque. Gli studi dell'US EPA hanno inoltre contribuito ad avvalorare la necessità di sostituire, per la valutazione della qualità delle acque, il parametro coliformi fecali con quello di *Escherichia coli*. La scelta, motivata dalla netta predominanza di *E. coli* rispetto agli altri coliformi nel materiale fecale e dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei batteri patogeni enterici, è stata ormai accreditata da tutta la comunità scientifica internazionale. Tuttavia, i metodi più classici utilizzati per il suo rilevamento, inadeguati per laboriosità e lunghezza d'esecuzione, poiché non formulati per la sua selezione ma per il rilevamento dell'intero gruppo dei coliformi, comportano lunghi tempi per l'acquisizione della risposta. Oltre a ciò, come per i coliformi, è stata confermata l'ipotesi che parte dei biotipi di *E. coli* presenti nelle acque non sono in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura. Inoltre, alcuni non sono né termotolleranti, né producono indolo in terreni contenenti triptofano. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale di *E. coli*, intorno al 98%, e con l'eccezione dei sierotipi O157:H7, possiede l'enzima β -D-glucuronidasi.

Negli ultimi anni sono stati quindi formulati substrati, in numero sempre crescente, per la ricerca diretta di *Escherichia coli*, tutti basati, non più sulla tradizionale reazione della fermentazione del lattosio, bensì sul rilevamento dell'attività enzimatica della β -D-glucuronidasi, evidenziabile dall'idrolisi di β -glucuronidi cromogeni o fluorogeni con rilascio di composti colorati o fluorescenti. L'introduzione di metodi analitici che sfruttano questa specifica caratteristica, eliminando spesso la necessità di svolgere prove di conferma, permette di ottenere risultati in tempi più rapidi e di giungere con maggiore accuratezza alla determinazione del microrganismo ricercato.

Per i parametri microbiologici, a differenza dei parametri chimici, la Direttiva Europea 98/83/CE stabilisce i metodi analitici. Tuttavia, fornisce anche agli Stati Membri la possibilità di affiancare ai metodi di riferimento stabiliti nell'Allegato III, punto 1, metodi aggiuntivi, almeno equivalenti, da utilizzare in alternativa a quelli indicati dalla legge, individuati in conformità a specifiche procedure e comunque sottoposti ad approvazione. In questo ambito, i risultati derivati dallo studio comparativo organizzato dalla Sottocommissione Metodi del Ministero della Salute - Gruppo Metodi Microbiologici e Biologici dell'Istituto Superiore di Sanità, hanno dimostrato che, oltre al metodo indicato nell'Allegato III (ISO 9308-1), per il parametro *Escherichia coli*, può essere utilizzato, quale metodo ufficiale di riferimento, anche quello di seguito indicato.

Nelle acque destinate al consumo umano è prescritta l'assenza obbligatoria di *Escherichia coli* in relazione al suo ruolo di indicatore primario di contaminazione fecale. Il superamento del valore parametrico (*E. coli* 0 in 100 o 250 mL) costituisce una non conformità al valore stabilito dal Decreto legislativo n. 31 del 2001.



1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche vengono utilizzate per la determinazione di *Escherichia coli* nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano e nelle acque ad uso ricreativo (piscine).

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo 1

2.1.1. Principio del metodo

Metodo miniaturizzato MPN (Most Probable Number) a multi-pozzetto, Defined Substrate Technology (DST®). Il metodo consente di determinare la concentrazione di *Escherichia coli* in un determinato volume di acqua. È applicabile all'analisi di acque poco o mediamente contaminate, anche disinfettate e di piscina, e comunque ad acque contenenti *Escherichia coli* danneggiati.

Il metodo permette di determinare simultaneamente e direttamente la concentrazione di *Escherichia coli* e di coliformi in campioni di acqua tramite una stima statistica calcolata in funzione del numero di pozzetti positivi e negativi ottenuti aggiungendo 100 mL di campione al substrato di crescita. Il risultato può essere ricavato dall'apposita tabella già predisposta. Dopo un periodo di incubazione di circa 18 ore a $36\pm 1^\circ\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati. *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide, produce fluorescenza nei pozzetti gialli quando esposti ad una lampada a luce ultravioletta. Contemporaneamente, la presenza di coliformi viene evidenziata dalla colorazione gialla che appare nei pozzetti dovuta all'idrolisi dell'O-nitrofenil- β -D-galattopiranoside.

