



APAT

Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici



IRSA-CNR

Istituto di Ricerca sulle Acque
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Metodi analitici per le acque

Volume Terzo

Sezione 6000 - Metodi microbiologici - Parte generale

Sezione 7000 - Determinazione di microorganismi

Sezione 8000 - Metodi ecotossicologici

Sezione 9000 - Indicatori biologici

Informazioni legali

L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (**APAT**) o le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili dell'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.apat.it

CNR-IRSA - Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque
Via Reno, 1 - 00198 Roma
www.irsa.rm.cnr.it

© APAT, Rapporti 29/2003

ISBN 88-448-0083-7

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto: Paolo Orlandi

Coordinamento tipografico

APAT

Impaginazione e stampa

I.G.E.R. srl - Viale C.T. Odescalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare febbraio 2004

Il manuale "Metodi Analitici per le Acque" è pubblicato nella serie editoriale "Manuali e Linee Guida" dell'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT).

L'opera si articola in tre volumi, suddivisi in sezioni (da 1000 a 9040). Fatta eccezione per la parte generale (sezioni 1000-1040), ogni sezione contiene uno o più metodi, costituiti da capitoli, paragrafi e sottoparagrafi.

I metodi analitici riportati nel manuale sono stati elaborati da una Commissione istituita nel 1996 dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), per l'aggiornamento e l'ampliamento dei metodi riportati nel Quaderno 100 "Metodi analitici per le acque", pubblicato dall'IRSA-CNR ed edito dal Poligrafico dello Stato nel 1994.

Un Gruppo di Lavoro, coordinato dall'APAT, e formato dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) e dalle Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA), con il contributo del Centro Tematico Nazionale "Acque interne e marino costiere" (CTN/AIM), ha provveduto ad una revisione critica e ad una integrazione dei metodi analitici prodotti dalla Commissione istituita dall'IRSA-CNR.

I metodi analitici riportati nel presente manuale possono essere riprodotti ed utilizzati purché ne sia citata la fonte.

L'edizione finale è a cura di:

Maria Belli, Damiano Centioli, Paolo de Zorzi, Umberto Sansone
(Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici - APAT)

Silvio Capri, Romano Pagnotta, Maurizio Pettine
(Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR-IRSA)

Indice

VOLUME 1

PRESENTAZIONE

PREMESSA

1000 - PARTE GENERALE

1010 - Strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio	5
1020 - Lineamenti di tecniche analitiche	25
1030 - Metodi di campionamento	75
1040 - Qualità del dato analitico	87

2000 PARAMETRI FISICI, CHIMICI E CHIMICO-FISICI

2010 - Acidità e alcalinità (Acidità: titrimetrico; Alcalinità: potenziometrico e titrimetrico)	115
2020 - Colore (qualitativo; spettrofotometrico, metodo al platino-cobalto)	123
2030 - Conducibilità	131
2040 - Durezza (per calcolo; complessometrico con EDTA)	137
2050 - Odore	141
2060 - pH	145
2070 - Salinità	153
2080 - Sapore	157
2090 - Solidi (totali disciolti; totali sospesi; sedimentabili; fissi e volatili a 600°C)	161
2100 - Temperatura	171
2110 - Torbidità	177
2120 - Trasparenza	183

3000 - METALLI E SPECIE METALLICHE

3010 - Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione acida	189
3020 - Determinazione di elementi chimici mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES)	197
3030 - Determinazione di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio, calcio) mediante cromatografia ionica	215
3040 - Metodi di preconcentrazione per la determinazione di metalli in tracce	225
3050 - Alluminio (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con eriocromocianina R)	237
3060 - Antimonio (ETA-AAS; HG-AAS)	251
3070 - Argento (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS)	263
3080 - Arsenico (HG-AAS; spettrofotometrico con dietilditiocarbammato di argento)	271
3090 - Bario (F-AAS; ETA-AAS)	283
3100 - Berillio (ETA-AAS)	291
3110 - Boro (spettrofotometrico con curcumina; spettrofotometrico con carminio)	297
3120 - Cadmio (F-AAS; ETA-AAS)	303
3130 - Calcio (F-AAS)	311
3140 - Cobalto (ETA-AAS)	315

