

Manuale di tecnica microbiologica
Terreni di coltura per le analisi microbiologiche delle acque

MANUALE DI TECNICA MICROBIOLOGICA
TERRENI DI COLTURA PER LE ANALISI
MICROBIOLOGICHE DELLE ACQUE



ARPAT

Firenze, gennaio 2004

Manuale di tecnica microbiologica
Terreni di coltura per le analisi microbiologiche delle acque

Avvertenze

Le informazioni relative ai principali terreni di coltura per analisi microbiologiche sono presentate in forma di scheda sintetica. Per ciascun terreno sono riportate: composizione, modalità di preparazione, caratteristiche e utilizzazione.

Per le precauzioni nella preparazione e utilizzo dei terreni si rimanda alle relative schede di sicurezza presenti nelle confezioni.

I riferimenti utili per i terreni di coltura sono stati riportati anche grazie alla consultazione del materiale reperibile presso la Biblioteca del Dipartimento provinciale ARPAT di Prato, via Lodi 20, 59100 Prato.

I riferimenti ai metodi I.R.S.A. nell'utilizzazione dei terreni sono relativi alla bozza della revisione del Quaderno 100 "Metodi analitici per le acque" I.R.S.A. – C.N.R. - 2001

A cura di

Fabia Chiara Franchi, Leonardo Lapi, Antonio Limberti, Elisabetta Meniconi,
Leonardo Antonio Rizzi
ARPAT, Dipartimento provinciale di Prato

Con la collaborazione di

Ilaria Cipriani, Katia Gradi, Letizia Pagliai

© ARPAT 2004

Coordinamento editoriale: Silvia Angiolucci, ARPAT

Redazione: Silvia Angiolucci, Gabriele Rossi, ARPAT

Referenze iconografiche: Leonardo Lapi, ARPAT

Realizzazione editoriale: Litografia I.P., Firenze, gennaio 2004

Copertina: Franco Signorini

PRESENTAZIONE

Rendere comprensibile quella parte del mondo invisibile a cui fanno riferimento le attività dei laboratori di microbiologia ambientale dell'Agenzia è stato un obiettivo maturato fin dall'istituzione di ARPAT.

Grazie ai biologi che in questi anni si sono impegnati nelle varie attività di laboratorio, in collaborazione e continuo scambio di idee ed esperienze anche con i numerosi stagisti che si sono avvicendati nel tempo, si è giunti alla produzione di un elaborato costituito da una serie di puntuali descrizioni delle metodiche applicate, ricco di immagini realizzate all'interno del Dipartimento provinciale ARPAT di Prato.

Il lavoro compiuto, sintetizzato in questo Manuale, è indirizzato agli operatori dei laboratori di microbiologia ambientale e in particolare al settore delle analisi sulle acque. Può inoltre costituire un riferimento per la formazione di insegnanti di scuole medie superiori che intendano realizzare laboratori di educazione ambientale.

Con il recente accreditamento SINAL - secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 - di alcune prove microbiologiche nei laboratori dei Dipartimenti provinciali ARPAT, il Manuale costituisce, per gli attuali operatori e per quelli che nel tempo si affiancheranno, una base per l'effettuazione delle analisi nel rispetto degli obiettivi di qualità stabiliti.

Oltre a congratularmi con i collaboratori che hanno contribuito alla realizzazione della presente pubblicazione, mi è gradito ringraziare la Direzione dell'Agenzia che, nell'averne compreso il significato, ha ritenuto di pubblicarla nella collana "Quaderni" e di darne ampia diffusione.

Luciano Giovannelli
Responsabile
Dipartimento provinciale ARPAT di Prato

INDICE

Aesculina Bile Agar	9
Baird Parker Agar	11
Brodo Bile Verde Brillante	13
Brodo di Rappaport – Vassiliadis	15
C – EC – MF Agar	17
Cetrimide Agar	19
EC X – Gluc Agar	21
Hektoen Enteric Agar	23
KF Streptococco Agar	27
Kliger Iron Agar	29
Lysine Iron Agar	33
Mac Conkey Agar	37
M – Endo Agar Les	39
M – Enterococcus Agar	
(Slanetz and Bartley Medium)	41
M – FC Agar	43
Plate Count Agar Standard	45
Salmonella Shigella Agar (SS Agar)	47
Solfito Polimixina Sulfadiazina Agar (SPS Agar)	49
TCBS Agar	51
Tergitol – 7 Agar	55
Tergitol – 7 Agar con TTC	57
Tryptone Bile X - Glucuronide Medium TBX Agar	59
Principali test di conferma	61

AESCULINA BILE AGAR

Terreno selettivo per la conferma di Streptococchi di gruppo D o Enterococchi.

Composizione

Peptone	17.0 g/L
Proteose peptone	3.0
Estratto di lievito	5.0
Oxgall	10.0
Sodio cloruro	5.0
Sodio citrato	1.0
Aesculin	1.0
Citrato di ammonio e ferro (III)	0.5
Sodio azide	0.25
Agar	13.0

pH finale 7.1 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore giallo chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.
Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente, portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore giallo verdastro.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 7 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili ad esempio:

controllo positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212;

controllo negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Caratteristiche del terreno

L'azide sodica è un agente selettivo che ostacola la crescita di batteri gram negativi; agisce inibendo l'enzima Citocromo-ossidasi, il quale ha un ruolo fondamentale nelle ossidazioni biologiche che, tramite la catena respiratoria presente quasi esclusivamente nelle cellule dei

batteri gram negativi, portano alla produzione di energia.

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica.

L'Oxgall è bile fresca disidratata e rappresenta un agente selettivo che inibisce la crescita di batteri gram positivi ad eccezione di Streptococchi di gruppo D o Enterococchi.

Questi, inoltre, sono in grado di idrolizzare il glucoside Aesculina, incolore, presente nel terreno con formazione di glucosio e 6-7 diidrossicumarina (esculetina); quest'ultima reagisce con il citrato di ammonio e ferro (III) portando alla formazione di un derivato ferro-fenolico di colore nero, determinando la colorazione nera del terreno su cui Streptococchi di gruppo D o Enterococchi crescono con colonie di diametro di 1-2 mm, convesse traslucide o biancastre (Foto 1 e 2).

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7040 metodo C, UNICHIM N. 954/1, per le prove di conferma di Streptococchi fecali ed Enterococchi.

Si trasferisce sul terreno Aesculina Bile Agar la membrana su cui si sono sviluppate le colonie dei presunti Streptococchi fecali o Enterococchi, ad es. dopo incubazione in Slanetz e Bartley (m-Enterococcus Agar) o KF Streptococcus Agar.

Il terreno viene incubato a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 2 ore.

Si considerano Streptococchi fecali o Enterococchi quei microrganismi che hanno formato colonie in corrispondenza delle quali, osservandola sul retro, la membrana presenta un alone nero-marrone (Foto 3 e 4).

Il terreno può essere usato anche per l'isolamento di singole colonie, le quali sviluppano come poco sopra descritto.

BAIRD PARKER AGAR

Terreno selettivo per l'isolamento e la conta di Stafilococchi e la differenziazione di Stafilococchi coagulasi – positivi.

Composizione

Tryptone	10.0 g/L
Estratto di carne	5.0
Estratto di lievito	1.0
Sodio piruvato	10.0
Glicina	12.0
Cloruro di litio	5.0
Agar	20.0

pH finale 7.0 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore beige chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Aggiungere, con le cautele dell'asepsi, 50 ml di supplemento Emulsione giallo d'uovo e tellurito di potassio preriscaldato a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ in modo da ottenere una concentrazione, per litro di terreno completo, di 0.1 g di tellurito di potassio e 50 ml di emulsione di tuorlo d'uovo; mescolare con cura e versare in piastre sterili.

Le piastre pronte devono apparire di colore giallo uniformemente opaco.

Il supplemento deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 7 – 10 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;

controllo negativo: *Streptococcus epidermidis* ATCC 12228.

Caratteristiche del terreno

La presenza di cloruro di litio, tellurito di potassio e glicina inibisce la maggior parte della flora contaminante interferendo con la sua attività enzimatica, la glicina ed il piruvato di sodio facilitano la crescita di Stafilococchi.

Gli Stafilococchi sono in grado di detossificare il tellurito riducendolo a tellurio, un non metallo di colore nero, instabile che precipita sopra le colonie facendo loro assumere una colorazione che va dal grigio scuro al nero.

Il tuorlo d'uovo serve per differenziare lo *Staphylococcus aureus* il quale è in grado di produrre enzimi lipolitici che catalizzano l'idrolisi degli esteri fra acidi grassi e glicerolo dei fosfolipidi e trigliceridi in esso presenti.

Si ottengono così colonie circondate da un alone di chiarificazione che appare trasparente sul fondo opaco dovuto al tuorlo d'uovo.

La zona di chiarificazione vicino alla colonia può presentare un alone opaco di precipitazione dovuto al complesso che si forma fra acidi grassi e ioni calcio (Foto 5).

Staphylococcus aureus forma quindi colonie del diametro di 1.0 – 1.5 mm nere, lucide, brillanti, convesse con alone di chiarificazione di 2 – 5 mm che può comparire anche dopo 36 ore; spesso le colonie sono circondate da un alone di precipitazione che generalmente compare dopo 48 ore, a differenza di *Staphylococcus saprophyticus* in cui l'alone è visibile dopo 24 ore e le colonie sono più irregolari.

Stafilococchi coagulasi negativi raramente formano aloni di chiarificazione (Foto 6).

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 “Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano”, volume secondo; Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 “Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]”, per la determinazione di Stafilococchi patogeni.

Il volume da analizzare è di 250 ml per l'analisi delle acque in rete e delle acque minerali; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno Agar Baird Parker e incubata a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24+24 ore nel caso di acque potabili ed a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore per le acque minerali.

I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi positivi sviluppano su Agar Baird Parker colonie nere per la riduzione del tellurito a tellurio metallico, brillanti, lisce, con margini netti, convesse, con diametro di 1-2 mm, circondate da un alone chiaro dovuto ad attività proteolitica. Le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi negative sviluppano, invece, colonie nere, con margini irregolari, non circondate da alone trasparente.

Le colonie nere con alone sono da considerarsi sospette e da sottoporre a successive prove di conferma quali ad esempio la prova della coagulasi, anche con il test di agglutinazione al lattice, o prove di identificazione biochimica con sistemi miniaturizzati.

BRODO BILE VERDE BRILLANTE

Terreno selettivo per la determinazione e la conferma di Batteri coliformi.

Composizione

Peptone	10.0	g/L
Lattosio	10.0	
Bile di bue	20.0	
Verde brillante	0.0133	

pH finale 7.4 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore beige verdastro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente fino a completa soluzione della polvere.

Distribuire in provette aggiungendo una campanula di Durham o provetta di fermentazione rovesciata.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Si ottengono provette con terreno di colore verde smeraldo, limpido, senza precipitato (Foto 7).

Le provette pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a temperatura ambiente.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Caratteristiche del terreno

Il verde brillante inibisce la crescita di batteri anaerobi lattosio fermentanti quali il *Clostridium perfringens*.

Il verde brillante e la bile inibiscono la crescita di microrganismi gram positivi.

Il lattosio, presente nel terreno come unico carboidrato, serve per evidenziare la crescita di microrganismi in grado di metabolizzare il lattosio per via aerogena con produzione finale di anidride carbonica e idrogeno. Lo sviluppo di questi gas viene rivelato dalla formazione di una bolla d'aria nella campanula di Durham.

Si considerano presumibilmente positive per batteri Coliformi, da riconfermare con

opportune tecniche, quelle provette che presentano torbidità e sviluppo di gas (Foto 8).

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7010 Metodo A, Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 “Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]”, UNICHIM N.952/1, UNICHIM N.952/2, UNICHIM N.953/2, per la determinazione e la conferma di batteri Coliformi in matrici acqua.

Dal brodo utilizzato per la prova presuntiva o da una piastra contenente una colonia sospetta prelevare un'ansata e stemperarla in Brodo Bile Verde Brillante.

Incubare la provetta alla temperatura di $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore ed a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore, rispettivamente per Coliformi totali e fecali nelle acque minerali, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 + 24 ore negli altri casi.

L'intorbidimento del terreno e la presenza di gas nella campanula di Durham indicano un risultato positivo.

BRODO DI RAPPAPORT - VASSILIADIS

Brodo di arricchimento selettivo per *Salmonelle*.

Composizione

Peptone di soia	4.5 g/L
Cloruro di sodio	7.2
Potassio fosfato biacido	1.26
Potassio fosfato monoacido	0.18
Cloruro di magnesio anidro	13.58
Verde malachite	0.036

pH finale 5.2 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore verde chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare delicatamente, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente, fino a completa soluzione della polvere.

Distribuire in provetta, 10 ml per ciascuna.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Si ottengono provette con terreno di colore blu - verde malachite limpido, senza precipitato (Foto 9).

