



DETERMINAZIONE DEI BATTERI COLIFORMI A 37 °C

0. Generalità e definizioni

I coliformi, inclusi nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, sono batteri a forma di bastoncino, gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni. Poiché presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10^9 UFC/g, sono stati considerati, per decenni, insieme agli streptococchi fecali, indicatori di contaminazione delle acque. Tuttavia, è ormai ampiamente riconosciuto negli ambienti scientifici che nel gruppo sono comprese specie ambientali, in grado di colonizzare acqua, suolo e vegetazione. L'ampia diffusione nell'ambiente dei microrganismi appartenenti al gruppo ne ha quindi ridimensionato il ruolo e il significato nelle acque e contrasta nettamente con i requisiti specifici richiesti ad un indicatore di contaminazione fecale.

Gli studi più recenti distinguono i microrganismi inclusi sotto questo termine in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano i coliformi di origine fecale da quelli di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione.

L'appartenenza al gruppo dei coliformi, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di $(35 \div 37)$ °C in 48 ore. Tuttavia, negli ultimi anni si è andata confermando la nozione che dei coliformi presenti nelle acque, una percentuale relativamente elevata non sia in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura e, soprattutto, che i test più classici, come l'IMVIC (Indolo, Rosso Metile, Voges Proskauer, Citrato), non hanno nessun valore discriminante per l'identificazione di *Klebsiella pneumoniae*, di *Enterobacter cloacae* e delle molte specie ambientali. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale, intorno al 99%, possiede l'enzima β -D-galattosidasi. Negli ultimi anni, sulla base di questo principio, sono stati elaborati nuovi metodi che possono rappresentare un'alternativa interessante in rapporto alle tecniche colturali classiche. Utilizzano, infatti, substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni, e che si basano sullo sfruttamento di questa specifica attività enzimatica.

Nel Decreto Legislativo 31/2001, recepimento della Direttiva Europea 98/83/CE, il parametro batteri coliformi a 37 °C è riportato nella Parte C (parametri indicatori) dell'Allegato I. In relazione al diverso significato attribuito al gruppo, i coliformi vengono quindi considerati indicatori di qualità e di efficienza di trattamento dell'acqua. Il superamento del loro valore di parametro è tollerato fermo restando quanto stabilito nell'art. 14 del decreto e può essere segnalato come "inosservanza" del valore parametrico.

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 batteri coliformi a 37 °C, possono essere utilizzati, quali metodi ufficiali di riferimento, anche quelli di seguito indicati.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche vengono utilizzate per il rilevamento di batteri coliformi a 37 °C nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano.



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 batteri coliformi a 37 °C in un determinato volume di acqua. E' applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche disinfettate e di piscina, e comunque ad acque contenenti coliformi danneggiati.

Il metodo permette di determinare simultaneamente e direttamente la concentrazione di batteri coliformi a 37 °C e di *Escherichia coli* 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 ± 1) °C si procede alla lettura dei risultati. La presenza di coliformi viene evidenziata dalla colorazione gialla che appare nei pozzetti dovuta alla produzione di o-nitrofenolo (giallo) rilasciato dall'idrolisi dell'ONPG (Ortonitrofenil-β-D-galattopiranoside) catalizzata dall'enzima β-D-galattosidasi, caratteristico dei coliformi. Contemporaneamente può essere messo in evidenza *Escherichia coli* che produce fluorescenza nei pozzetti gialli se esposti ad una lampada a luce ultravioletta, dopo l'idrolisi del 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG).

Il metodo viene riportato dal Manuale Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, sotto il nome di Enzyme Substrate 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 1992. 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 1999 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
- 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.

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 sec.

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, eventualmente confrontando il colore rispetto al comparatore, e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa tabella 1.

Per controlli di qualità utilizzare sospensioni separate o una miscela di microrganismi: è consigliabile utilizzare come controllo positivo *E. coli* NCTC 9001, *Klebsiella aerogenes* NCTC 9528; come controllo negativo, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662; in alternativa, 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.



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. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri coliformi che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di (36 ± 1) °C per $(18 \div 24)$ ore, contare le colonie tipiche (coliformi presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi.

Il metodo riporta la composizione del substrato di isolamento così come viene indicata nella norma ISO 9308-1:1990.

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. M-Endo agar LES

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata contenente 20 mL di etanolo al 95% (V/V), distribuire in capsule di Petri. Non sterilizzare. È preferibile preparare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce. Conservare il terreno a (5 ± 3) °C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

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



Versione on-line su sito www.iss.it

2.2.4.2. 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, controlla e conserva 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.

2.2.4.3. Brodo lattosato al bromocresolo

Composizione		
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Estratto di carne	2	g
Porpora di bromocresolo	0,025	g
Acqua distillata	1000	mL
pH $7,4 \pm 0,2$		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, distribuire in tubi e sterilizzare a $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 20 min. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.4. 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. E' da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

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 $0,7/0,2 \mu\text{m}$). Porre la membrana sulla superficie del terreno M-Endo agar LES (2.2.4.1.) e procedere all'incubazione a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore.