INDICE

3150 - Cromo (Cromo totale: F-AAS; ETA-AAS; Cromo VI: APDC+ETA-AAS; Cromo III: ETA-AAS dopo eliminazione di Cromo VI; Cromo totale: coprecipitazione con Fe(OH) ₃ +ETA-AAS; Cromo VI: spettrofotometrico con difenilcarbazide)	321
3160 - Ferro (F-AAS; ETA-AAS)	345
3170 - Litio (F-AAS)	355
3180 - Magnesio (F-AAS)	359
3190 - Manganese (F-AAS; ETA-AAS)	363
3200 - Mercurio (ossidazione con KMnO ₄ +CV-AAS; ossidazione con HNO ₃ mediante microonde +CV-AAS; ossidazione con HNO ₃ mediante microonde +CV-AAS e amalgama su oro)	373
3210 - Molibdeno (ETA-AAS)	391
3220 - Nichel (F-AAS; ETA-AAS)	397
3230 - Piombo (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ditizone)	405
3240 - Potassio (F-AAS)	419
3250 - Rame (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ossalilididrazide)	423
3260 - Selenio (HG-AAS; spettrofotometrico con o-fenilendiammina)	435
3270 - Sodio (F-AAS)	445
3280 - Stagno (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con violetto di catechina)	449
3290 - Tallio (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS)	461
3300 - Tellurio (ETA-AAS)	471
3310 - Vanadio (ETA-AAS; coprecipitazione con Fe(OH) ₃ +ETA-AAS)	477
3320 - Zinco (F-AAS)	487

VOLUME 2

4000 - COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI

4010 - Anidride carbonica	495
4020 - Anioni (fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato e solfato) in cromatografia ionica	499
4030 - Azoto ammoniacale (spettrofotometrico all'indofenolo; spettrofotometrico con reattivo di Nessler; potenziometrico; spettrofotometrico o titrimetrico, previa distillazione)	509
4040 - Azoto nitrico (spettrofotometrico mediante salicilato di sodio; spettrofotometrico con NEDA)	525
4050 - Azoto nitroso	533
4060 - Azoto totale e fosforo totale	537
4070 - Cianuro	541
4080 - Cloro attivo libero	547
4090 - Cloruro (titolazione argentometrica, mercurimetrica e potenziometrica)	553
4100 - Fluoruro (spettrofotometrico; potenziometrico)	565
4110 - Fosforo (ortofosfato; fosforo totale)	575
4120 - Ossigeno disciolto (titolazione iodometrica; titolazione potenziometrica)	583
4130 - Silice	595
4140 - Solfato (gravimetrico; turbidimetrico)	599
4150 - Solfito (titolazione iodometrica; metodo cromatografico)	605
4160 - Solfuro	613

5000 - COSTITUENTI ORGANICI

5010 - Aldeidi (composti carbonilici) (spettrofotometrico con MBTH; derivatizzazione + SPE+HPLC-UV; derivatizzazione + LLE+GC-ECD)	621
5020 - Ammine alifatiche (GC-AFD)	635
5030 - Azoto organico	641
5040 - Carbonio organico disciolto	645

INDICE

5050 - Diserbanti ureici (LLE o SPE+HPLC-UV)	653
5060 - Prodotti fitosanitari (antiparassitari, pesticidi) (LLE o SPE+GC-NPD o HPLC-UV o GC-MS)	661
5070 - Fenoli (spettrofotometrico con 4-amminoantipirina previa estrazione; spettrofotometrico diretto con 4-amminoantipirina; LLE o SPE+HPLC-UV)	679
5080 - Idrocarburi policiclici aromatici (LLE o SPE+GC-MS; LLE o SPE+HPLC-UV o HPLC-fluorescenza)	697
5090 - Pesticidi clorurati (LLE+GC-ECD)	707
5100 - Pesticidi fosforati (LLE+GC-FPD)	723
5110 - Policlorobifenili e policloroterfenili (LLE+GC-MS o GC-ECD)	743
5120 - Richiesta biochimica di ossigeno (BOD ₅)	767
5130 - Richiesta chimica di ossigeno (COD)	781
5140 - Solventi organici aromatici (spazio di testa statico +GC-FID; spazio di testa dinamico+GC-FID)	789
5150 - Solventi clorurati (spazio di testa statico+GC-ECD; spazio di testa dinamico+GC-ECD)	799
5160 - Sostanze oleose (grassi e oli animali e vegetali; idrocarburi totali) (gravimetrico; IR)	811
5170 - Tensioattivi anionici (MBAS)	827
5180 - Tensioattivi non ionici (BIAS)	833

VOLUME 3

6000 - METODI MICROBIOLOGICI - PARTE GENERALE

6010 - Modalità di campionamento	845
6020 - Lineamenti di tecniche analitiche	849
6030 - Generalità sui terreni di coltura per batteriologia	853
6040 - Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque	855

**7000 - METODI PER LA DETERMINAZIONE DI MICROORGANISMI INDICATORI DI
INQUINAMENTO E DI PATOGENI**

7010 - Coliformi totali	865
7020 - Coliformi fecali	875
7030 - <i>Escherichia coli</i>	883
7040 - Streptococchi fecali ed enterococchi	895
7050 - Conteggio delle colonie su agar a 36°C e 22°C	909
7060 - Spore di clostridi solfito riduttori	913
7070 - <i>Aeromonas spp</i>	921
7080 - <i>Salmonella spp</i>	927
7090 - <i>Vibrio spp</i>	935
7100 - Uova di elminti	941
7110 - Batteriofagi	945
7120 - Enterovirus	959
7130 - Oocisti di <i>Cryptosporidium</i> e cisti di <i>Giardia</i>	971