Le provette pronte possono essere conservate per 30 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076;

controllo negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Caratteristiche del terreno

Il Brodo Rappaport-Vassiliadis virtualmente dovrebbe inibire la totalità dei batteri gram positivi e gram negativi grazie all'azione combinata di:

- moderata acidità del terreno, pH 5.2, mentre le *Salmonelle* riescono a moltiplicarsi anche a valori di pH relativamente bassi;

- modesto abbassamento dell'attività dell'acqua dovuto alla presenza del sale cloruro di magnesio ad alta concentrazione mentre le *Salmonelle* riescono a sopravvivere a pressioni osmotiche relativamente alte;
- presenza di Verde malachite che inibisce la crescita di microrganismi agendo a livello dei sistemi di trasporto cellulare, mentre le *Salmonelle* risultano ad esso resistenti;
- apporto relativamente povero di principi nutritivi, mentre le *Salmonelle* risultano avere esigenze nutrizionali inferiori rispetto ad altri microrganismi.

La presenza di peptone di soia favorisce lo sviluppo di *Salmonella*.

La crescita batterica determina intorbidimento del terreno (Foto 10).

La presenza di potassio fosfato biacido e di potassio fosfato monoacido assicura la stabilità del pH dopo la preparazione del terreno facilitandone la conservazione.

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica.

Avvertenze

Il terreno non deve essere usato qualora si sospetti la presenza di *Salmonella typhi* perché il verde malachite ne inibisce la crescita.

Per non perdere il potere selettivo del terreno occorre limitare l'aggiunta di materiale organico, riducendo il rapporto di diluizione della brodocoltura di pre-arricchimento a 1:100.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano", volume secondo, IRSA 7080, UNICHIM N.959, per la valutazione di presenza/assenza di *Salmonella* in determinati volumi di matrici acqua.

Il Brodo di Rappaport-Vassiliadis rappresenta un terreno di arricchimento; dal brodo di prearricchimento si esegue un inoculo, in rapporto di 1:100, in Rappaport-Vassiliadis, questo viene incubato a $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 24 + 24 ore.

Dal brodo di arricchimento si procede con 2 subcolture per strisci multipli sui terreni di isolamento (SS Agar, Hektoen Enteric Agar): la prima dopo 24 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

C – EC – MF AGAR

Substrato selettivo cromogeno e fluorogeno per la determinazione simultanea di Coliformi Totali e di *Escherichia coli*.

Composizione

Triptosio	10.0 g/L
Triptofano	1.0
Peptocomplesso	5.0
Estratto di lievito	3.0
Sodio cloruro	5.0
Sali di bile n°3	1.5
Isopropil-tiogalattoside IPTG	0.10
5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galattopiranoside XGAL	0.08
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide MUG	0.05
Agar	13.0

pH finale 6.8 ± 0.2 a 25°C.

Aspetto della polvere disidratata: colore giallo chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $115 \pm 1^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^\circ\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore crema chiaro, trasparente (Foto 11).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922 – *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883;

controllo negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Caratteristiche del terreno

La presenza di sali biliari inibisce la crescita di microrganismi gram positivi.

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica.

Il 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattopiranoside presente nel terreno viene idrolizzato a 5-Br-4-Cl-3-indolo dai Coliformi grazie alla capacità di produrre l'enzima β -galattosidasi dando luogo alla formazione di colonie di colore blu - verde; l'IPTG presente nel terreno serve per evidenziare la reazione (Foto 12 e 13).

Escherichia coli grazie alla presenza dell'enzima glucuronidasi è in grado di idrolizzare il MUG con formazione di 4 - metilumbelliferone che, osservato sotto luce ultravioletta con lunghezza d'onda di 366 nm, appare con fluorescenza blu-verde (Foto 14); è inoltre in grado di compiere la deaminazione del triptofano, presente nel terreno, con produzione di indolo. Questa reazione viene evidenziata direttamente in piastra aggiungendo sulla colonia da saggiare una goccia di reattivo di Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeide 5 g, alcool amilico 75 mg, acido cloridrico concentrato 25 mg/100 ml) (Foto 15).

In presenza di indolo, entro pochi minuti, il reattivo si colora di rosa-rosso.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7010 Metodo B 10.1.2, per la determinazione di Coliformi totali e IRSA 7030 Metodo C, per la determinazione di *Escherichia coli*.

Il volume da analizzare è di 100 ml per l'analisi delle acque in rete; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una su membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 μ m, questa viene trasferita piastre contenenti il terreno C- EC- MF Agar e, per la determinazione di Coliformi totali, incubata a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore; per la determinazione di *Escherichia coli* incubata a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

I Coliformi totali sviluppano su C-EC-MF Agar colonie di colore verde-blu, *Escherichia coli* colonie di colore verde-blu che risultano fluorescenti alla luce ultravioletta.

Si può eseguire, come conferma, la prova della citocromossidasi, che deve risultare negativa, appartenendo i microrganismi alla famiglia delle Enterobatteriacee.

CETRIMIDE AGAR

Terreno selettivo per la determinazione e il conteggio di *Pseudomonas aeruginosa*.

Composizione

Peptone	20.0 g/L
Cloruro di magnesio	1.4
Solfato di potassio	10.0
Cetrimide (cetil-trimetil-ammonio bromuro)	0.3
Agar	13.6

pH finale 7.0 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore beige chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente, quindi aggiungere 10 ml di glicerolo.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore giallo chiaro.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 30 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;

controllo negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - *Escherichia coli* ATCC 25922.

Caratteristiche del terreno

La Cetrimide, la base di ammonio quaternario presente nel mezzo, determina la selettività del terreno inibendo la crescita della maggior parte dei microrganismi ad eccezione di *Pseudomonas aeruginosa*.

Il magnesio cloruro e il potassio solfato favoriscono la produzione di fluoresceina e di pirocianina da parte di *Pseudomonas aeruginosa*.

Il peptone è un nutriente.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano," volume secondo 00/14 Pt.2 pag353, Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 "Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]", per la determinazione di *Pseudomonas aeruginosa*.

Il volume da analizzare è pari a 250 ml per l'analisi delle acque minerali e per le acque destinate al consumo umano; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate anche aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno Agar alla Cetrimide ed incubata a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore nel caso di analisi delle acque minerali, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore ed, eventualmente, ulteriori 24 ± 2 ore nel caso di analisi delle acque destinate al consumo umano.

Pseudomonas aeruginosa sviluppa su Agar alla Cetrimide con colonie piatte, a margine liscio, di 0.8 – 1.2 mm di diametro, che alla luce normale appaiono di colore blu-verde, giallo-verde, con pigmento diffuso nel terreno (Foto 16) e, sotto la luce ultravioletta, verde fluorescente (Foto 17).

Il 10 % dei biotipi non produce pigmento.

Si può eseguire, come conferma, la prova della crescita a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ che nel caso di *Pseudomonas aeruginosa*, è positiva, e la prova della citocromossidasi, anch'essa positiva.

EC X – GLUC AGAR

Substrato selettivo cromogeno per la determinazione di *Escherichia coli*.

Composizione

Tryptone	20.0 g/L
Triptofano	1.0
Estratto di lievito	5.0
Sodio cloruro	5.0
Sali di bile n°3	1.5
Sodio fosfato bibasico	5.0
Potassio fosfato monobasico	1.5
X – Gluc (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-Glucuronide)	0.06
Agar	12.0

pH finale 7.0 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore giallo chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $115 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore crema chiaro, trasparente (Foto 18).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

Caratteristiche del terreno

L'X – Gluc è un agente cromogenico costituito da 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-β-D-glucuronide e viene impiegato per evidenziare la capacità di *Escherichia coli* di produrre l'enzima glucuronidasi (da tenere presente che circa il 3 – 4 % di ceppi di *Escherichia coli*, fra cui

O 157, sono glucuronidasi negativi). L'X – glucuronide viene assorbito intatto dalle cellule batteriche e scisso dalla β -glucuronidasi intracellulare in glucuronide e cromoforo.

Il cromoforo non legato è colorato e, concentrato all'interno delle cellule di *Escherichia coli*, conferisce alle colonie una tipica colorazione blu o blu/verde (Foto 19).

La presenza di sali biliari inibisce la crescita di microrganismi gram positivi.

Il triptone e l'estratto di lievito sono nutrienti.

Escherichia coli è in grado di compiere la deaminazione del triptofano, presente nel terreno, con produzione di indolo.

Questa reazione viene evidenziata direttamente in piastra aggiungendo sulla colonia da saggiare una goccia di reattivo di Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeide 5 g, alcool amilico 75 mg, acido cloridrico concentrato 25 mg/100 ml).

In presenza di indolo, entro pochi minuti, il reattivo si colora di rosa-rosso (Foto 20).

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica.

La presenza di Sodio fosfato bibasico e di Potassio fosfato monobasico assicura la stabilità del pH dopo la preparazione del terreno facilitandone la conservazione.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7030 Metodo D, per la determinazione di *Escherichia coli*. Il volume da analizzare è di 100 ml per l'analisi delle acque superficiali; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse; nel caso di acque reflue spesso è necessario esaminare diluizioni scalari.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 μ m, questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno EC X-Gluc Agar e incubata a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

Escherichia coli sviluppa con colonie di colore blu o blu/verde, positive alla reazione dell'indolo.

HEKTOEN ENTERIC AGAR

Terreno per l'isolamento di patogeni enterici.

Composizione

Proteose Peptone	12.0 g/L
Estratto di lievito	3.0
Lattosio	12.0
Saccarosio	12.0
Salicina	2.0
Sali biliari n° 3	9.0
Sodio cloruro	5.0
Sodio tiosolfato	5.0
Ferrico ammonio citrato	1.5
Fucsina acida	0.1
Blu di bromotimolo	0.065
Agar	14.0

pH finale 7.5 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore beige verdastro chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente e, preferibilmente, lasciare sciogliere per 10 minuti.

Riscaldare, agitando in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione per circa un minuto, fino a completa soluzione della polvere, non surriscaldare.

NON AUTOCLAVARE.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore verde con sfumature giallastre, leggermente opalescenti.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076;

controllo negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Caratteristiche del terreno

Il contenuto relativamente abbondante di carboidrati e di peptone, la minor tossicità del sistema indicatore, servono a controbilanciare gli effetti inibitori dei sali biliari, così da limitare solo debolmente la crescita di *Salmonella* e *Shigella*, rispetto a microrganismi gram positivi e ad altri enterobatteri.

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica.

Il lattosio, come carboidrato fermentabile, serve per differenziare i microrganismi che sono in grado di operare il suo attacco da quelli che non lo sono. Il saccarosio e la Salicina, carboidrati che risultano più facilmente fermentabili dal lattosio, servono a differenziare ulteriormente tali microrganismi.

Il blu di bromotimolo e la fucsina acida sono indicatori di pH.

La crescita di microrganismi che non sono in grado di fermentare il lattosio determina la formazione di colonie trasparenti che appaiono dello stesso colore del terreno.

La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta allo sviluppo di acido, con conseguente viraggio degli indicatori di pH presenti nel terreno, alla precipitazione di sali biliari e alla formazione di colonie di colore che va dal rosa salmone all'arancio.

La presenza di tiosolfato di sodio serve per evidenziare la capacità di alcuni microrganismi, grazie alla presenza dell'enzima tiosolfato reductasi, di liberare, a partire da tiosolfato, ioni solfuro. Essi si legano a idrogeno con formazione di acido solfidrico. L'acido solfidrico, in presenza di citrato ferrico determina la formazione di un precipitato di solfuro di ferro.

Le colonie dei microrganismi in grado di produrre acido solfidrico presentano quindi centro nero.

I microrganismi appartenenti al genere *Salmonella*, ma anche la maggior parte di quelli appartenenti al genere *Proteus*, crescono con colonie trasparenti, che appaiono verde/blu, generalmente con centro nero (Foto 21 e 22).

I microrganismi appartenenti al genere *Shigella* crescono con colonie trasparenti, che appaiono quindi del colore verde del terreno.

La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta allo sviluppo di acido, con conseguente viraggio degli indicatori di pH presenti nel terreno, alla precipitazione di sali biliari e alla formazione di colonie di colore che va dal rosa salmone all'arancio (Foto 23).

Crescita su Hektoen Enteric Agar di alcuni microrganismi

Microrganismo	Caratteristiche delle colonie	Viraggio del terreno
<i>Shigella</i>	verde chiaro in rilievo	assente
<i>Salmonella spp.</i>	verde blu o blu con o senza centro nero	verso il blu
<i>Salmonella arizonae</i>	verde blu o blu con o senza centro nero	verso il blu
<i>Coliformi</i>	dal salmone all'arancio con alone di precipitazione	verso il salmone
<i>Proteus spp.</i> saccarosio/salicina fermentanti	salmone	
<i>Proteus spp.</i> saccarosio/salicina non fermentanti	verde blu con o senza centro nero	
<i>Pseudomonas spp.</i>	irregolari verdi o brunastre piatte	

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano", volume secondo, IRSA 7080, UNICHIM N.959 per la determinazione di enterobatteri patogeni e in particolare di *Salmonella*.