Il metodo viene riportato dal Manuale Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, sotto il nome di Enzyme Substrate Coliform Test, dall'edizione del 1996. L'Environmental Protection Agency americana (US EPA) ha approvato il metodo e le sue successive modifiche sotto il nome di MMO-MUG test dal 1989. L'AOAC ha approvato il metodo con il nome di Defined Substrate Technology (Colilert). Il Drinking Water Inspectorate inglese e l'Agenzia federale tedesca per l'ambiente hanno approvato il metodo per l'analisi delle acque destinate al consumo umano nel 2002 e nel 2003, rispettivamente.

Il metodo è anche riportato nel Manuale dei Metodi Analitici per le Acque.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1) sono necessari:

Buste a multi-pozzetto Quanti-Tray™

Comparatore di riferimento Quanti-Tray™

Flaconi di plastica con antischiuma (100 mL) oppure flaconi in vetro con chiusura a vite di Schott sterilizzabili in autoclave, sterili

Lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm

Termosigillatrice automatica Quanti-Tray™

2.1.3. Volume da analizzare

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



Versione on-line su sito www.iss.it

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Defined Substrate Technology (DST®)

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

Il terreno si trova anche in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il terreno, prodotto sotto forma granulare, si mantiene 24 mesi dalla data di produzione. Conservare le fiale a 4÷25°C.

Nell'esecuzione dell'analisi seguire le istruzioni della ditta produttrice e attenersi alle comuni norme di sicurezza previste per i laboratori di microbiologia.

Il prodotto è certificato come non tossico.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Miscelazione del campione

Aggiungere il terreno disidratato ad un volume di 100 mL del campione da analizzare. Miscelare con cura e, dopo che la polvere si è completamente sciolta, attendere qualche minuto. Versare la soluzione così ottenuta in una busta a multi-pozzetto Quanti-Tray™. Sigillare la busta inserendola nella termosigillatrice automatica Quanti-Tray™. La busta viene sigillata in 15 secondi.

Incubare a 36±1°C per 18 ore (fino a un massimo di 22 ore). Non sono richieste prove di conferma.

2.1.6. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti gialli che risultano fluorescenti quando esposti alla luce ultravioletta e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa tabella 1.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *E. coli* NCTC 9001 e come controllo negativo *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662; in ogni caso, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come MPN/100 mL; considerare l'eventuale diluizione qualora il campione non sia stato analizzato tal quale.

Nell'evenienza in cui non risultino pozzetti positivi (risultato ottenuto in base alla tabella 1: <1/100 mL), l'analisi va considerata statisticamente equivalente ad un test di P/A (Presenza/Assenza). In questo caso riportare quindi il risultato come 0/100 mL.



Metodi analitici ufficiali per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.Lgs. 31/2001
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria
Reparto di Igiene delle Acque Interne

Versione on-line su sito www.iss.it

È anche da considerare che, qualora si ottenga un valore non intero – caso questo non contemplato dalla legge - si ritiene comunque indispensabile approssimare all'unità il risultato, per difetto quando il valore della parte decimale sia $\leq 0,5$, altrimenti per eccesso. Tuttavia, qualora l'arrotondamento all'intero comporti una non conformità ai valori di parametro, ovviamente di stretta misura, è consigliabile effettuare ulteriori controlli, magari analizzando volumi di campione pari al volume di riferimento, per l'eventuale conferma o smentita del dato in funzione del dettato della legge.