8000 - METODI ECOTOSSICOLOGICI

8010 - Metodi di valutazione della tossicità con pesci	985
8020 - Metodi di valutazione della tossicità con <i>Daphnia</i>	993
8030 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti	1003
8040 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con <i>Ceriodaphnia dubia</i>	1013
8050 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con <i>Mysidopsis bahia</i>	1027
8060 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con <i>Artemia sp.</i>	1043

INDICE

8070 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con <i>Cyprinodon variegatus</i>	1051
8080 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con trota iridea (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1065
8090 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con <i>Mysidopsis bahia</i>	1075
8100 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con <i>Ceriodaphnia dubia</i>	1085
8110 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con <i>Cyprinodon variegatus</i>	1091
8120 - Saggio di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (metodo preliminare)	1099
8130 - Analisi statistica dei risultati di saggi cronici	1109
9000 - INDICATORI BIOLOGICI	
9010 - Indice biotico esteso (I.B.E.)	1115
9020 - Determinazione della clorofilla: metodo spettrofotometrico	1137
9030 - Determinazione dell'adenosintrifosfato (ATP)	1143
9040 - Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI)	1149

6000 - METODI MICROBIOLOGICI

La presenza di contaminanti di natura biologica nelle acque ha particolare rilevanza per le possibili conseguenze sulla salute dell'uomo e/o degli animali. Organismi (patogeni e opportunisti patogeni) capaci di provocare malattie trasmesse per via idrica possono essere eliminati con le feci di individui infetti, raggiungere l'ambiente acquatico e, attraverso differenti modalità, possono infettare e dare origine a patologie in altri soggetti, garantendo, in tal modo, la circolazione dei patogeni (circuito fecale-orale). Nelle acque vengono a ritrovarsi tuttavia anche quei microrganismi generalmente di per sé non patogeni, a prevalente habitat intestinale, la cui presenza nell'ambiente idrico costituisce un indice indiretto e teorico della eventuale contemporanea presenza di patogeni. Essi costituiscono il gruppo dei microrganismi definiti indicatori di contaminazione fecale, la cui ricerca costituisce la parte largamente prevalente dell'esame microbiologico delle acque e quella universalmente praticata. Ciò è dovuto essenzialmente a motivi di ordine pratico, legati alla relativa semplicità nel rilevamento degli indicatori a fronte della ricerca dei patogeni. Diverse difficoltà pratiche si oppongono infatti all'adozione routinaria del rilevamento di patogeni (enterobatteri, virus e parassiti) nelle acque, anche se, disponendo di laboratori sufficientemente attrezzati e di personale specializzato, è comunque possibile effettuare questo tipo di indagini.

L'esame microbiologico delle acque dà la possibilità di verificare l'eventuale presenza dei microrganismi presenti in esse, mediante valutazioni quali-quantitative basate su tecniche analitiche che ne permettono l'evidenziazione e/o lo sviluppo.

L'analisi microbiologica riveste particolare importanza quando si considerino acque destinate all'approvvigionamento idrico-potabile sia in relazione alla loro qualità in funzione del trattamento di disinfezione cui debbono essere sottoposte, sia dopo la loro immissione nella rete idrica. Analogamente, con il controllo microbiologico si definisce la qualità di acque superficiali, quando vengano destinate ad usi a rilevanza igienico-sanitaria e di acque reflue che, con il loro apporto inquinante, influenzano e modificano le caratteristiche del corpo idrico recettore (fiume, lago, mare).

Per la ricerca di microrganismi di natura batterica l'esame si basa, generalmente e di routine, sulla possibilità di coltivare su idonei substrati, ed in idonee condizioni colturali, i batteri contenuti nell'acqua in esame, utilizzando particolari metodologie finalizzate all'individuazione differenziale di specie o di gruppi microbici che si ritengono significativi ai fini del giudizio igienico e/o di qualità dell'acqua in esame.

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

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

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

L'analisi di piccoli volumi di acqua può essere svolta con la tecnica della semina di aliquote del campione su/in terreni solidificati all'agar. Dopo opportuna incubazione, il numero delle colonie sviluppate permette di risalire al numero di batteri presenti per unità di volume del

campione, partendo dal presupposto che ogni colonia abbia origine da un solo microrganismo. La semina può essere effettuata sulla superficie del terreno agarizzato già solidificato in piastra di Petri (non è ordinariamente possibile seminare aliquote superiori a 0,1-1 mL) o nello spessore del terreno all'agar (generalmente non è possibile seminare aliquote superiori a 2 mL). È pertanto evidente che questa metodica è utilizzabile solo per mettere in evidenza microrganismi presenti nel campione in numero relativamente elevato e che quindi siano in numero consistente in volumi ridotti.