Il volume da analizzare è di 1000 o 5000 ml per l'analisi delle acque superficiali destinate alla potabilizzazione; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su terreni di prearricchimento e successivamente di arricchimento.

Dal terreno di arricchimento, Brodo di Rappaport-Vassiliadis, si effettuano 2 subcolture per strisci multipli sui terreni Hektoen Enteric Agar, la prima dopo 6 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 18 ore. Le subculture si incubano a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Come conferma si può eseguire sulle colonie sospette la prova della fermentazione dei carboidrati utilizzando il terreno Agar al ferro di Kliger, e la prova della decarbossilazione della lisina utilizzando il terreno Agar al ferro e lisina.

La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta allo sviluppo di acido, con conseguente viraggio degli indicatori di pH presenti nel terreno, alla precipitazione di sali biliari e alla formazione di colonie di colore che va dal rosa salmone all'arancio.

La presenza di tiosolfato di sodio serve per evidenziare la capacità di alcuni microrganismi, grazie alla presenza dell'enzima tiosolfato reductasi, di liberare, a partire da tiosolfato, ioni solfuro; essi si legano ad idrogeno con formazione di acido solfidrico. L'acido solfidrico, in presenza di citrato ferrico determina la formazione di un precipitato di solfuro di ferro.

Le colonie dei microrganismi in grado di produrre acido solfidrico presentano quindi centro nero.

KF STREPTOCOCCO AGAR

Terreno selettivo per la determinazione e la conta di Streptococchi fecali

Composizione

Proteose peptone	10.0 g/L
Estratto di lievito	10.0
Sodio cloruro	5.0
Sodio glicerofosfato	10.0
Maltosio	20.0
Lattosio	1.0
Sodio azide	0.4
Bromocresolo porpora	0.015
Agar	20.0

pH finale 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore bianco giallastro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C . fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata. Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere. Mantenere l'ebollizione per 5 minuti.

NON AUTOCLAVARE - anche se sconsigliato, per ottenere una completa selettività del terreno, è possibile sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e aggiungere asetticamente 1 ml ogni 100 ml di terreno di soluzione acquosa sterile all'1% di 2,3,5 Trifeniltetrazolio cloruro (TTC) e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore violetto (Foto 24).

Esistono in commercio anche formulati privi di Bromocresolo porpora, in tal caso si ottengono piastre di colore chiaro (Foto 25).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 30 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212;

controllo negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Caratteristiche del terreno

Il lattosio ed il maltosio presenti nel terreno sono carboidrati fermentabili.

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica.

L'azide sodica è un agente selettivo che ostacola la crescita di batteri gram negativi; agisce inibendo l'enzima Citocromo-ossidasi, il quale ha un ruolo fondamentale nelle ossidazioni biologiche che, tramite la catena respiratoria, presente quasi esclusivamente nelle cellule dei batteri gram negativi, portano alla produzione di energia.

Il bromocresolo porpora è un indicatore di pH, a seguito della produzione di acido dalla fermentazione dei carboidrati presenti, questo vira al giallo attorno alle colonie di Streptococchi ed Enterococchi.

Streptococchi ed Enterococchi sono in grado di ridurre il TTC aggiunto al terreno base con produzione di un colorante azoico acido (formazano), dando luogo alla formazione di colonie di colore che va dal rosa (*E. faecalis*) al rosso mattone (*E. faecium*) a seconda della capacità più o meno marcata di ridurre il TTC (Foto 26), il cui diametro è compreso fra 0.3 e 2 mm (Foto 27).

Utilizzazione del terreno

Il terreno viene consigliato nel Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 "Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]", UNICHIM 954/1, per la determinazione di Streptococchi fecali.

Il volume da analizzare è di 250 ml per l'analisi delle acque minerali, di 100 ml per le acque in rete; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 μm , questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno KF Streptococco Agar ed incubata a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 44 ± 4 ore.

Gli Streptococchi fecali sviluppano su KF Streptococco Agar colonie di colore che va dal rosa al rosso al marrone, attorno alle quali il terreno risulta virato al giallo.

Per conferma, la membrana sulla quale si è avuta crescita di colonie sospette, può essere trasferita su Aesculina Bile Agar.

Si può eseguire, per differenziare gli Streptococchi dagli Stafilococchi, la prova della catalasi, che deve risultare negativa.

KLIGER IRON AGAR¹

Terreno per la differenziazione di Enterobatteri.

Composizione

Estratto di carne	3.0 g/L
Estratto di lievito	3.0
Peptone	20.0
Sodio cloruro	5.0
Lattosio	10.0
Glucosio	1.0
Ferro citrato	0.3
Sodio tiosolfato	0.3
Rosso fenolo	0.05
Agar	12.0

pH finale 7.4 ± 0.2 a 25°C.

Aspetto della polvere disidratata: colore rosato, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente, riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente, fino a completa soluzione della polvere.

Mescolare e distribuire in provette.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare in posizione inclinata in modo da ottenere un fondo alto circa 2.5 cm e un becco di clarino corto.

Le migliori reazioni si ottengono con terreni preparati di fresco. Se il terreno non viene usato subito dopo la preparazione, può essere fuso e fatto risolidificare prima dell'uso.

Si ottengono provette di colore rosso arancio, che possono essere lievemente opalescenti e presentare un leggero precipitato (Foto 28).

Le provette pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

¹Per la stesura di questa scheda abbiamo fatto riferimento al Manuale Biolife 2° edizione: Mac Faddin J.F. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1976

controllo positivo: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Citrobacter freundii* ATCC 8090;
controllo negativo: terreno non inoculato.

Caratteristiche del terreno

Il contenuto relativamente abbondante di componenti di origine proteica rende il terreno molto ricco da un punto di vista nutritivo, la qual cosa, accompagnata dall'assenza di inibitori, permette la crescita della maggior parte delle specie batteriche, ad esclusione degli anaerobi.

Il Kliger Iron Agar è impiegato per differenziare gli enterobatteri in base alla loro capacità di fermentare il glucosio ed il lattosio e di produrre idrogeno solforato.

La fermentazione degli zuccheri presenti può avvenire sia aerobicamente (sulla superficie dello slant) sia anaerobicamente (in profondità) con o senza presenza di gas ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$).

Sulla superficie del terreno il glucosio è catabolizzato all'inizio secondo la via anaerobica di Embden Meyerhorf ad acido piruvico, sia dai microrganismi aerobi che anaerobi.

L'acido piruvico è quindi degradato nel ciclo di Krebs a CO_2 e H_2O ed energia dagli aerobi e dagli anaerobi facoltativi.

In profondità il glucosio è catabolizzato anaerobicamente attraverso la via di Embden Meyerhorf ad ATP e acido piruvico, il quale è convertito in prodotti stabili: acidi organici, aldeidi, alcoli, CO_2 e H_2O ed energia.

Il lattosio presente nel terreno è metabolizzato dai batteri che possiedono la β -galattosidasi, in glucosio e galattosio; i due monosaccaridi attraverso il ciclo di Krebs sono degradati a CO_2 e H_2O ed energia.

Per quando riguarda la fermentazione degli zuccheri in K.I.A. si possono registrare tre modelli di reazione:

- a) fermentazione del glucosio;
- b) fermentazione del glucosio e del lattosio;
- c) nessuna fermentazione.

Nel primo caso dopo 18-24 ore di incubazione si osserva una reazione alcalina sullo slant e una reazione acida in profondità.

L'utilizzazione completa del glucosio, presente alla concentrazione dello 0.1% in superficie, dove esistono condizioni di aerobiosi, dopo 18-24 ore induce un attacco catabolico dei peptoni da parte dei microrganismi con produzione di ione ammonio e viraggio del rosso fenolo verso il rosso (pH alcalino).

In profondità invece dove esistono condizioni anaerobiche, si registra unicamente una fermentazione del glucosio a prodotti acidi stabili con conseguente viraggio dell'indicatore verso il giallo (pH acido).

Nel secondo caso, quando siano presenti microrganismi che fermentano entrambi i carboidrati, si registra dopo 18-24 ore di incubazione una reazione acida in superficie e in profondità.

Nel terzo modello sperimentale si registra una reazione alcalina sia in superficie che in profondità.

Alcuni batteri gram negativi non enterici presenti nell'intestino non fermentano il glucosio e il lattosio ma possono degradare aerobicamente e/o anaerobicamente i peptoni (*Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*).

Se la degradazione dei peptoni è anaerobica si ha un viraggio dello indicatore verso il rosso (pH alcalino) sia in superficie che in profondità; se la degradazione è aerobica, in profondità

non c'è alcun cambiamento del colore del terreno.

Su K.I.A. si può osservare anche la produzione di idrogeno solforato a partire dal sodio tiosolfato quando l'ambiente sia acido. L'idrogeno solforato è evidenziato da un apposito indicatore, il ferro ammonio citrato, che in presenza di H_2S precipita sotto forma di ferro solfuro nero (Foto 29).

Il precipitato nero può a volte mascherare il colore reale dell'indicatore: comunque ciò non può far sorgere dubbi poiché H_2S è prodotto esclusivamente quando il pH del mezzo acido. Nella tabella sottostante sono riassunte le caratteristiche culturali di alcuni microrganismi su Kliger Iron Agar.

Microrganismo	Superficie	Profondità	Gas	H_2S
<i>Escherichia coli</i>	A/K	A	+	V
<i>Klebsiella</i>	A	A	+	-
<i>Enterobacter</i>	A	A	+	-
<i>Citrobacter</i>	A/K	A	+	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	K	A	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	K	A	-	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella arizonae</i>	K	A	+	+

Legenda: K = reazione alcalina; A = reazione acida; V = reazione variabile
Reazione acida = colore giallo; Reazione alcalina = colore rosso
+ = presente, - = assente

- Superficie di colore rosso / Fondo di colore giallo = fermentazione del solo glucosio
- Superficie di colore giallo / Fondo di colore giallo = fermentazione del glucosio e del lattosio
- Superficie di colore rosso / Fondo di colore rosso = nessuna fermentazione
- Produzione di H_2S = annerimento del terreno
- Produzione di gas = formazione di bollicine o rottura dell'agar

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano", volume secondo, IRSA 7080, UNICHIM N.959 per la determinazione di enterobatteri patogeni e in particolare di *Salmonella*.

Seminare, infiggendo l'ago sul fondo e strisciando poi abbondantemente in superficie, la colonia sospetta.

Dopo 18-24 ore di incubazione - il tempo è fondamentale - a $36 \pm 1^\circ C$ osservare il colore del terreno in superficie ed in profondità, la presenza di gas e la presenza del precipitato nero (H_2S). Per l'interpretazione dei risultati consultare la tabella precedente.

Es: *Salmonella sp.*: superficie rossa, profondità gialla, produzione di gas e H_2S .

Foto n. 1

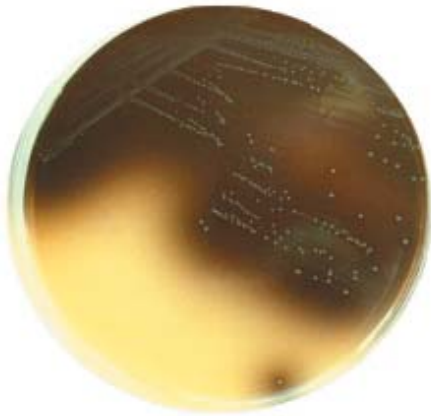


Foto n. 2



Foto n. 3

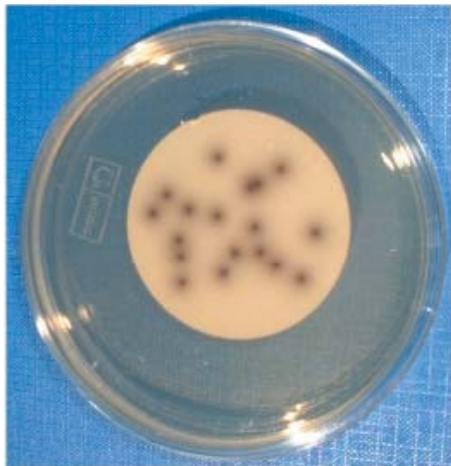


Foto n. 4

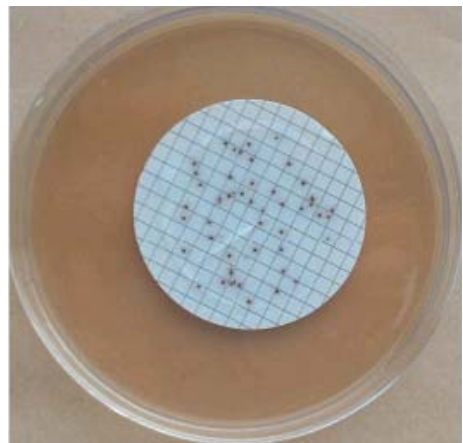


Foto n. 5



Foto n. 6

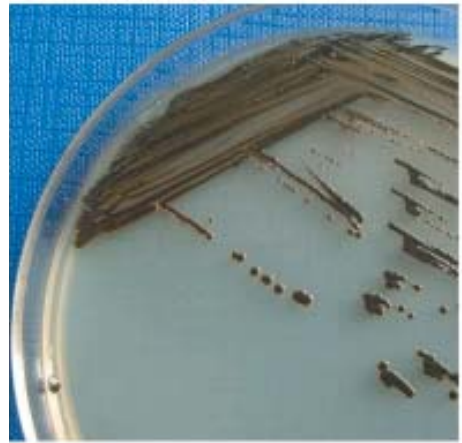


Foto n. 7

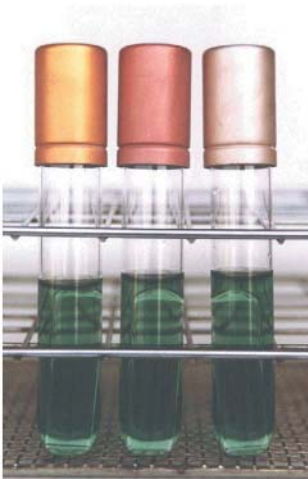
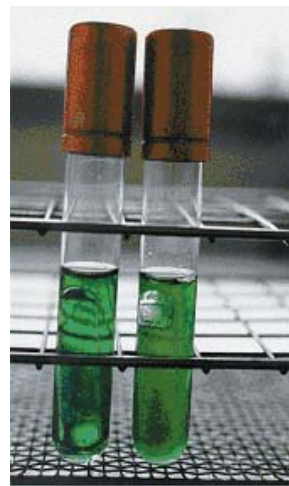