2.2.5.2. Lettura dei risultati

Dopo incubazione sul terreno M-Endo agar LES (2.2.4.1.), la lettura dei risultati deve essere effettuata al più presto allo scopo di evitare che la luce provochi alterazioni cromatiche delle colonie cresciute.

Le colonie cresciute entro le 24 ore, di colore rosso con riflesso metallico e, generalmente, sviluppo di una colorazione rosso mattone scuro nel terreno sotto la membrana, si considerano formate da batteri coliformi (coliformi presuntivi).

2.2.5.3. Prove di conferma

Per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi è d'obbligo effettuare almeno la verifica della presenza dell'enzima citocromossidasi su, preferibilmente, tutte o su un numero comunque rappresentativo di colonie tipiche.

Per quanto precedentemente evidenziato, a discrezione dell'operatore è anche possibile procedere alla prova della fermentazione del lattosio.

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

Prima di effettuare ciascuna prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Agar soia triptone (2.2.4.2.) incubando a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.3.1. 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.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.2.) e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.2.4.4.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica dei coliformi) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

2.2.5.3.2. Prova della fermentazione del lattosio

La prova sfrutta la capacità dei coliformi di fermentare il lattosio alla temperatura di $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ in 24-48 ore.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia sospetta subcoltivata sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.2.) e inoculare in un tubo del Brodo lattosato al bromocresolo (2.2.4.3.). Incubare a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(24 \div 48)$ ore.

I batteri appartenenti al gruppo dei coliformi fermentano il lattosio evidenziabile dal viraggio al giallo dell'indicatore porpora di bromocresolo.

2.2.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie cresciute entro le 24 ore, di colore rosso con riflesso metallico, citocromossidasi-negative, eventualmente lattosio positive, o che l'identificazione biochimica ha dimostrato appartenere a specie del gruppo dei coliformi, sono da considerare coliformi confermati.

2.2.7. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi isolati 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).



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. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri coliformi 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 (coliformi presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi.

Il metodo fa riferimento alla norma UNI EN ISO 9308-1:2002 (6).

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, è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. 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, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare 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) (2.3.4.2.) e 50 mL di soluzione di eptadecilsolfato di sodio



Versione on-line su sito www.iss.it

(Tergitol 7) (2.3.4.3.), 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. E' preferibile preparare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce. Conservare il terreno a (5 ± 3) °C per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.3.4.2. 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 µm.

2.3.4.3. Soluzione di eptadecilsolfato di sodio

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

Sciogliere il Tergitol 7 in acqua distillata e portare al volume di 100 mL. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min.

2.3.4.4. Terreno completo

Terreno di base (2.3.4.1.)	1000	mL
Sol. TTC (2.3.4.2.)	50	mL
Sol. di eptadecilsolfato di sodio (2.3.4.3)	50	mL

Sciogliere il terreno di base e far raffreddare a (50 ± 5) °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 ± 3) °C per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.3.4.5. 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, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.



2.3.4.6. 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. E' da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.3.5. Procedura

2.3.5.1. 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 μm (pori simmetrici da 0,45 μm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 μm). Porre la membrana sulla superficie del terreno agarizzato al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio (2.3.4.4.) e procedere all'incubazione a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore.

2.3.5.2. Lettura dei risultati

Dopo incubazione contare tutte le colonie cresciute entro le 24 ore, che mostrano lo sviluppo di una colorazione gialla nel terreno sotto la membrana (coliformi presuntivi).

2.3.5.3. Prove di conferma

Per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi è d'obbligo effettuare la verifica della presenza dell'enzima citocromossidasi su, preferibilmente, tutte o su un numero comunque rappresentativo di colonie tipiche.

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

Prima di effettuare la prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Agar soia triptone (2.3.4.5.) 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.

2.3.5.3.1. 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.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar soia triptone (2.3.4.5.) e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.3.4.6.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica dei coliformi) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.



2.3.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie tipiche cresciute entro le 24 ore, citocromossidasi-negative, o che l'identificazione biochimica ha dimostrato appartenere a specie del gruppo dei coliformi, sono da considerare coliformi confermati.

2.3.7. Espressione dei risultati

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

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

Bibliografia

1. Bonadonna, L. *Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche*. Tecnica Sanitaria 1994, **32**:151-159.
2. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., 1996. Washington D.C., A.P.H.A.
3. US EPA. Federal Register June 10, 1992 – National Primary Drinking Water Regulations.
4. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed., 1995.
5. Metodi Analitici per le Acque. Volume terzo. APAT/IRSA-CNR, 29/2003.
6. UNI EN ISO 9308-1:2002 - Codice ICS: 07.100.20 | 13.060.30. Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi - Metodo di filtrazione su membrana.