La tecnica che è andata affermandosi negli ultimi decenni è comunque quella della filtrazione su membrana che permette l'esame anche di grandi volumi di acqua qualora la qualità dell'acqua lo consenta. Tuttavia, in alcuni casi, la presenza di particolato in sospensione può causare l'otturazione dei pori della membrana, fattore che costituisce il limite alla filtrazione di quantitativi di acqua troppo elevati. Comunque, la metodica della filtrazione su membrana, oltre a consentire l'esame di elevati volumi di acqua, presenta diversi vantaggi semplificando le procedure di laboratorio, abbreviandone i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione; inoltre consente, ordinariamente, di rilevare direttamente (per conteggio diretto) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato ed è agevolmente adattabile a situazioni di emergenza.

Diversamente, la ricerca di organismi di altra natura (virus, parassiti, metazoi) comporta l'uso di metodologie complesse, generalmente costose, specifiche per l'organismo o il gruppo di organismi ricercati e applicabili da personale specializzato. Inoltre, generalmente, queste tecniche forniscono risposte in tempi lunghi necessitando fasi diverse di preparazione del campione legate anche all'esigenza di concentrare grandi volumi di acqua in relazione all'ampia variabilità delle concentrazioni dei patogeni nelle acque.

6010. Modalità di campionamento

Il prelievo dei campioni per l'esame microbiologico deve essere effettuato con recipienti puliti e la sterilità è funzione delle determinazioni che devono essere effettuate e del tipo di acqua che si deve analizzare. Poiché il rischio di contaminazione del campione diminuisce quanto più sono inquinate le acque da controllare, il prelievo di campioni per la caratterizzazione e/o il controllo delle acque reflue è meno problematico anche se, in questo caso, è necessario osservare norme igieniche di sicurezza a tutela della salute dell'operatore.

Per i prelievi da effettuare per immersione della bottiglia, (acque superficiali, raccolte idriche in genere) si devono usare bottiglie sterili incartate prima della sterilizzazione e al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti.

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

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

Nell'eseguire i prelievi si deve sempre avere cura di non riempire completamente la bottiglia al fine di consentire una efficace agitazione del campione al momento dell'analisi in laboratorio.

Se l'acqua da esaminare è clorata, le bottiglie di prelievo devono contenere sodio tiosolfato in concentrazione idonea ad inibire l'azione disinfettante del cloro. Con le concentrazioni di cloro generalmente in uso è sufficiente una soluzione al 10% di sodio tiosolfato, nella quantità di 0,1 mL per ogni 100 mL di capacità della bottiglia aggiunto prima della sterilizzazione.

Per l'esecuzione delle analisi si deve provvedere al prelievo in bottiglia di quantitativi di acqua di poco superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti. Per la ricerca di patogeni (es. virus, parassiti), e quindi eventualmente per la necessità di prelevare grandi volumi di acqua, è opportuno effettuare il prelievo/concentrazione del campione *in situ*.

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua, la precisa annotazione del punto in cui è stato effettuato il prelievo e devono altresì essere trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio. A parte ogni esigenza di natura giuridica, che può prevedere precise modalità di identificazione del campione, è comunque assolutamente necessario che il campione venga contrassegnato sia con il codice numerico, sia con l'indicazione in chiaro del punto di campionamento.

1. Parametri da rilevare all'atto del campionamento

La raccolta del campione deve essere accompagnata da alcune determinazioni da effettuare preferibilmente (alcune obbligatoriamente) sul luogo. Si tratta di determinazioni di alcuni parametri fisici e chimico-fisici che, durante la conservazione ed il trasporto, vanno incontro a variazioni tali da non consentire più la loro corretta misurazione in laboratorio. I parametri da rilevare sul luogo variano molto in relazione al tipo di acqua, all'uso ed al tipo di analisi da eseguire.

La temperatura, uno dei parametri che durante la conservazione ed il trasporto del campio-

ne va incontro a modifiche, va misurata *in situ* all'atto del prelievo utilizzando un termometro di idonea sensibilità o una sonda che presenta il vantaggio, rispetto al termometro, di rilevare la temperatura dell'acqua anche a differenti profondità, al di sotto del pelo libero dell'acqua. Il termometro classicamente utilizzato per la misura della temperatura dell'acqua è il cosiddetto termometro a pozzetto. Esso è dotato di un piccolo recipiente alla sua estremità, dalla parte del bulbo del termometro, solidale con il termometro stesso, nel quale si raccoglie l'acqua prelevata con l'immersione. Consente alla colonnina termometrica (in genere di mercurio) di rimanere al livello corrispondente alla temperatura del campione, per il tempo necessario ad effettuare la lettura, in quanto il bulbo del termometro continua ad essere immerso nell'acqua campionata.

Anche la concentrazione di ossigeno disciolto fa parte di quei parametri che possono andare incontro a modifiche durante il trasporto, modifiche che possono togliere significato alla determinazione effettuata in laboratorio. La determinazione in loco si effettua con apposite sonde (metodo elettrometrico) alcune delle quali (le sonde multiparametriche) hanno il vantaggio di consentire la misura di più parametri.