Foto n. 8



Negativo

Positivo

Foto n. 9

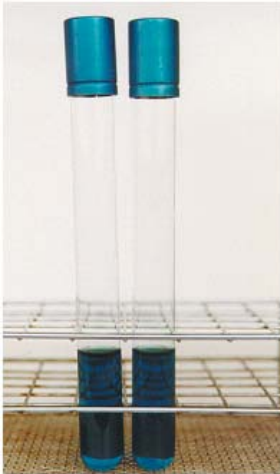


Foto n. 10



↑
Crescita positiva

↑
Negativa

Foto n. 11



Foto n. 12



Foto n. 13

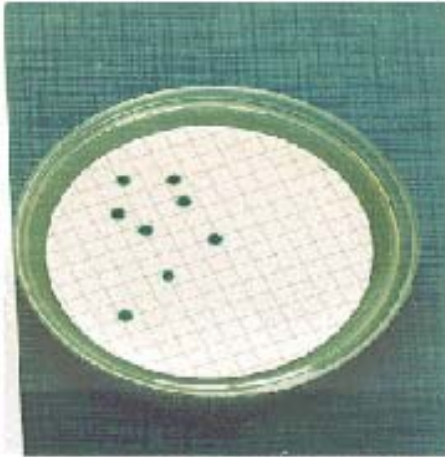


Foto n. 14



Foto n.15

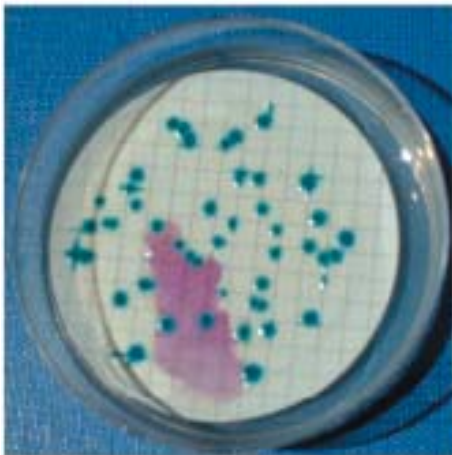


Foto n. 16



Foto n. 17

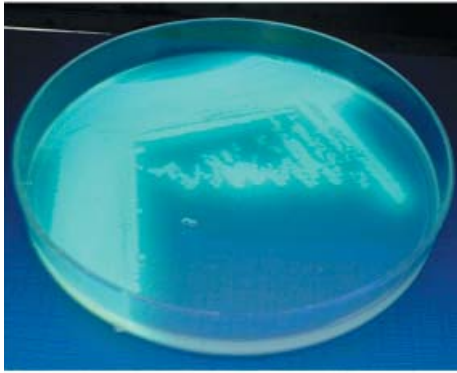


Foto n. 18



Foto n. 19

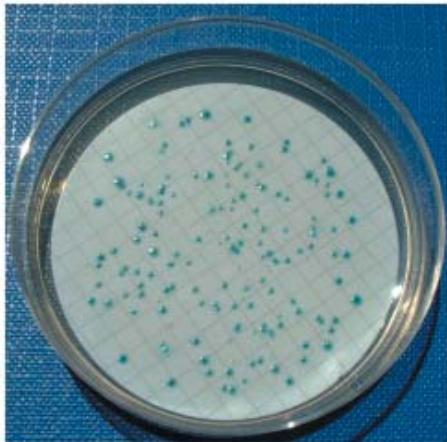


Foto n. 20

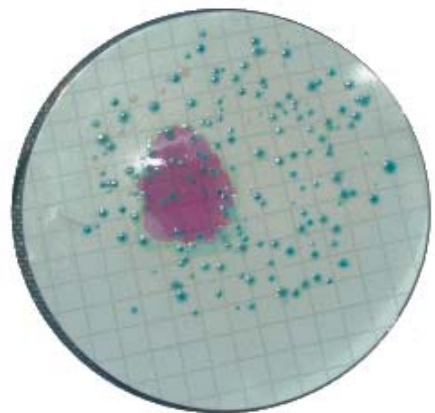


Foto n. 21



Foto n. 22

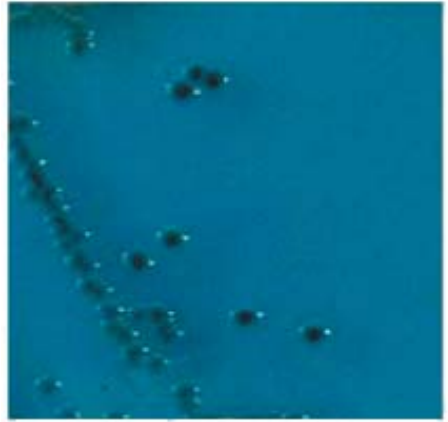


Foto n. 23



Foto n. 24



Foto n. 25



Foto n. 26



Foto n. 27

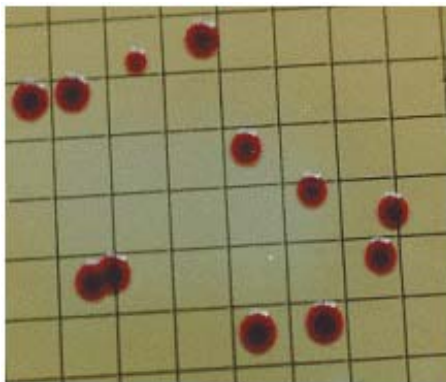


Foto n. 28



Foto n. 29

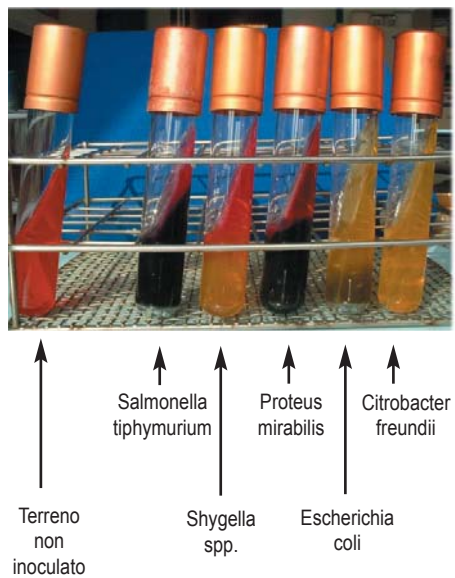


Foto n. 30



Foto n. 31

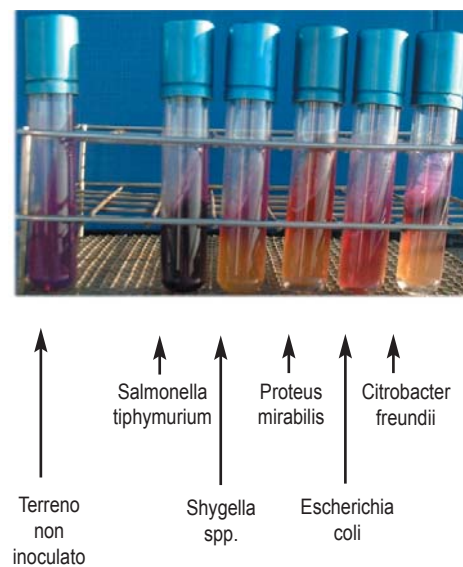


Foto n. 32



Foto n. 33



Foto n. 34



↑
Escherichia coli

↗
Enterobacter cloacae

Foto n. 35



Foto n. 36

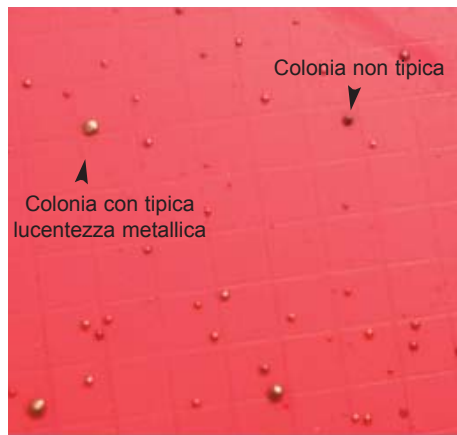


Foto n. 37

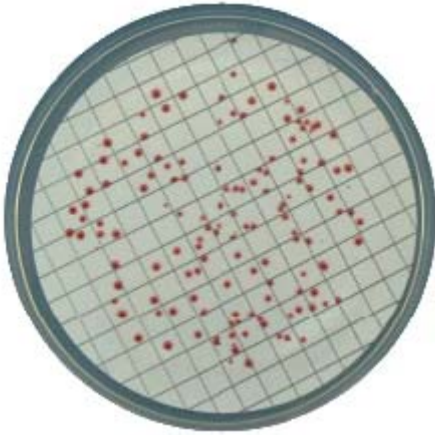


Foto n. 38

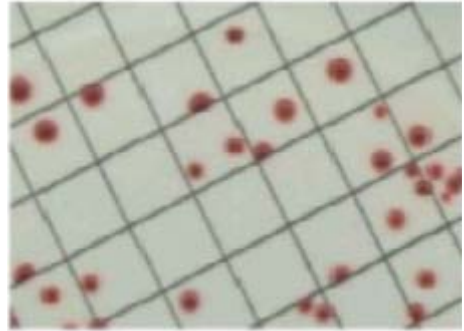


Foto n. 39



Foto n. 40

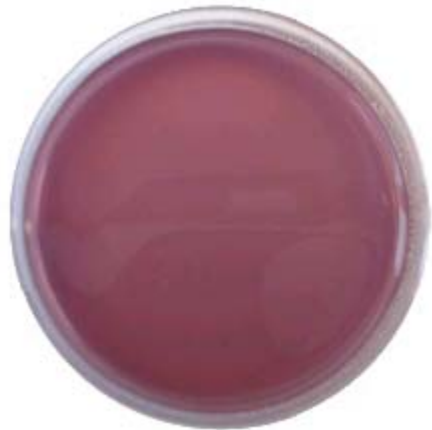


Foto n. 41

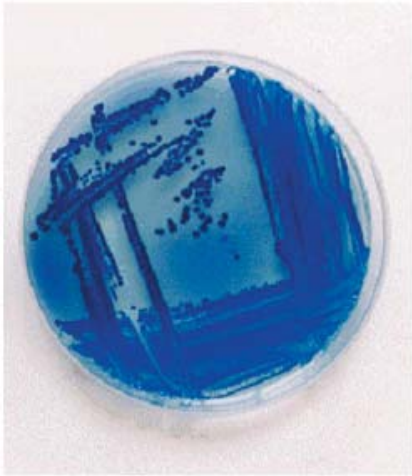


Foto n. 42

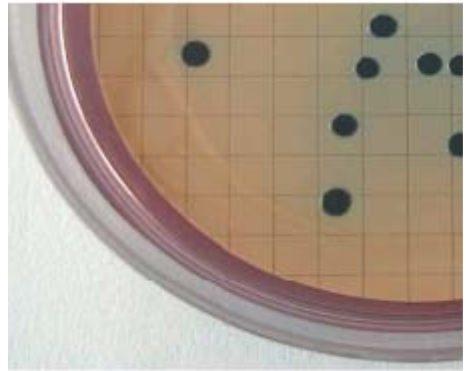


Foto n. 43

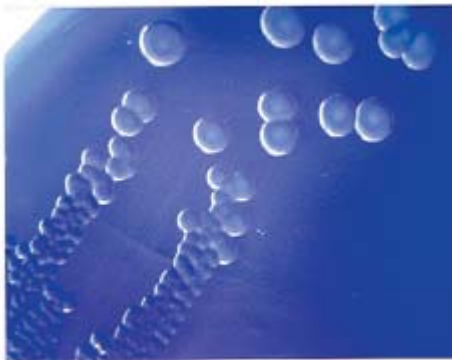


Foto n. 44



Foto n. 45

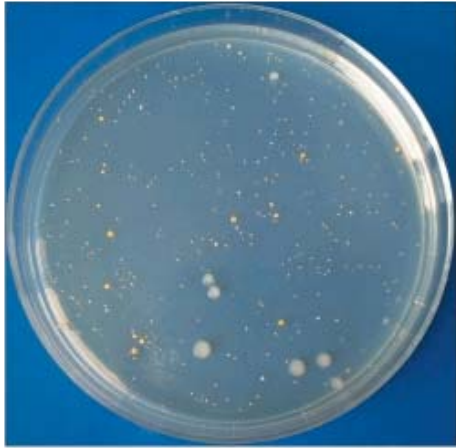


Foto n. 46



Foto n. 47

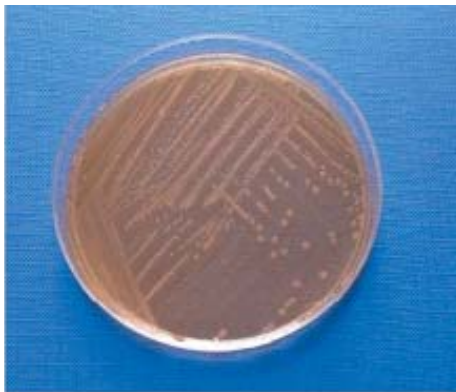


Foto n. 48

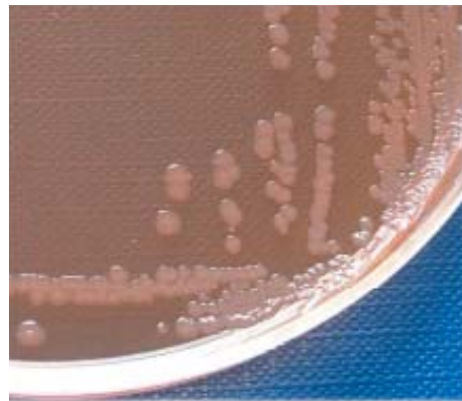


Foto n. 49



Foto n. 50



Foto n. 51



Foto n. 52

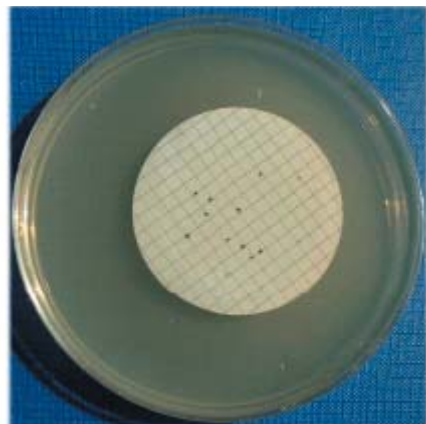


Foto n. 53

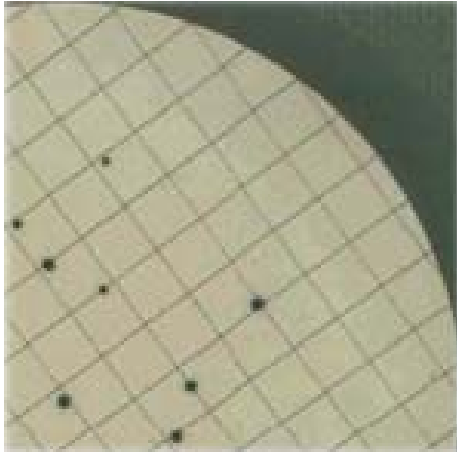


Foto n. 54



Foto n. 55



Foto n. 56

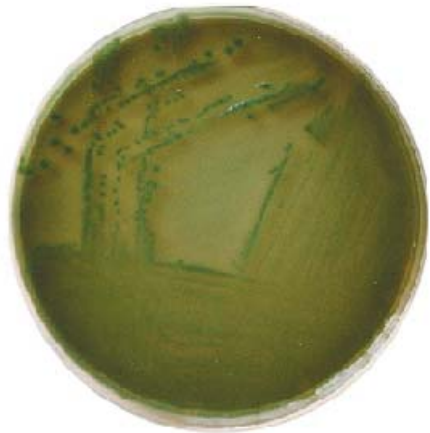


Foto n. 57



Foto n. 58



Foto n. 59

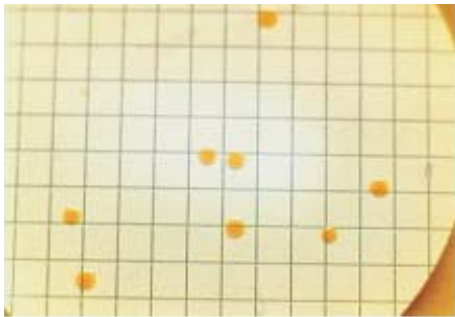


Foto n. 60



Foto n. 61

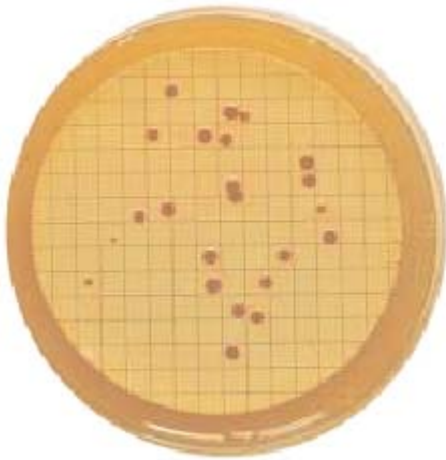


Foto n. 62

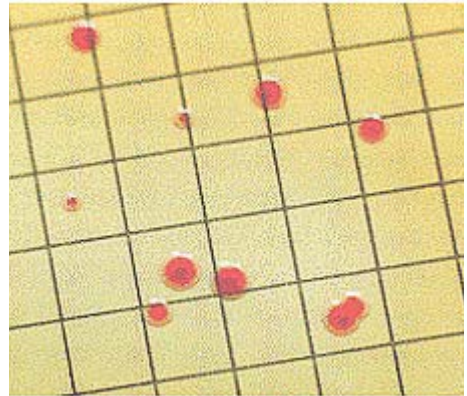


Foto n. 63

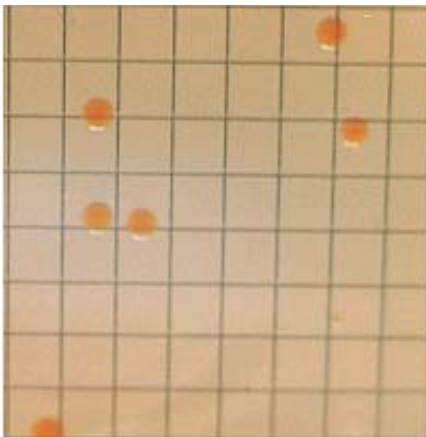


Foto n. 64



LYSINE IRON AGAR

Terreno per la differenziazione di Enterobatteri.

Composizione

Peptone batteriologico	5.0 g/L
Estratto di lievito	3.0
Destrosio	1.0
L – lisina	10.0
Ammonio citrato ferrico	0.5
Sodio tiosolfato	0.04
Porpora di bromocresolo	0.02
Agar	14.5

pH finale 6.7 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore grigio bluastrò, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente, riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente, fino a completa soluzione della polvere.

Mescolare e distribuire in provette.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare in posizione inclinata in modo da ottenere un fondo spesso e un becco di clarino corto.

Si ottengono provette di colore viola rossastro, che possono essere lievemente opalescenti (Foto 30).

Le provette pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076;

controllo negativo: *Enterobacter cloacae* ATCC 23355.

Caratteristiche del terreno

Il terreno, caratterizzato dall'assenza di lattosio, viene utilizzato per l'identificazione di *Salmonella* e, in particolare, di alcuni ceppi di *Salmonella arizonae* caratterizzati dalla capacità di fermentare rapidamente il lattosio. Questo fa sì che tali microrganismi, sui consueti

terreni di coltura, provochino una rapida e forte acidificazione del mezzo tale da inibire la tipica produzione di idrogeno solforato.

La presenza di lisina nel terreno permette di distinguere quei microrganismi che:

1. possiedono enzimi capaci di decarbossilare la lisina con liberazione di amine alcaline e anidride carbonica con conseguente alcalinizzazione di tutto il terreno (rosso-porpora),
2. non possiedono enzimi capaci di decarbossilare la lisina (superficie inclinata alcalina rosso-porpora, fondo acido giallo),
3. possiedono enzimi capaci di deaminare la lisina (superficie inclinata rossa, fondo rosso-porpora).

Il bromocresolo porpora è un indicatore di pH, fa virare al rosso-porpora il terreno nel caso di alcalinizzazione, al giallo nel caso di acidificazione.