Versione on-line su sito www.iss.it

Tabella 1
Tabella MPN Quanti-Tray® a 51 pozzetti

| N° di pozzetti positivi in un campione da 100 ml | Numero più probabile | Limiti fiduciali del 95% Inferiore | Limiti fiduciali del 95% Superiore |
|--|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 0 | < 1 | 0,0 | 3,7 |
| 1 | 1,0 | 0,3 | 5,6 |
| 2 | 2,0 | 0,6 | 7,3 |
| 3 | 3,1 | 1,1 | 9,0 |
| 4 | 4,2 | 1,7 | 10,7 |
| 5 | 5,3 | 2,3 | 12,3 |
| 6 | 6,4 | 3,0 | 13,9 |
| 7 | 7,5 | 3,7 | 15,5 |
| 8 | 8,7 | 4,5 | 17,1 |
| 9 | 9,9 | 5,3 | 18,8 |
| 10 | 11,1 | 6,1 | 20,5 |
| 11 | 12,4 | 7,0 | 22,1 |
| 12 | 13,7 | 7,9 | 23,9 |
| 13 | 15,0 | 8,8 | 25,7 |
| 14 | 16,4 | 9,8 | 27,5 |
| 15 | 17,8 | 10,8 | 29,4 |
| 16 | 19,2 | 11,9 | 31,3 |
| 17 | 20,7 | 13,0 | 33,3 |
| 18 | 22,2 | 14,1 | 35,2 |
| 19 | 23,8 | 15,3 | 37,3 |
| 20 | 25,4 | 16,5 | 39,4 |
| 21 | 27,1 | 17,7 | 41,6 |
| 22 | 28,8 | 19,0 | 43,9 |
| 23 | 30,6 | 20,4 | 46,3 |
| 24 | 32,4 | 21,8 | 48,7 |
| 25 | 34,4 | 23,3 | 51,2 |
| 26 | 36,4 | 24,7 | 53,9 |
| 27 | 38,4 | 26,4 | 56,6 |
| 28 | 40,6 | 28,0 | 59,5 |
| 29 | 42,9 | 29,7 | 62,5 |
| 30 | 45,3 | 31,5 | 65,6 |
| 31 | 47,8 | 33,4 | 69,0 |
| 32 | 50,4 | 35,4 | 72,5 |
| 33 | 53,1 | 37,5 | 76,2 |
| 34 | 56,0 | 39,7 | 80,1 |
| 35 | 59,1 | 42,0 | 84,4 |
| 36 | 62,4 | 44,6 | 88,8 |
| 37 | 65,9 | 47,2 | 93,7 |
| 38 | 69,7 | 50,0 | 99,0 |
| 39 | 73,8 | 53,1 | 104,8 |
| 40 | 78,2 | 56,4 | 111,2 |
| 41 | 83,1 | 59,9 | 118,3 |
| 42 | 88,5 | 63,9 | 126,2 |
| 43 | 94,5 | 68,2 | 135,4 |
| 44 | 101,3 | 73,1 | 146,0 |
| 45 | 109,1 | 78,6 | 158,7 |
| 46 | 118,4 | 85,0 | 174,5 |
| 47 | 129,8 | 92,7 | 195,0 |
| 48 | 144,5 | 102,3 | 224,1 |
| 49 | 165,2 | 115,2 | 272,2 |
| 50 | 200,5 | 135,8 | 387,6 |
| 51 | > 200,5 | 146,1 | infinito |

2.2. Metodo 2

2.2.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana – Prova normalizzata. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti alla specie *Escherichia coli* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $36\pm 1^\circ\text{C}$ per $18\div 24$ ore, contare le colonie tipiche (*E. coli* presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza alla specie.

Il metodo fa riferimento alla norma UNI EN ISO 9308-1:2002.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1).

2.2.3 Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL (250 mL per l'acqua imbottigliata), è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Terreno di base agarizzato al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio

| Composizione | | |
|---------------------|------|----|
| Lattosio | 20 | g |
| Peptone | 10 | g |
| Estratto di lievito | 6 | g |
| Estratto di carne | 5 | g |
| Blu di bromotimolo | 0,05 | g |
| Agar | 15 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |
| pH $7,2\pm 0,1$ | | |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^\circ\text{C}$ per 15 min. A 1 L di terreno, aggiungere sterilmente 50 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (2.2.4.2.) e 50 mL di soluzione di eptadecilsolfato di sodio (Tergitol 7) (2.2.4.3.), miscelando con cura. In alcune formulazioni il terreno ha già tra i suoi componenti il Tergitol 7; in tal caso aggiungere solamente 50 mL di soluzione di TTC. È preferibile preparare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce. Conservare il terreno a $5\pm 3^\circ\text{C}$ per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.2.4.2. Soluzione di TTC

| | | |
|--|------|----|
| 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) | 0,05 | g |
| Acqua distillata | 100 | mL |

Sciogliere il TTC in acqua distillata e portare al volume di 100 mL. Sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana con pori di dimensioni nominali pari a $0,2\ \mu\text{m}$.