La concentrazione di cloro attivo, richiesta obbligatoriamente in alcuni casi (es. acque di scarico), deve necessariamente essere effettuata in loco. Infatti l'eventuale presenza di sostanze riducenti (in primo luogo le sostanze organiche) determina un progressivo consumo di cloro durante la conservazione ed il trasporto. La determinazione effettuata in laboratorio risulta modificata fornendo valori nettamente inferiori di cloro-attivo rispetto ai valori presenti nel campione all'origine.

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

2. Modalità e tempi di trasporto e conservazione

Tutti i campioni di acqua, indipendentemente dalla loro natura, devono essere esaminati nel minore tempo possibile. Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra $+4^{\circ}$ e $+10^{\circ}\text{C}$.

Le alterazioni cui possono andare incontro i campioni prelevati, in seguito alla inosservanza dei tempi e/o delle modalità di trasporto, sono influenzate dalla composizione chimica dell'acqua, dal pH, dall'azoto proteico, dalla qualità e dalla quantità della flora batterica presente e da altri fattori indeterminati.

Tra il momento del prelievo e l'esecuzione delle analisi microbiologiche, i tempi massimi consigliati per l'esame di acque dolci superficiali, acque marine e acque di scarico vanno da un minimo di 6-8 ore, con l'obbligo di non superare un periodo medio di 24 ore. Quando non sia possibile rispettare i tempi sopracitati, deve essere considerata la possibilità di utilizzare, almeno per alcune indagini microbiologiche, idonei sistemi analitici portatili o laboratori mobili.

Al fine di consentire il mantenimento della temperatura richiesta ($+4 \div +10^{\circ}\text{C}$) è necessario usare frigoriferi portatili o contenitori termoisolanti utilizzando, per il mantenimento della temperatura, apposite piastre frigorifere commerciali, ma evitando comunque il congelamento del campione (ad eccezione di campioni in cui sono da ricercare virus).

Durante il trasporto le bottiglie devono essere collocate nel contenitore in modo da impedire il loro rovesciamento e, fra le bottiglie, devono essere collocati idonei sistemi di separazione per evitare rotture.

Di seguito vengono indicati i tempi massimi raccomandati per la conservazione dei campioni in funzione dei microrganismi da ricercare (Tab. 1).

Tabella 1: Tempi massimi (ancora accettabili) raccomandati per la conservazione dei campioni per analisi microbiologiche

Gruppi di organismi da ricercare	Tempo massimo (accettabile) in ore
Organismi vitali a 22°C o 36°C	8 (12)
Escherichia coli e coliformi	12 (18)
Enterococchi	12 (18)
Batteri e spore di Clostridi solfito-riduttori	48 (72)
Batteriofagi	48 (72)
Salmonella e altre Enterobatteriacee	12 (18)
Enterovirus	48 (72)
Cisti/oozisti di Giardia/Cryptosporidium	48 (72)
Amoebae	48 (72)
Staphylococcus	8 (12)
Pseudomonas aeruginosa	8 (12)
Legionella	48 (72)
Cianobatteri	48 (72)
Campylobacter	6 (8)
Uova di Elminti (a pH 2,0)	48 (72)

6020. Lineamenti di tecniche analitiche

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

La tecnica dell'MPN è particolarmente consigliabile per l'analisi di acque con particolato in sospensione. Questa tecnica può essere impiegata come alternativa a quella delle membrane filtranti nei casi in cui si analizzino campioni di acqua che superino il valore di 1 unità nefelometrica di torbidità (NTU). I volumi di acqua che possono essere esaminati con questa tecnica sono ridotti in considerazione delle difficoltà tecniche di preparazione e distribuzione di aliquote elevate del campione di acqua da esaminare.

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

Il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas (1):

$$\text{MPN}/100 \text{ mL} = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{mL di campione nei tubi negativi} \cdot \text{mL di campione in tutti i tubi}}} \quad (1)$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, da una apposita tabella già predisposta (Tab. 1). Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

Procedura

Agitare vigorosamente il campione di acqua da analizzare. Seminare aliquote scalari del campione in serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido. Il terreno si prepara a concentrazione tale che inoculi del campione superiori a 10 mL non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard. Incubare a temperatura idonea e per il periodo di tempo richiesto in base al microrganismo da ricercare. Leggere i risultati in funzione della presenza di reazioni positive e negative (es. torbidità, produzione di gas, produzione di acido) ed eventualmente procedere allo svolgimento di prove di conferma. Con riferimento alla tabella 1 calcolare il valore dell'indice MPN riferito a 100 mL di campione. Quando l'acqua in esame ha una bassa carica microbica è necessario analizzare volumi più grandi. In questo caso, da una semina di 100, 10 e 1 mL si otterrà un valore dell'indice MPN ricavato dalla tabella che dovrà essere moltiplicato per 0,1. Se, d'altra parte, le quantità seminate saranno 1, 0,1 e 0,01 mL, il valore riportato in tabella 1 dovrà essere moltiplicato 10, oppure 100 volte se le aliquote seminate saranno di 0,1, 0,01 e 0,001 mL.