La presenza di tiosolfato di sodio serve per evidenziare la capacità di alcuni microrganismi, grazie alla presenza dell'enzima tiosolfato reductasi, di liberare, a partire da tiosolfato, ioni solfuro. Gli ioni solfuro si legano ad idrogeno con formazione di acido solfidrico; questo, in presenza di citrato ferrico determina la formazione di un precipitato di solfuro di ferro. I microrganismi in grado di produrre acido solfidrico determinano un forte annerimento del terreno (Foto 31).

Il peptone batteriologico, il destrosio e l'estratto di lievito sono nutrienti.

Crescita su Lysine Iron Agar di alcuni microrganismi

Microrganismo	Superficie inclinata	Fondo	H₂S	Gas
<i>Salmonella spp.</i>	K	K / N	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	K	K	+ / -	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	K	A	+ / -	+ / -
<i>Salmonella arizonae</i>	K	K / N	+ / -	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Proteus spp.</i>	R	A	- / +	-
<i>Escherichia coli</i>	K	K / N	-	- / +
<i>Citrobacter</i>	K	A	+ / -	- / +
<i>Klebsiella</i>	K / N	K / N	-	+ / -
<i>Providencia</i>	R	A	-	-

Legenda:

	reazione	colorazione
K	alcalina	rosso porpora
A	acida	gialla
R	deaminazione della lisina	rossa
N	nessuna	
+	presente	
-	assente	

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano", volume secondo, IRSA 7080, UNICHIM N.959 per la determinazione di enterobatteri patogeni e in particolare di *Salmonella*.

Seminare, infiggendo l'ago sul fondo e strisciando poi abbondantemente in superficie, la colonia sospetta.

Dopo 18-24 ore di incubazione a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ osservare il colore del terreno in superficie ed in profondità, la presenza di gas e la presenza del precipitato nero (H_2S).

Per l'interpretazione dei risultati consultare la tabella precedente.

Es: *Salmonella sp.*: Superficie rossa, Profondità rossa, Produzione di H_2S , Produzione di gas assente.

MAC CONKEY AGAR

Terreno selettivo per differenziare batteri fermentanti da non fermentanti il lattosio.

Composizione

Digerito pancreatico di gelatina	17.0 g/L
Digerito pancreatico di caseina	1.5
Digerito peptico di tessuto animale	1.5
Lattosio	10.0
Sali biliari	1.5
Cloruro di sodio	5.0
Rosso neutro	0.030
Cristal violetto	0.001
Agar	13.5

pH finale 7.1 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore giallo rosato, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore rosso (Foto 32). Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 30 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Streptococcus epidermidis* ATCC 12228.

Caratteristiche del terreno

La presenza di sali biliari e di cristal violetto inibisce la crescita di cocchi gram positivi e favorisce la differenziazione fra batteri fermentanti e non fermentanti il lattosio.

Il lattosio, presente nel terreno come unico carboidrato fermentabile, serve per differenziare i microrganismi che sono in grado di fermentare il lattosio da quelli che non lo sono. Il metabolismo del lattosio provoca acidificazione del terreno con conseguente precipitazione dei sali biliari.

Il rosso neutro è un indicatore di pH.

La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta allo sviluppo di acido ed alla formazione di colonie del colore rosso dell'indicatore (Foto 33); i batteri non fermentanti formano colonie incolori.

Al terreno può essere aggiunto il supplemento MUG 4 – metilumbelliferil – β – D glucoronide per evidenziare la presenza di *Escherichia coli*.

50 mg di supplemento MUG vengono sciolti con 2 ml di acqua distillata e addizionati a 500 ml di terreno (concentrazione finale 100 mg/L); il terreno viene quindi sterilizzato in autoclave a $121 \pm 2^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Il supplemento viene conservato a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Escherichia coli grazie alla presenza dell'enzima glucuronidasi è in grado di idrolizzare il MUG con formazione di 4 – metilumbelliferone che, osservato sotto luce ultravioletta con lunghezza d'onda di 366 nm, appare con fluorescenza blu-verde.