2.2.4.3. Soluzione di eptadecilsolfato di sodio

| | | |
|--|-----|----|
| Eptadecilsolfato di sodio (Tergitol 7) | 0,2 | g |
| Acqua distillata | 100 | mL |

Versione on-line su sito www.iss.it

Sciogliere il Tergitol 7 in acqua distillata e portare al volume di 100 mL. Sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti.

2.2.4.4. Terreno completo

| | | |
|--|------|----|
| Terreno di base (2.2.4.1.) | 1000 | mL |
| Sol. TTC (2.2.4.2.) | 50 | mL |
| Sol. di eptadecilsolfato di sodio (2.2.4.3.) | 50 | mL |

Sciogliere il terreno di base e far raffreddare a $50\pm 5^{\circ}\text{C}$. Rispettando le comuni regole di asepsi, aggiungere la soluzione di TTC e quella di Tergitol 7 (se non già nel terreno di base) e miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Distribuire in capsule di Petri ad uno spessore di almeno 5 mm e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.2.4.5. Agar soia triptone

| Composizione | | |
|------------------|------|----|
| Triptone | 15 | g |
| Peptone di soia | 5 | g |
| Sodio cloruro | 5 | g |
| Agar | 20 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |
| pH $7,2\pm 0,2$ | | |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 min. Distribuire in capsule di Petri ad uno spessore di almeno 5 mm e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.6. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

| Composizione | | |
|--|-----|----|
| N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato | 1 | g |
| Acqua distillata | 100 | mL |

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.2.4.7. Brodo al triptofano

| Composizione | | |
|------------------------------|------|----|
| Digerito triptico di caseina | 10 | g |
| L-triptofano | 1 | g |
| Cloruro di sodio | 5 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |
| pH $7,5\pm 0,2$ | | |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, distribuire in tubi in ragione di 3 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 min. Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Versione on-line su sito www.iss.it

2.2.4.8. Reattivo di Kovacs

| Composizione | | |
|--|----|----|
| <i>p</i> -dimetilaminobenzaldeide | 5 | g |
| Alcool amilico o butilico | 75 | mL |
| Acido cloridrico ($\rho = 1,18$ g/mL) | 25 | mL |

Sciogliere l'aldeide nell'alcool e aggiungere l'acido concentrato.

Utilizzare preferibilmente i prodotti disponibili in commercio per evitare la manipolazione durante la preparazione.

Il prodotto è classificato come preparato pericoloso secondo i criteri descritti nelle Direttive 67/548/CEE (sostanze pericolose) e 1999/45/CE (preparati pericolosi) e nei loro aggiornamenti. È nocivo per inalazione e infiammabile.

Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria, protezione degli occhi e delle mani, protezione della pelle.

Conservare il reattivo, che deve essere di colore dal giallo chiaro al marrone chiaro, a riparo dalla luce diretta a $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di $0,45 \mu\text{m}$ (pori simmetrici da $0,45 \mu\text{m}$ oppure pori asimmetrici da $0,7/0,2 \mu\text{m}$). Porre la membrana sulla superficie del terreno agarizzato al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio (2.2.4.4.) e procedere all'incubazione a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per $18 \div 24$ ore (fino ad un massimo di 48 ore). Per avere indicazioni sulla presenza di eventuale flora interferente è possibile, in aggiunta, filtrare un identico volume di campione su un'altra membrana da porre sulla superficie del terreno al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio (2.2.4.4.) procedendo poi all'incubazione a $(43 \div 44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $18 \div 24$ ore (fino ad un massimo di 48 ore).