METODO B - Metodo della filtrazione su membrana (MF)

La metodica della filtrazione su membrana si adatta a tutti i tipi di acqua, tranne che a quelle particolarmente torbide. Consente di ottenere risultati in tempi più brevi rispetto a quelli richiesti con il metodo del numero più probabile (MPN); inoltre permette di esaminare anche grandi volumi di acqua di buona qualità. Presenta diversi vantaggi consentendo di rilevare direttamente (per conta diretta) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato, contando le colonie sviluppate su una membrana, semplificando le procedure di laboratorio e abbreviando i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione.

La procedura della filtrazione su membrana permette di contare i microrganismi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie della membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno prodotto colonie. Poiché non è possibile determinare se una colonia individuale sia formata da una o più cellule batteriche, il numero di colonie ottenuto si riporta come "Unità Formante Colonia" (UFC), valore poi riferito, generalmente, a 100 mL del campione analizzato. Si accetta, pertanto, che una cellula batterica produca una colonia e che la conta riporti direttamente il numero di batteri presente.

L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, infatti, che il numero delle colonie sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie della membrana compreso generalmente tra 20 e 80 e non superiore a 200 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato.

Il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato si ottiene dalla equazione (2):

$$\text{UFC}/100 \text{ mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ delle colonie contate} \cdot 100}{\text{mL di campione filtrati}} \quad (2)$$

Procedura

Con una pinzetta sterile prendere, in condizioni di asepsi, una membrana di esteri di cellulosa con porosità nominale 0,45 µm e, con il lato quadrettato verso l'alto, centrarla sulla base di un supporto filtrante. Fissare con l'ideale pinza il bicchiere (di vetro Pyrex, di acciaio inossidabile o di policarbonato) al supporto filtrante. Dopo avere adeguatamente agitato il campione di acqua o l'eventuale sua diluizione, prelevare, con una pipetta (micropipetta o pipetta automatica) o un cilindro graduato sterili, il volume di acqua da analizzare e versarlo nel bicchiere. Filtrare attraverso la membrana utilizzando una pompa da vuoto o una pompa ad acqua. Sciacquare i bordi del bicchiere versando acqua distillata sterile o soluzione diluente. Dopo la filtrazione trasferire la membrana, con il lato quadrettato verso l'alto, su idoneo terreno di coltura agarizzato in piastra Petri.

METODO C – Metodo dell'agar-germi

Il metodo, con il quale si analizzano piccole aliquote di campione o sue diluizioni, permette di contare i microrganismi capaci di moltiplicarsi e crescere nello spessore del terreno agarizzato. Poiché si considera che ciascuna cellula microbica formi una colonia, sarebbe idoneo poter contare un numero totale di colonie compreso tra 30 e 300.

Con questa procedura è necessario porre particolare attenzione alla temperatura del terreno colturale mantenuto liquido che, a temperature superiori a 45°C, potrebbe provocare shock termici alle cellule microbiche.

Procedura

Seminare in capsule Petri vuote aliquote non superiori a 2 mL del campione o di una sua diluizione. Versare, rispettando le regole di asepsi, circa 15 mL di substrato nella capsula contenente l'inoculo. Non superare i 20 minuti di intervallo tra il momento dell'inoculo in capsu-

la e l'aggiunta del terreno colturale che deve essere mantenuto liquefatto in bagnomaria ad una temperatura tra i 43°C e i 45°C. Mescolare accuratamente ruotando in un verso e nell'altro la piastra per permettere una completa miscelazione tra il terreno ed il campione. Lasciare solidificare e porre ad incubare a temperatura idonea. Dopo incubazione, contare le colonie cresciute e scartare le piastre con crescita confluyente. Riportare il numero ottenuto come Unità Formanti Colonia per millilitro (UFC/mL) del campione.

Tabella 1: Indice MPN e limite di confidenza al 95% per varie combinazioni di risultati positivi quando serie di 3 o 5 tubi vengono inoculati con diluizioni di 10 mL, 1 mL, 0,1 mL.