Campioni di prodotto finito devono essere provati con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047.

Utilizzazione del terreno

Il terreno viene impiegato per differenziare i Coliformi, in grado di fermentare il lattosio, dagli altri Enterobatteri non fermentanti il lattosio, quali, ad esempio, *Salmonella* e *Shigella*.

Le piastre vengono inoculate, generalmente, per isolamento, strisciando una colonia da identificare sulla superficie del terreno. Quindi vengono incubate a temperatura che, a seconda dei laboratori, può variare fra 35°C , 36°C o 37°C per 16 – 18 ore.

Un tempo di incubazione maggiore può alterare le caratteristiche colturali dei microrganismi in esame.

La crescita di Coliformi porta allo sviluppo di colonie di colore rosso intenso, spesso circondate da alone di precipitazione; gli Enterobatteri non fermentanti il lattosio di colonie incolori.

Per evidenziare lo sviluppo di *Escherichia coli*, le piastre, alle quali era stato addizionato il supplemento MUG 4 – metilumbelliferil – β – D glucoronide, vengono osservate sotto una lampada a luce UV.

Le colonie di *Escherichia coli* appaiono con tipica fluorescenza blu-verde (Foto 34).

M – ENDO AGAR LES

Terreno selettivo per la determinazione di Coliformi.

Composizione

Estratto di lievito	1.2 g/L
Tryptone	3.7
Peptone P	3.7
Tryptosio	7.5
Lattosio	9.4
Potassio fosfato monoacido	3.3
Potassio fosfato biacido	1.0
Sodio cloruro	3.7
Sodio desossicolato	0.1
Sodio laurilsolfato	0.05
Sodio solfito	1.6
Fucsina basica*	0.8
Agar	10.0

* In alcune preparazioni la fucsina basica non è presente nel terreno base ma, per motivi di sicurezza, viene aggiunta successivamente.

pH finale 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore verde salvia chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Nel caso non sia presente nel terreno base, aggiungere 8 ml/L di una soluzione alcolica di fucsina basica al 10 % p/v (alcol etilico al 95 %).

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

NON AUTOCLAVARE.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili un volume di terreno tale da ottenere uno spessore di circa 1.5 mm, per piastre di diametro di 60 mm circa 4 ml.

Si ottengono piastre di colore azzurro - blu, leggermente opalescenti.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 7 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ al riparo dalla luce.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;
controllo negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Caratteristiche del terreno

La presenza di desossicolato di sodio, di sodio laurilsolfato e di sodio solfito e fucsina basica inibisce la crescita di flora microbica concomitante, in particolare di cocchi gram positivi.

L'estratto di lievito, l'idrolizzato di caseina, il peptone, il triptosio presenti nel terreno hanno la funzione di nutrienti.

La presenza di potassio fosfato biacido e di potassio fosfato monoacido assicura la stabilità del pH dopo la preparazione del terreno facilitandone la conservazione.

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica.

Il lattosio, presente nel terreno come unico carboidrato fermentabile, ed il complesso fucsina basica-sodio solfito servono per differenziare i Coliformi, che sono in grado di fermentare il lattosio, da quei microrganismi che non lo sono.

Il lattosio viene infatti metabolizzato con conseguente produzione di acido e aldeide.

L'aldeide reagisce con il complesso fucsina basica-sodio solfito legandosi al sodio solfito e lasciando libera la fucsina.

Ciò determina la formazione di colonie rosso scure caratterizzate dalla presenza di riflessi metallici verdi dorati (Foto 35 e 36 bis); questi sono dovuti all'elevata quantità di fucsina, che tende a cristallizzare all'interno delle colonie.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7010 metodo B 10.1.1, UNICHIM N. 952/1 Edizione 2000, Rapporti ISISAN 97/8 "Metodi di analisi per le acque destinate al consumo umano" per la determinazione di Coliformi totali in matrici acqua.

Il volume da analizzare è di 100 ml per l'analisi delle acque in rete. Per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno M – Endo Agar Les e incubata a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 1 ora.

I Coliformi totali sviluppano su M – Endo Agar Les colonie di colore rosso scuro, con riflesso metallico verde dorato.

In alcuni casi si possono riscontrare Coliformi che crescono con colonie di colore rosso prive di riflessi metallici mentre alcuni microrganismi appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Aeromonas* possono formare colonie rosso scuro dai tipici riflessi metallici.

Si può eseguire come conferma la prova della citocromossidasi, che deve risultare negativa, appartenendo i microrganismi alla famiglia delle Enterobacteriacee, e la prova dell'ONPG che deve risultare positiva.

M – ENTEROCOCCUS AGAR (SLANETZ AND BARTLEY MEDIUM)

Terreno selettivo per la determinazione e la conta di Enterococchi.

Composizione

Triptosio	20.0 g/L
Estratto di lievito	5.0
Destrosio	2.0
Sodio fosfato monoacido . 2H ₂ O	4.0
Sodio azide	0.4
2,3,5, Tifenil Tetrazolio Cloruro*	0.1
Agar	20.0

*Il terreno si può trovare in commercio privo di Tetrazolio cloruro, in tal caso, una volta preparato, aggiungere la soluzione di TTC (1 g in 100 ml di acqua) in rapporto di 10 ml di TTC ogni 1000 ml di terreno base.

pH finale 7.2 ± 0.2 a 25°C.

Aspetto della polvere disidratata: colore beige chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere. Evitare un riscaldamento eccessivo.

NON AUTOCLAVARE.

Raffreddare a $50 \pm 3^\circ \text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore giallo ambrato chiaro, leggermente opalescenti.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 7 giorni a $4 \pm 1^\circ \text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212;

controllo negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Caratteristiche del terreno

Il triptosio, l'estratto di lievito e il destrosio presenti nel terreno hanno funzione di nutrienti. L'azide sodica è un agente selettivo che ostacola la crescita di batteri gram negativi; agisce inibendo l'enzima Citocromo-ossidasi, il quale ha un ruolo fondamentale nelle ossidazioni biologiche che, tramite la catena respiratoria, presente quasi esclusivamente nelle cellule dei batteri gram negativi, portano alla produzione di energia.

Il Sodio fosfato monoacido $\cdot 2H_2O$ è un componente che determina il mantenimento dell'equilibrio osmotico.

Streptococchi ed Enterococchi sono in grado di ridurre il TTC aggiunto al terreno base con produzione di un colorante azoico acido (formazano), insolubile, che si deposita sotto forma di granuli all'interno delle cellule batteriche dando luogo alla formazione di colonie di colore che va dal rosa (*E. faecalis*) al rosso mattone (*E. faecium*), a seconda della più o meno marcata capacità di ridurre il TTC, il cui diametro è compreso fra 0.3 e 3 mm (Foto 37 e 38).

Utilizzazione del terreno

Il terreno viene consigliato in IRSA 7040 metodo C, ISO 7899-2:2000(E), UNICHIM N. 954/1 (1994), ISO 7899-2 ed. 2000, per la determinazione di Enterococchi e Streptococchi fecali.

Il volume da analizzare è di 100 ml per le acque in rete e per acque di balneazione. Per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 μm , questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno M Enterococcus Agar e incubata a $36 \pm 1^\circ C$ per 44 ± 4 ore.

Gli Enterococchi e gli Streptococchi fecali sviluppano su M Enterococcus Agar colonie di colore che va dal rosa, al rosso, al marrone.

Il terreno è molto selettivo e, se incubato alla temperatura di $44 \pm 0.5^\circ C$ tutte le colonie che vanno dal rosa, al rosso, al marrone possono essere considerate Enterococchi o Streptococchi fecali.

Per conferma la membrana sulla quale si è avuta crescita di colonie sospette, può essere trasferita su Aesculina Bile Agar.

Si può eseguire, per differenziarli da Stafilococchi, la prova della catalasi, che deve risultare negativa.

M – FC AGAR

Terreno selettivo per la determinazione di Coliformi fecali.

Composizione

Triptosio	10.0 g/L
Polipeptone	5.0
Estratto di lievito	3.0
Sodio cloruro	5.0
Lattosio	12.5
Sali di bile	1.5
Blu di anilina	0.10
Agar	15.0

pH finale 7.4 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore verde salvia chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata. Mescolare accuratamente.

Al terreno base possono essere aggiunti 10 ml/L di acido rosolico all'1% in NaOH 0.2N.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

NON AUTOCLAVARE.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore azzurro - blu, leggermente opalescenti (Foto 39).

Nel caso si sia aggiunto acido rosolico le piastre appaiono di colore rosso mirtillo leggermente opalescenti (Foto 40).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Caratteristiche del terreno

La presenza di sali biliari inibisce la crescita di cocchi gram positivi.

Il cloruro di sodio assicura il mantenimento dell'equilibrio di pressione osmotica. Il lattosio, presente nel terreno come unico carboidrato fermentabile, serve per differenziare i microrganismi che sono in grado di fermentare il lattosio da quelli che non lo sono. Il Blu di anilina è un indicatore di pH. L'acido rosolico è un inibitore della flora batterica concomitante e indicatore di pH. La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta alla formazione di acido e, grazie all'assorbimento del Blu di anilina, allo sviluppo di colonie blu (Foto 41, 42 e 43); i batteri non fermentanti formano colonie di colore dal grigio al panna.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7020 metodo B, UNICHIM N. 953/1 Edizione 2000, per la determinazione di Coliformi fecali in matrici acqua.

Il volume da analizzare è di 100 ml per l'analisi delle acque in rete; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno M – FC Agar ed incubata a $44 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

I Coliformi fecali sviluppano su M – FC Agar colonie di colore che può variare dal blu, con diverse sfumature di colore, fino al grigio azzurro; alcuni *Escherichia coli* possono formare colonie atipiche di colore giallo chiaro.

Si può eseguire, come conferma, la prova della citocromossidasi, che deve risultare negativa appartenendo i microrganismi alla famiglia delle Enterobatteriacee, e la prova dell'ONPG che deve risultare positiva.

PLATE COUNT AGAR STANDARD

Terreno per la conta totale dei batteri aerobi e anaerobi facoltativi.

Composizione

Digerito pancreatico di caseina	6.0 g/L
Estratto di lievito	3.0
Destrosio	1.0
Agar	15.0

pH finale 7.0 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore giallo chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente, portando delicatamente al punto di ebollizione per circa un minuto, fino a completa soluzione della polvere.

Distribuire in provette.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Si ottengono provette o piastre con terreno di colore giallo chiaro, leggermente opalescente (Foto 44).

Le provette e le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 30 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Caratteristiche del terreno

Il terreno ha concentrazioni di nutrienti relativamente alte determinando conte batteriche minori rispetto al valore reale (dato che molti microrganismi si sono adattati a vivere nell'ambiente in carenza di nutrienti), ma in tempi relativamente brevi.

Il digerito pancreatico di caseina, l'estratto di lievito, il destrosio e l'agar permettono di ottenere delle piastre con terreno chiaro, privo di precipitato nel quale si individuano facilmente le colonie batteriche (Foto 45).

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7050 4.1.1; ISO 6222 (1999) "Water quality –

Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium”; Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 “Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]”, per la determinazione della Carica microbica totale in matrici acqua.

Il volume da analizzare è di 1 ml; il terreno può essere utilizzato sia per semine in “agar-germi”, inoculando per inclusione i campioni, sia per semine in superficie.

SALMONELLA SHIGELLA AGAR (SS AGAR)

Terreno per l'isolamento di patogeni enterici.

Composizione

Estratto di carne bovina	5.0 g/L
Digerito pancreatico di caseina	2.5
Digerito peptico di tessuto animale	2.5
Lattosio	10.0
Sali biliari	8.5
Citrato sodico	8.5
Tiosolfato sodico	8.5
Citrato ferrico	1.0
Rosso neutro	0.025
Verde brillante	0.330
Agar	13.5

pH finale 7.0 ± 0.2 a 25°C.

Aspetto della polvere disidratata: colore beige rosato, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura compresa fra 2 e 30°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione per circa un minuto, fino a completa soluzione della polvere.

NON AUTOCLAVARE.

Raffreddare a 50 ± 3 °C e versare in piastre sterili.

Lasciare asciugare le piastre per circa 2 ore.

Si ottengono piastre di colore rosso aranciato, leggermente opalescente (Foto 46).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a 4 ± 1 °C.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076;

controllo negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Caratteristiche del terreno

La presenza di sali biliari, di sodio citrato e di verde brillante inibisce la crescita di micror-

ganismi gram positivi e di alcuni enterobatteri non patogeni.

Il lattosio, presente nel terreno come unico carboidrato fermentabile, serve per differenziare i microrganismi che sono in grado di fermentare il lattosio da quelli che non lo sono.

Il rosso neutro è un indicatore di pH.