2.2.5.2. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione contare tutte le colonie che, cresciute a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, mostrano lo sviluppo di una colorazione gialla nel terreno sotto la membrana (*E. coli* presuntivi). Considerare come orientativa la lettura delle colonie cresciute a 44°C anche in relazione alla eventuale presenza di *E. coli* non termotolleranti.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *E. coli* ATCC 25922 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; in ogni caso, comunque utilizzare colture di riferimento certificati.

2.2.5.3. Prove di conferma

Per la verifica dell'appartenenza alla specie *Escherichia coli* è d'obbligo effettuare la verifica della presenza dell'enzima citocromossidasi e della produzione di indolo su, preferibilmente, tutte o su un numero comunque rappresentativo di colonie tipiche.

È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare le prove di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Agar soia triptone (2.2.4.5.) incubando a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per $18 \div 24$ ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.



Versione on-line su sito www.iss.it

2.2.5.4. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. *Escherichia coli* è citocromossidasi-negativo.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.5.) e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.2.4.6.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica di *E. coli*) si manifesta con mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

2.2.5.5. Prova della produzione di indolo

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile le colonie sospette cresciute sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.5.). Inoculare in tubi contenenti brodo al triptofano (2.2.4.7.) ed incubare a $(43 \div 44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 18÷24 ore.

Dopo incubazione aggiungere alla brodocoltura alcune gocce di reattivo di Kovacs (2.2.4.8.). Una reazione positiva si manifesta entro pochi secondi con lo sviluppo di una colorazione rossa ad anello all'interfaccia. *Escherichia coli* è generalmente indolo-positivo, come anche *Klebsiella oxytoca*, come possono esserlo anche alcuni stipiti di *Citrobacter freundii*.

2.2.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie tipiche risultate citocromossidasi-negative e indolo-positivo, o che l'identificazione biochimica ha confermato come tali, sono *E. coli* confermati.

2.2.7. Espressione dei risultati

La concentrazione di *E. coli* si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL). Qualora si tratti di acque imbottigliate considerare come volume di riferimento 250 mL.

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

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

| | |
|----------------------|--|
| <i>C</i> | numero di colonie che sono state confermate per 100 mL |
| <i>A</i> | numero di colonie confermate |
| <i>B</i> | numero di colonie sottoposte a conferma |
| <i>N</i> | numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana |
| <i>V_t</i> | volume di campione analizzato (in mL) |
| <i>V_s</i> | volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL) |
| <i>F</i> | fattore di diluizione |

2.3. Metodo 3

2.3.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana – Prova rapida. Il metodo viene riportato nella norma UNI EN ISO 9308-1:2002 che stabilisce che lo svolgimento della prova può essere effettuato solo se in parallelo con la prova normalizzata (Metodo 2).

La procedura, da eseguire in singolo o in doppio strato, e comunque in parallelo con la prova normalizzata, prevede un'incubazione della membrana, prima alla temperatura di $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 4÷5 ore, poi alla temperatura di $(43\div 44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 19÷20 ore. Sottoporre successivamente le colonie di *E. coli* presuntivi a conferma.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1).

2.3.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL (250 mL per l'acqua imbottigliata), è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. Agar soia triptone

| Composizione | | |
|------------------|------|----|
| Triptone | 15 | g |
| Peptone di soia | 5 | g |
| Sodio cloruro | 5 | g |
| Agar | 20 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |
| pH $7,2\pm 0,2$ | | |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a $121\pm 3^\circ\text{C}$ per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^\circ\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Il terreno, prima della sterilizzazione, può altrimenti essere distribuito e mantenuto in tubi per lo svolgimento della prova con il doppio strato. Le piastre a doppio strato devono essere preparate al momento dell'uso.