Combinazioni di tubi positivi	3 Tubi Indice MPN/100 mL	Diluizioni		5 Tubi Indice MPN/100mL	Limiti di confidenza al 95%	
		INFERIORE	SUPERIORE		INFERIORE	SUPERIORE
0-0-0	< 3			< 2		
0-0-1	3	< 0.5	9	2	< 0.5	7
0-1-0	3	< 0.5	13	2	< 0.5	7
0-2-0				4	< 0.5	11
1-0-0	4	< 0.5	20	2	< 0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	< 0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	< 0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	< 0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	< 0.5	15
2-0-0	9	1	36	4	< 0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150			
2-3-0				12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380			
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380			
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470			
3-3-0	240	36	1300			
3-3-1	460	71	2400			
3-3-2	1100	150	4800			
3-3-3	≥2400					
4-0-0				13	3	31
4-0-1				17	5	46
4-1-0				17	5	46
4-1-1				21	7	63
4-1-2				26	9	78
4-2-0				22	7	67
4-2-1				26	9	78
4-3-0				27	9	80
4-3-1				33	11	93
4-4-0				34	12	93

segue

segue

Combinazioni di tubi positivi	3 Tubi Indice MPN/100 mL	Diluizioni		5 Tubi Indice MPN/100mL	Limiti di confidenza al 95%	
		Limiti di confidenza al 95%			INFERIORE	SUPERIORE
		INFERIORE	SUPERIORE			
5-0-0				23	7	70
5-0-1				31	11	89
5-0-2				43	15	110
5-1-0				33	11	93
5-1-1				46	16	120
5-1-2				63	21	150
5-2-0				49	17	130
5-2-1				70	23	170
5-2-2				94	28	220
5-3-0				79	25	190
5-3-1				110	31	250
5-3-2				140	37	340
5-3-3				180	44	500
5-4-0				30	35	300
5-4-1				170	43	490
5-4-2				220	57	700
5-4-3				280	90	850
5-4-4				350	120	1000
5-5-0				240	68	750
5-5-1				350	120	1000
5-5-2				540	180	1400
5-5-3				920	300	3200
5-5-4			1	600	640	5800
5-5-5				≥2400		

BIBLIOGRAFIA

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

DALLA VALLE J.M. (1941): "Notes on the most probable number Index as used in bacteriology", *Publ. Health Rep.*, **58**, 299.

DUTKA B.D. (1981): "Membrane filtration applications. Techniques and problems", Marcel Dekker, Inc, New York.

MACCRADY M.H. (1918): "Tables for rapid interpretation for fermentation-tube results", *Publ. Health J.*, **9**, 201-204.

6030. Generalità sui terreni di coltura per batteriologia

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

In generale, vengono utilizzati terreni a formulazione completa. In alcuni casi, tuttavia, vengono forniti terreni-base da integrare al momento della preparazione con l'aggiunta dei componenti mancanti (antibiotici, alcoli, ecc.).

In ogni caso la preparazione di ciascun terreno deve essere effettuata secondo specifiche indicazioni.

Recentemente si sta diffondendo anche l'uso di terreni già pronti (in piastre o tubi) e di substrati (in fiale) a cui aggiungere direttamente il campione da analizzare. In alcuni casi si tratta di terreni non riproducibili in laboratorio per la presenza di componenti specifici (es. cromogeni) non distribuiti in commercio.

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

Un terreno in polvere, lasciato a lungo in ambiente umido, diventa compatto o, in alcuni casi, assume una consistenza viscosa e una diversa colorazione. In ogni caso, il terreno può fornire risultati modificati in funzione delle alterazioni biochimiche subite.

Pertanto la fornitura del laboratorio di terreni disidratati dovrebbe essere rinnovata ogni anno ed in ogni caso è consigliabile rifornirsi di limitate quantità di terreno.

I terreni disidratati sono ricostituiti aggiungendo ad un quantitativo specifico di polvere un specifico volume di acqua distillata, esente da tracce di metalli e di sostanze batteriostatiche o battericide e comunque prive di sostanze in grado di inibire la crescita di microrganismi nelle condizioni di prova. Il terreno viene sciolto agitando e portandolo a completa soluzione.

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

I terreni preparati possono essere conservati in beute, tubi e piastre di Petri, in un luogo a riparo dalla luce diretta e refrigerati o a temperatura ambiente. In ogni caso, lunghi tempi di conservazione possono alterare le caratteristiche del terreno e favorirne la contaminazione. È opportuno procedere a prove di controllo di qualità dei materiali preparati seguendo specifiche procedure di seguito riportate.

Per terreni di coltura disidratati e reattivi (coloranti, additivi, soluzioni) reperibili in commercio, è necessario apporre sulle confezioni sia la data di ricevimento che quella di effettiva apertura.

Quando i reagenti e i terreni sono preparati in laboratorio per pesata dai costituenti di base, devono essere identificati con una etichetta riportante informazioni quali: eventuale diluizione, data di preparazione, data di scadenza, modalità di conservazione, nome del preparatore, eventuali segnali di pericolosità.