La crescita di microrganismi che non sono in grado di fermentare il lattosio determina la formazione di colonie trasparenti che appaiono dello stesso colore del terreno.

La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta allo sviluppo di acido, alla precipitazione di sali biliari e alla formazione di colonie del colore rosso dell'indicatore.

La presenza di tiosolfato di sodio serve per evidenziare la capacità di alcuni microrganismi, grazie alla presenza dell'enzima tiosolfato reductasi, di liberare, a partire da tiosolfato, ioni solfuro. Essi si legano ad idrogeno con formazione di acido solfidrico. L'acido solfidrico, in presenza di citrato ferrico determina la formazione di un precipitato di solfuro di ferro.

Le colonie dei microrganismi in grado di produrre acido solfidrico presentano quindi centro nero.

I microrganismi appartenenti al genere *Shigella* crescono con colonie trasparenti (Foto 47 e 48 bis).

I microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* crescono con colonie trasparenti, generalmente con centro nero (Foto 49 e 50).

I microrganismi fermentanti il lattosio crescono con colonie di colore dal rosa al rosso (Foto 51).

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano", volume secondo, per la determinazione di *Shigella*, UNICHIM N.959 per la determinazione di *Salmonella*.

Il volume da analizzare è di 1000 ml per l'analisi delle acque in rete destinate al consumo umano; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su terreni di prearricchimento e successivamente di arricchimento.

Per la determinazione di *Shigella*, dal terreno di arricchimento, si effettuano 2 subcolture per strisci multipli sui terreni SS Agar, la prima dopo 6 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 18 ore, le subcolture si incubano a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Per la determinazione di *Salmonella*, dal terreno di arricchimento, Brodo di Rappaport-Vassiliadis, brodo alla Selenite e Cistina, si effettuano 2 subcolture per strisci multipli sui terreni SS Agar: la prima dopo 24 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore; le subcolture si incubano a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Shigella sviluppa su SS Agar colonie incolori, trasparenti.

Salmonella sviluppa su SS Agar colonie incolori, trasparenti, spesso con centro nero.

Si può eseguire, come conferma, la prova della fermentazione dei carboidrati utilizzando il terreno Agar al ferro di Kligler e la prova della decarbossilazione della lisina utilizzando il terreno Agar al ferro e lisina.

SOLFITO POLIMIXINA SULFADIAZINA AGAR (SPS AGAR)

Terreno selettivo per la determinazione ed il conteggio di *Clostridium perfringens* e Clostridi solfito riduttori.

Composizione

Triptone	15.00 g/L
Estratto di lievito	10.00
Solfito di sodio	0.50
Citrato ferrico	0.50
Polimixina B solfato	0.01
Sulfadiazina	0.12
Agar	13.50

pH finale 7.0 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore beige chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata. Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $118 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili

Si ottengono piastre di colore giallo chiaro.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 7 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Clostridium perfringens* ATCC 13124;

controllo negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - *Escherichia coli* ATCC 25922.

Caratteristiche del terreno

Il solfito di sodio viene ridotto da *Clostridium perfringens* e dalla maggior parte dei *Clostridi* a solfuro, questo reagisce con il Citrato ferrico con produzione di solfuro di ferro insolubile che precipita sia sulle colonie che nel terreno circostante, che appaiono quindi di colore nero. (Foto 52 e 53).

Polimixina e Sulfadiazina determinano la selettività del terreno inibendo la crescita di microrganismi gram positivi e gram negativi solfito riduttori.
Le piastre inoculate vengono incubate in atmosfera anaerobia.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano", volume secondo 00/14Pt.2 pag. 379, IRSA 7060 metodo B, Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 "Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]", per la determinazione di spore di Clostridi solfito-riduttori.

Il volume da analizzare è pari a 50 ml per l'analisi delle acque minerali, 100 ml per l'analisi delle acque in rete; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate anche aliquote diverse.

Per la determinazione delle spore di Clostridi solfito-riduttori il campione deve essere sottoposto a trattamento termico.

Per questo occorre mantenere il campione per 15' a $75 \pm 5^\circ\text{C}$, per 10' a 80°C nel caso delle acque minerali, in bagno termostato e quindi raffreddare rapidamente sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi; ciò porta all'inattivazione delle forme vegetative e a favorire la germinazione delle forme sporali.

Per l'esecuzione della prova sciogliere il terreno SPS e versarne un'aliquota in una piastra Petri, lasciare solidificare a temperatura ambiente. Mantenere il rimanente terreno allo stato liquido alla temperatura di $50-60^\circ\text{C}$.

Filtrare la quantità richiesta di campione pretrattato tramite una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di $0,45 \mu\text{m}$ e trasferire la membrana su terreno SPS Agar, quindi versare su di essa, con cautela, un'aliquota dello stesso terreno mantenuto allo stato liquido, in modo da ricoprirla interamente e lasciare solidificare a temperatura ambiente.

Incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore in anaerobiosi, nel caso delle acque minerali $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 1 ora.

I Clostridi solfito-riduttori sviluppano su SPS Agar colonie di colore nero con alone nerastro.

Si può eseguire, come conferma, la prova della doppia crescita, in anaerobiosi ed in aerobiosi, trasferendo la colonia da saggiare in superficie in due piastre contenenti Agar nutritivo con sangue di coniglio o in in due piastre di Agar Columbia con 5% di sangue di montone ed incubandone una a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore in aerobiosi, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi.

Nel caso si tratti di Clostridi solfito-riduttori si avrà crescita solo in anaerobiosi.

Un'altra prova di conferma è quella della catalasi, che deve risultare negativa. (Genere *Clostridium* catalasi negativa – Genere *Bacillus* catalasi positiva).

TCBS AGAR

Terreno selettivo per la determinazione di *Vibrioni* patogeni.

Composizione

Estratto di lievito	5.0 g/L
Peptone	10.0
Sodio tiosolfato	10.0
Sodio citrato	10.0
Oxgall	8.0
Saccarosio	20.0
Sodio cloruro	10.0
Citrato ferrico	1.0
Blu di bromotimolo	0.04
Blu timolo	0.04
Agar	14.0

pH finale 8.6 ± 0.2 a 25°C.

Aspetto della polvere disidratata: colore marrone chiaro con sfumatura verde, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata. Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

NON AUTOCLAVARE.

Raffreddare a 50 ± 3 °C e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore verde (Foto 54).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a 4 ± 1 °C.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili quali, ad esempio:

controllo positivo: *Vibrio cholerae* NCTC 11218 (ceppo non patogeno);

controllo negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Caratteristiche del terreno

Il contenuto di sali ed il pH alcalino inibiscono la crescita della maggior parte dei microrganismi ad eccezione dei batteri alofili.

L'Oxgall è bile fresca disidratata e rappresenta un agente selettivo che inibisce la crescita di batteri gram positivi.

Il saccarosio è presente nel terreno come unico carboidrato fermentabile.

Il Blu di bromotimolo ed il Blu timolo sono indicatori di pH e virano al giallo in ambiente acido.

La crescita di microrganismi fermentanti il saccarosio porta allo sviluppo di acido e alla formazione di colonie del colore giallo dell'indicatore; il protrarsi dell'incubazione fa virare le colonie al verde.

Vibrio cholerae, microrganismo saccarosio fermentante, forma colonie gialle, piatte del diametro di 2-4 mm (Foto 55).

Vibrio parahaemolyticus, saccarosio non fermentante, forma colonie blu-verdi del diametro di 1-4 mm (Foto 56).

La presenza di tiosolfato di sodio serve per evidenziare la capacità di alcuni microrganismi di liberare, a partire da questo, ioni solfuro; essi si legano a idrogeno con formazione di acido solfidrico. L'acido solfidrico, in presenza di citrato ferrico determina la formazione di un precipitato di solfato di ferro.

Le colonie dei microrganismi in grado di produrre acido solfidrico presentano quindi centro nero.

E' opportuno non eseguire il test dell'ossidasi su colonie cresciute su TCBS; per evitare possibili interferenze, occorre ripassare la colonia in studio su altro terreno non selettivo.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 "Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano", volume secondo, per la determinazione di microrganismi appartenenti al genere *Vibrio*.

Il volume da analizzare è di 1000 ml per l'analisi delle acque in rete; per altri tipi di acque, in relazione alla qualità, possono essere analizzate anche aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita in 100 ml di Acqua Peptonata Alcalina e incubata a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 6-8 ore, fino ad un massimo di 18 ore; campioni ambientali possono essere incubati anche a 42°C .

La presenza di particolato in sospensione nel campione, può rendere necessario, durante la fase di filtrazione, l'uso di più membrane.

Dopo questa fase di arricchimento si esegue uno striscio sul terreno TCBS della pellicola che si è formata sulla superficie dell'Acqua Peptonata Alcalina e si pone a incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$

per 18-20 ore.

Si consiglia di eseguire un ulteriore arricchimento, prelevando 10 ml di Acqua Peptonata Alcalina inoculata, e trasferendoli in 100 ml di Acqua Peptonata Alcalina.

Incubare a $36\pm1^{\circ}\text{C}$ per 6-8 ore, fino a un massimo di 18 ore, quindi isolare su TCBS ed incubare a $36\pm1^{\circ}\text{C}$ per 18-20 ore.

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* crescono su TCBS: colonie gialle con centro opaco e margini traslucidi, piatte, con diametro di 2-4 mm, *Vibrio cholerae*; colonie verdi, piatte, con diametro di 1-4 mm, *Vibrio parahaemolyticus*.

Le colonie sospette sono da sottoporre a successive prove di conferma, quali:

- la colorazione di Gram, bastoncelli gram negativi, in alcuni casi con la presenza di una curvatura;
- la prova della citocromossidasi, *Vibrio* spp è ossidasi-positivo ad eccezione di *V. met-schnichovii* che è ossidasi negativo;
- la prova della sensibilità all'agente vibriostatico, O/129, che consente di differenziare il genere *Vibrio*, sensibile, dal genere *Aeromonas*, resistente.

Sono stati descritti casi di biotipi di *V. cholerae* resistenti all'agente vibriostatico.

Si possono eseguire prove d'identificazione biochimica con i kit miniaturizzati disponibili in commercio e prove di conferma sierologiche.

TERGITOL – 7 AGAR

Terreno selettivo differenziale per la determinazione e il conteggio di Coliformi nelle acque, con particolare riferimento alle acque minerali.

Composizione

Peptone	10.0 g/L
Estratto di lievito	6.0
Estratto di carne	5.0
Lattosio	20.0
Blu di bromotimolo	0.05
Tergitol-7	0.1
Agar	15.0

pH finale 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore beige, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore verde, chiare con una leggera opalescenza (Foto 57).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 10 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Caratteristiche del terreno

Il Tergitol-7 è un agente selettivo che inibisce le forme sporali di batteri gram negativi, i batteri gram positivi e limita la sciamatura di *Proteus sp.*

Il lattosio, presente nel terreno come unico carboidrato fermentabile, serve per differenziare i microrganismi che sono in grado di fermentare il lattosio da quelli che non lo sono.

Il Blu di bromotimolo è un indicatore di pH.

La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta alla formazione di acido, al viraggio dell'indicatore di pH dal blu al giallo e allo sviluppo di colonie del colore dell'indicatore, in particolare:

Escherichia coli cresce con colonie gialle, talvolta con centro ruggine (Foto 58 e 59).

Enterobacter sp. e *Klebsiella sp.* crescono con colonie gialle, talvolta giallo-verdastre.

Salmonella sp., *Shigella sp.*, *Proteus sp.* e *Pseudomonas sp.* crescono con colonie rosse con centro bluastro.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato nel Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 "Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]” per la determinazione di Coliformi.

Il volume da analizzare è di 250 ml per l'analisi delle acque minerali; si eseguono due repliche; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno Tergitol-7 Agar e incubata a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

I batteri Coliformi sviluppano su Tergitol-7 Agar colonie di colore giallo, a volte mucose, del diametro di 0.5 – 3.5 mm.

Si possono eseguire prove di conferma seminando le colonie sospette in provette con campanella di Durham contenente Brodo Lattosio – Verde Brillante – Bile da incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore, la prova è positiva nel caso di intorbidamento del terreno e sviluppo di gas.

Si può eseguire la prova dell'ossidasi, che deve risultare negativa.

TERGITOL – 7 AGAR CON TTC

Terreno selettivo differenziale per la determinazione e il conteggio di Coliformi nelle acque con particolare riferimento alle acque minerali.

Composizione

Peptone	10.0 g/L
Estratto di lievito	6.0
Estratto di carne	5.0
Lattosio	20.0
Blu di bromotimolo	0.05
Tergitol-7	0.1
Agar	15.0

pH finale 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore beige, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a temperatura inferiore a 25°C fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e aggiungere asepticamente 1 ml ogni 100 ml di terreno di soluzione acquosa sterile all'1% di 2,3,5 Trifeniltetrazolio cloruro (TTC) e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore giallo verdastro, con una leggera opalescenza (Foto 60).