2.3.4.2. Agar bile triptone

| Composizione | | |
|------------------|------|----|
| Triptone | 20 | g |
| Sali di bile | 1,5 | g |
| Agar | 20 | g |
| Acqua distillata | 1000 | mL |
| pH $7,2\pm 0,2$ | | |

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^\circ\text{C}$ per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^\circ\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Versione on-line su sito www.iss.it

2.3.4.3. Reattivo per la verifica della produzione di indolo

| Composizione | | |
|---------------------------|-----|----|
| p-dimetilaminobenzaldeide | 0,5 | g |
| Acido cloridrico | 100 | mL |
| c(HCl)= 1 mol/L | | |

Sciogliere la p-dimetilaminobenzaldeide in acido cloridrico. Utilizzare preferibilmente i prodotti disponibili in commercio. L'uso del preparato, classificato come irritante, richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria, protezione degli occhi e delle mani, protezione della pelle. Conservare il reattivo, che deve essere di colore giallo chiaro, a riparo dalla luce a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.3.5. Procedura

2.3.5.1. Filtrazione

Procedendo in parallelo con il Metodo 2 (2.2.), filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di $0,45\ \mu\text{m}$ (pori simmetrici da $0,45\ \mu\text{m}$ oppure pori asimmetrici da $0,7/0,2\ \mu\text{m}$). Porre la membrana sulla superficie del terreno Agar soia triptone (2.3.4.1.) e procedere all'incubazione a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 4÷5 ore. Quindi, rispettando le dovute regole di asepsi, trasferire la membrana sul terreno Agar bile triptone (2.3.4.2.) e procedere all'incubazione a $(43\div 44 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 19÷20 ore.

In alternativa, ma comunque in parallelo con il Metodo 2 (2.2.), filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa e porre la membrana sulla superficie del terreno Agar bile triptone (2.3.4.2.) su cui sono stati versati, a coprire, alcuni millilitri di Agar soia triptone (2.3.4.1.). Procedere prima all'incubazione a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 4÷5 ore, poi a $(43\div 44 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 19÷20 ore.

2.3.5.2. Prova di conferma per la produzione di indolo

Per la verifica dell'appartenenza alla specie *Escherichia coli* è d'obbligo effettuare la verifica della produzione di indolo.

Entrambe le procedure, a singolo e doppio strato, richiedono, alla fine del periodo di incubazione, il trasferimento della membrana da saggiare su un dischetto imbevuto del reattivo (2.3.4.3.). Entro alcuni minuti, lo sviluppo di un alone rosso intorno alle colonie fornisce una reazione positiva. *Escherichia coli* è generalmente indolo-positivo, come anche *Klebsiella oxytoca*, come possono esserlo anche alcuni stipiti di *Citrobacter freundii*. L'esecuzione della prova così come descritta dalla norma UNI EN ISO 9308-1:2002 è sconsigliata quando sono presenti troppe colonie sulla membrana. Infatti, l'eventuale diffusione della colorazione rossa su tutta la membrana può causare interferenze tra colonie contigue e quindi comportare difficoltà nell'interpretazione dei risultati.

2.3.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie tipiche indolo-positive sono da considerare *E. coli* confermati.

2.3.7. Espressione dei risultati

La concentrazione di *E. coli* si calcola confrontando i risultati ottenuti dall'analisi effettuata in parallelo con la prova normalizzata (Metodo 2). Il numero di *E. coli* è quindi pari al numero di colonie confermate che è risultato più alto comparando i conteggi ottenuti con i due metodi (Metodo 2 e Metodo 3).



Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington D.C.: 1996.
2. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International*: 1995.
3. Briancesco R, Coccia AM, Della Libera S, Semproni M e Bonadonna L. Nuovi orientamenti normativi per il controllo delle acque: la ricerca di *Escherichia coli*. *Ig Sanità Pubbl* 2000;LVI: 85-94.
4. Drinking Water Inspectorate. *The Microbiology of Drinking water. – Part 4 – Methods for the isolation and enumeration of coliform bacteria and Escherichia coli - Report 71: 2002.*
5. *Metodi Analitici per le Acque*. APAT/IRSA-CNR. Volume terzo, 29/2003. Roma, 2003.
6. UNI EN ISO 9308-1:2002. *Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di Escherichia coli e batteri coliformi - Metodo di filtrazione su membrana.*
7. USEPA. *National Primary Drinking Water Regulation. Federal Register; Total Coliforms (including Fecal Coliforms and E. coli)*. Final Rule 1989; 54:27556. .