

## 7020. Coliformi fecali

### 1. Introduzione

#### 1.1 Generalità

I coliformi fecali o termotolleranti fanno parte di quella frazione di microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae, a forma di bastoncino, gram-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni che, in base alla definizione basata sulla tecnica della fermentazione, fermentano il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  in 24 ore. Sono presenti nel materiale fecale ad una concentrazione media di  $10^7$ - $10^8$  UFC/g e possono trovarsi nelle acque reflue grezze a una concentrazione intorno a  $10^5$ - $10^7$  UFC/100 mL. La loro presenza costituisce un indice di contaminazione fecale dell'acqua esaminata.

I metodi classici per il loro rilevamento utilizzano una temperatura più elevata come fattore discriminante per distinguerli dai membri del gruppo dei coliformi di origine non fecale.

#### 1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi fecali.

#### 1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A*: metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab. 1, Sezione 6020). Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.
- *Metodo B*: metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento dei coliformi fecali che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti. È necessario in ogni caso tenere in considerazione che la scelta di un substrato o di un altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore, a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività. Di seguito vengono proposti due substrati alternativi.

#### 1.4 *Campo di applicazione*

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

## 2. **METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)**

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

### 2.1 *Volume da analizzare*

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

## 3. **Strumentazione e vetreria**

Normale attrezzatura di laboratorio.

## 4. **Reattivi e terreni di coltura**

### 4.1 *Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva*

#### 4.1.1 Brodo Lattosato

*Composizione:*

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Acqua distillata pH 6,9±0,2	1000	mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

#### 4.1.2 Brodo al Lauril Triptosio

*Composizione:*

Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio lauril solfato	0,1	g
Acqua distillata pH 6,8±0,2	1000	mL

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato (4.1.1). Si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

#### 4.2 *Brodo per lo svolgimento della prova di conferma*

##### 4.2.1 EC Medium

Composizione:		
Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,5	g
Sodio cloruro	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±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 e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

## 5. Procedura

### 5.1 *Prova presuntiva*

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (4.1.1 o 4.1.2), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a  $36\pm 1^\circ\text{C}$ . 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 ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le  $48\pm 3$  ore costituisce una reazione positiva presuntiva, sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

### 5.2 *Prova di conferma*

Prelevare, sterilmente, 0,1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il brodo per la prova di conferma (4.2.1). Incubare i tubi a  $44\pm 1^\circ\text{C}$  per  $24\pm 2$  ore. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi fecali.

Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare, considerando l'eventuale diluizione, il valore dell'indice MPN.

## 6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

## 7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

## 8. METODO B. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi fecali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito sono proposti due substrati d'isolamento alternativi.

### 8.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

## 9. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

## 10. Reattivi e terreni di coltura

### 10.1 Terreni di isolamento

#### 10.1.1 m-FC Agar

*Composizione:*

Triptosio	10	g
Proteose peptone n. 3 o polipeptone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Lattosio	12,5	g
Sali di bile	1,5	g
Blu di anilina	0,1	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare in acqua distillata contenente 10 mL di acido rosolico all'1% in NaOH 0,2 N. Non sterilizzare. Conservare il terreno distribuito in capsule Petri a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

### 10.1.2 C-EC Agar

Composizione:		
Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±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 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

## 10.2 Substrato di crescita

### 10.2.1 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±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±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

## 10.3 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

### 10.3.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

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.

**Nota:** è da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

## 11. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

### 11.1 Lettura dei risultati

Sul terreno m-FC (10.1.1) i coliformi fecali crescono come colonie blu, ma possono presentare diverse sfumature del colore. Alcuni *Escherichia coli* possono formare colonie atipiche di colore giallo chiaro. Colonie di colore grigio-crema sono formate generalmente da coliformi non fecali.

Sul C-EC Agar (10.1.2) gli stessi microrganismi sviluppano colonie di colore verde-blu.

È possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobatteriacee, a cui il gruppo dei coliformi fecali appartiene, alla prova della citocromossidasi (12.1), quale prova di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

## 12. Conferma biochimica

### 12.1 Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su Agar soia triptone (10.2.1) ed incubare a 36±1°C per 24±2 ore.

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

## 13. Procedura

Prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (10.3.1) 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 fecali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi ossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

## 14. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi fecali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte alla prova di 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 seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;  
 $V_1$  = volume (mL) di campione analizzato;  
 $V_s$  = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);  
F = fattore di diluizione.

### 15. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

### BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

GELDREICH E.E., CLARK H.F., HUFF C.B. & BEST L.C. (1965): "Fecal coliform organism medium for the membrane filter technique", *J. Am. Water Works Ass.*, **57**, 208.