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 10 giorni, lontano dalla luce, a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Caratteristiche del terreno

Il Tergitol-7 è un agente selettivo che inibisce le forme sporali di batteri gram negativi, batteri gram positivi e limita la sciamatura di *Proteus sp.*

Il lattosio, presente nel terreno come unico carboidrato fermentabile, serve per differenziare i microrganismi che sono in grado di fermentare il lattosio da quelli che non lo sono.

Il Blu di bromotimolo è un indicatore di pH.

La crescita di microrganismi lattosio-fermentanti porta alla formazione di acido, al viraggio dell'indicatore di pH dal blu al giallo.

Il TTC aggiunto al terreno base viene ridotto dalla maggior parte dei Coliformi con produzione di un colorante azoico acido (formazano) e sviluppo di colonie di colore che va dal giallo scuro al rosso mattone (Foto 61 e 62).

Fanno eccezione *Escherichia coli* ed *Enterobacter aerogenes* che danno luogo alla formazione di colonie di colore giallo o giallo arancio (Foto 63).

I batteri che non fermentano il lattosio formano colonie gialle con l'area circostante bluastra.

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato nel Decreto Ministero della Sanità 13 gennaio 1993 "Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali [...]", ISO 9308-1 second edition 2000-09-15 "Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria" Part 1: Membrane filtration method, per la determinazione di *Escherichia coli* e Coliformi.

Il volume da analizzare è di 250 ml per l'analisi delle acque minerali - si eseguono due repliche - 100 ml per le acque destinate al consumo umano; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 µm, questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno Tergitol-7 Agar con TTC e incubata a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore per le acque minerali e a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore nel caso di acque potabili; in questo caso filtrare un'ulteriore aliquota e incubarla a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore può eliminare il problema della crescita di flora microbica concomitante (ISO 9308-1).

I batteri Coliformi sviluppano su Tergitol-7 Agar con TTC colonie di colore che va dal giallo fino al rosso scuro, del diametro di 0.5 – 3.5 mm; *Escherichia coli* colonie giallo o giallo arancio del diametro di 1 – 2 mm.

Si possono eseguire prove di conferma seminando le colonie sospette in provette con campanella di Durham contenente Brodo Lattosio – Verde Brillante – Bile da incubare a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore, la prova è positiva nel caso di intorbidamento del terreno e sviluppo di gas.

Si può eseguire la prova dell'ossidasi, che deve risultare negativa.

Sono da considerare *Escherichia coli* quelle colonie che risultano ossidasi negative, e capaci di produrre indolo dal triptofano, reazione evidenziata tramite reattivo di Kovacs.

TRYPTONE BILE X – GLUCURONIDE MEDIUM TBX AGAR

Substrato selettivo cromogeno per la determinazione di *Escherichia coli*.

Composizione

Peptone	10.0 g/L
Estratto di lievito	6.0
Estratto di carne	5.0
Lattosio	20.0
Blu di bromotimolo	0.05
Tergitol-7	0.1
Agar	15.0

pH finale 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Aspetto della polvere disidratata: colore giallo chiaro, omogeneo, fine.

Il terreno deve essere conservato, nella sua confezione ben chiusa, a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Modalità di preparazione

Sospendere la quantità di polvere riportata sulla confezione in 1 L di acqua deionizzata.

Mescolare accuratamente.

Riscaldare, agitando frequentemente, in bagnomaria bollente portando delicatamente al punto di ebollizione fino a completa soluzione della polvere.

Sterilizzare in autoclave a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Raffreddare a $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e versare in piastre sterili.

Si ottengono piastre di colore crema chiaro, trasparente.

Le piastre pronte devono essere conservate per non oltre 15 giorni a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Campioni di prodotto finito devono essere provati, per verificare il rendimento, con colture di controllo tipiche e stabili, ad esempio:

controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922;

controllo negativo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

Caratteristiche del terreno

La presenza di sali biliari inibisce la crescita di microrganismi gram positivi.

Il triptone è un nutriente.

L'X – glucuronide è un agente cromogenico costituito da 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-glucuronide e viene impiegato per evidenziare la capacità di *Escherichia coli* di produrre l'enzima

glucuronidasi (da tenere presente che circa il 3 – 4 % di ceppi di *Escherichia coli*, fra cui O 157, sono glucuronidasi negativi).

L'X – glucuronide viene assorbito intatto dalle cellule batteriche e scisso dalla β -glucuronidasi intracellulare in glucuronide e cromoforo.

Il cromoforo non legato è colorato e, concentrato all'interno delle cellule di *Escherichia coli*, conferisce loro una tipica colorazione blu/verde (Foto 64).

Utilizzazione del terreno

L'uso del terreno viene consigliato in IRSA 7030 Metodo F, per la determinazione di *Escherichia coli*.

Il volume da analizzare è di 100 ml per l'analisi delle acque superficiali; per altri tipi di acqua, in relazione alla qualità, possono essere analizzate aliquote diverse; nel caso di acque reflue spesso è necessario esaminare diluizioni scalari.

Dopo aver filtrato il campione attraverso una membrana sterile di 47 mm di diametro e di porosità nominale di 0,45 μm , questa viene trasferita su piastre contenenti il terreno Teyptone Bile X – glucuronide Medium TBX e incubata a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

Escherichia coli sviluppa con colonie di colore blu/verde.

PRINCIPALI TEST DI CONFERMA

Test di agglutinazione al lattice per la ricerca di coagulasi

La maggior parte dei biotipi appartenenti alla specie *Staphylococcus aureus* presentano attività coagulante sul plasma data da almeno due fattori detti coagulasi libera, extracellulare, e coagulasi legata, o “clumping factor” legata alla parete cellulare.

Questa attività è assente nelle specie saprofiti e commensali.

Si possono eseguire test in provetta per la ricerca della coagulasi libera e test su vetrino per la ricerca della coagulasi legata.

Queste prove possono essere sostituite con test di agglutinazione al lattice che presentano una maggior facilità di impiego, da utilizzarsi secondo le indicazioni riportate sulla confezione.

Questi test sono costituiti da particelle di lattice sensibilizzate che in presenza di *Staphylococcus aureus* formano rapidamente un agglutinato visibile ad occhio nudo.

Catalasi

La prova della catalasi evidenzia la capacità di alcuni ceppi batterici di sintetizzare questo enzima.

L'enzima catalasi è presente nella maggior parte dei batteri aerobi ed anaerobi facoltativi contenenti citocromo ad eccezione di quelli riferibili al genere *Streptococcus*.

Gli organismi privi di citocromo mancano anche di catalasi e sono quindi incapaci di degradare il perossido di idrogeno (H_2O_2) ad acqua e ossigeno.

Come reagente si usa perossido di idrogeno al 30% m/m (H_2O_2) conservato al riparo dalla luce diretta e a una temperatura inferiore a 5°C.

La prova può essere eseguita a partire da una brodocoltura, da una coltura su terreno agarizzato, da una colonia singola.

Da brodocoltura aggiungere, a 1 ml di una coltura 0,5 ml di perossido di idrogeno al 30% m/m. Osservare la comparsa (catalasi positiva) o l'assenza (catalasi negativa) di bollicine di ossigeno.

Da coltura su terreno agarizzato coprire la coltura con un quantità che varia da 1 a 2 ml di perossido di idrogeno al 30% m/m.

Osservare immediatamente e dopo 5 minuti la formazione (catalasi positiva) o l'assenza di formazione (catalasi negativa) di bollicine di ossigeno.

Da colonia singola, prelevare con un'ansa sterile di vetro o di plastica, assolutamente non di metallo, una colonia e strisciarla sulla superficie di un vetrino portaoggetti; ricoprire con una goccia di perossido di idrogeno al 30% m/m.

Osservare immediatamente e dopo 5 minuti la formazione (catalasi positiva) o l'assenza di formazione (catalasi negativa) di bollicine di ossigeno.

Non invertire l'ordine del procedimento poiché si potrebbero avere falsi positivi.

Nelle interpretazioni dubbie osservare al microscopio o con una lente di ingrandimento confrontandolo con un negativo costituito da solo perossido di idrogeno.

Nel caso di saggio su batteri anaerobi, attendere 30 secondi dallo striscio prima di aggiungere il perossido di idrogeno.

Le colonie non devono provenire da colture cresciute su piastre di agar sangue.

Colorazione di Gram

La colorazione differenziale di Gram consente di suddividere i batteri, in base a differenze di struttura della parete cellulare, in due gruppi: gram positivi e gram negativi.

Si basa sulla capacità di alcuni coloranti, quali il violetto di genziana e il cristal violetto di reagire con lo iodio di una soluzione iodo-iodurata, per dare composti resistenti alla decolorazione con alcol. I batteri gram positivi, una volta colorati, non si decolorano con alcol ed appaiono viola-blu al microscopio, i gram negativi non trattengono il cristal violetto e assumono una colorazione rosa-rosso con il colorante di contrasto.

Si utilizzano coloranti in soluzione pronta disponibili in commercio:

- soluzione di cristal violetto
 - soluzione iodata Lugol
 - soluzione di safranina
- e alcol etilico al 95%

Tecnica di allestimento

- strisciare parte di una coltura batterica, allestita da non oltre 24 ore preferibilmente in terreni non selettivi, eventualmente stemperandola in una goccia di acqua distillata, sulla superficie perfettamente pulita e sgrassata di un vetrino portaoggetti;
- lasciare asciugare all'aria;
- passare per tre volte il vetrino, con la superficie contenente il materiale rivolta verso l'alto, sopra una fiamma aerata allo scopo di fissare la pellicola batterica alla superficie del vetro e determinare la morte rapida dei microrganismi. Questo comporta il mantenimento delle caratteristiche morfologiche dei batteri e la perdita di pericolo di infezione per l'operatore;
- coprire lo striscio batterico con la soluzione di cristal violetto e lasciare agire per 1 minuto;
- sciacquare con attenzione con acqua di fonte;
- coprire lo striscio batterico con la soluzione di Lugol e lasciare agire per 1 minuto;

- sciacquare con attenzione con acqua di fonte;
- versare delicatamente in modo continuo alcol etilico al 95 % sulla superficie inclinata del vetrino per circa 30 secondi - 1 minuto fino a che non termina la cessione del colore;
- sciacquare con attenzione con acqua di fonte per eliminare l'alcol;
- coprire lo striscio batterico con la soluzione di safranina e lasciare agire per 1 minuto;
- sciacquare con attenzione con acqua di fonte.

Lettura

Osservare il preparato al microscopio con obiettivo 100 x ad immersione.

Le cellule batteriche che appaiono di colore blu o violetto sono considerate gram positive, quelle che appaiono colorate dal rosa scuro al rosso sono considerate gram negative.

Citocromo ossidasi

Questa prova evidenzia la capacità di alcuni ceppi battericidi di produrre l'enzima citocromo ossidasi intracellulare.

Le ossidasi sono enzimi che catalizzano reazioni di ossido-riduzione nelle quali l'O₂ funge da accettore di e⁻. La reazione è dovuta alla presenza di un sistema citocromo ossidasi che attiva l'ossidazione del citocromo ridotto da ossigeno molecolare.

I sistemi di rilevamento impiegati, dischetti, tamponi, reagenti, si basano sulla presenza di fenilendiammina.

I batteri ossidasi positivi sono in grado di ossidare i composti della fenilendiammina (N,N,N,N-tetrametil-p-fenylendiammina) a indofenolo, con conseguente viraggio del colore del reagente da incolore a varie tonalità di viola.

La maggior parte dei batteri gram positivi sono ossidasi negativi.

Comunemente la prova viene impiegata per distinguere le Enterobacteriaceae, ossidasi negative, da altri generi, quali *Aeromonas* o *Pseudomonas*, ossidasi positive.

Può essere eseguita a partire da una colonia singola, pura, fresca, di non più di 18-24 ore, cresciuta su terreni che non contengono glucosio, la cui fermentazione può inibire l'attività dell'enzima dando false negatività.

Si consiglia di effettuare la prova su colonie cresciute su terreni quali: Agar sangue, MacConkey Agar, Salmonella-Shigella Agar, Trypticase Soy Agar.

Si possono usare stick, tamponi, cartoncini pronti all'uso imbevuti di reagente, con i quali toccare la colonia da saggiare.

Alternativamente si possono versare alcune gocce di reagente su un tampone sterile monouso oppure sistemare una porzione di carta da filtro in una piastra Petri, versarvi sopra alcune gocce di reattivo quindi, con un'ansa non metallica ma di vetro o di plastica sterile, strisciare sopra una porzione della colonia in esame.

La reazione viene considerata positiva quando si evidenzia lo sviluppo di una colorazione blu-viola che compare entro 30 secondi. Considerare negative le colorazioni che si manifestano dopo 60 secondi.



ARPAT

Agenzia regionale per la protezione ambientale della Toscana

Via Nicola Porpora, 22 - 50144 Firenze - tel. 055.32061