Inoltre, si consiglia, per controllare l'affidabilità e la conformità alle specifiche richieste di effettuare i seguenti controlli:

- Controllo del pH prima della sterilizzazione. Confrontare il valore misurato mediante pH metro tarato, con quello dichiarato in etichetta e se lo scostamento è superiore a quello ammesso modificare il pH mediante aggiunte di NaOH o HCl 0,1 N. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della sterilità. Porre ad incubare una piastra o un tubo contenenti il terreno da testare, secondo le modalità previste dal metodo analitico, e verificare la completa assenza di crescita batterica e fungina. In caso contrario scartare tutto il lotto preparato e controllare le procedure di sterilizzazione e preparazione. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della fertilità del terreno da testare, cioè la sua idoneità alla crescita del microrganismo. Strisciare sulla superficie del terreno solido o inoculare nel brodo un'ansata di una brodocoltura allestita con un ceppo puro certificato di riferimento. Incubare con le modalità previste dal metodo analitico e verificare la crescita di colonie con le caratteristiche morfologiche tipiche. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.
- Controllo della selettività del terreno da testare mediante l'inibizione di crescita di un microrganismo opportunamente scelto. Strisciare sul terreno solido o inoculare nel brodo un'ansata di brodocoltura allestita a partire da un ceppo puro certificato la cui crescita dovrebbe essere inibita nel substrato in esame; incubare con le stesse modalità indicate dal metodo analitico e verificare l'assenza di crescita di colonie. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

Per quanto riguarda i ceppi microbici di controllo per lo svolgimento delle prove di fertilità e selettività dei terreni colturali si rimanda alle indicazioni fornite dalle ditte produttrici. Tutti i controlli effettuati dovranno essere accuratamente documentati, cioè registrati ed archiviati.

6040. Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque

Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è necessario attenersi a quanto definito, in relazione all'uso delle attrezzature di laboratorio, dal D.Lgs. 626/94 che così stabilisce: "all'atto della scelta delle attrezzature, il datore di lavoro prende in considerazione: le condizioni e le caratteristiche specifiche del lavoro da svolgere; i rischi presenti nell'ambiente di lavoro; i rischi derivanti dall'impiego delle attrezzature stesse". Ciò implica pertanto che prima dell'acquisto di qualsiasi apparecchiatura debba essere definito il posizionamento, all'interno del laboratorio, della strumentazione da acquistare. Dovrà essere pertanto valutato che lo spazio e la collocazione assegnati allo strumento siano idonei per l'esecuzione delle Procedure Operative Standard; le condizioni ambientali (temperatura, umidità, insolazione) e al contorno (es. presenza di vibrazioni) siano adeguate e siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (diffusione di bioaerosol e polveri, di sostanze tossiche), sia in relazione alle strutture e agli impianti.

Le apparecchiature di prova, in dotazione ad un laboratorio di microbiologia, devono garantire affidabilità di funzionamento e di risposta, in modo da non alterare l'accuratezza e la precisione del risultato finale della prova. Pertanto dovranno essere sempre tenute in perfetta efficienza e installate in locali che garantiscano adeguata protezione da deterioramento; questa efficienza sarà garantita da opportune disposizioni per la manutenzione e la taratura.

Per ogni apparecchiatura dovrà essere prevista una apposita Scheda che dovrà riportare tutte le informazioni utili sulla provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.

Dovrà essere predisposta inoltre una Scheda di Manutenzione che riporti tutte le operazioni effettuate di verifica, sostituzioni, pulizia e riportare le date di effettuazione e la firma del tecnico che ha effettuato le operazioni.

Dovrà essere prevista inoltre una Scheda di Taratura su cui verrà riportato il riferimento alla procedura di taratura, il programma di taratura, la data di effettuazione della stessa e della futura taratura, la firma del tecnico e i riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per l'effettuazione della stessa.

Qualora la taratura venga effettuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente.

Qualora un'apparecchiatura, che a seguito di taratura abbia rilevato una non attendibilità al suo utilizzo, dovrà essere messa fuori servizio apponendo un'etichetta con la data e la dicitura "Fuori servizio". L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a riparazione o a taratura che dimostri il rientro nelle condizioni di normalità. Tutto quanto sopra dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.

Di seguito vengono indicate e descritte alcune attrezzature di uso più comune nei laboratori per l'analisi microbiologica delle acque.

1. Apparecchiature per la misura del pH

Il pH dei terreni di coltura e delle soluzioni può essere determinato per via colorimetrica con l'uso di appropriati indicatori (quando non vi siano interferenze provocate dal colore del terreno) effettuando la lettura con l'impiego di comparatori muniti degli appositi dischi o con altro dispositivo appropriato. Tuttavia, le determinazioni possono essere effettuate con più precisione e speditevolmente per via potenziometrica con l'uso di pH metri che devono avere una precisione di misura di $\pm 0,1$ unità di pH a circa 20°C.

2. Apparecchi per sterilizzazione

2.1 Autoclavi

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (per terreni di coltura, bottiglie da prelievo, attrezzature filtranti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. La sterilizzazione di norma si effettua alla temperatura di $121 \pm 3^\circ\text{C}$ (1,1 atmosfera di pressione relativa) per un tempo di 15 ± 1 minuti.

Per il corretto uso dell'autoclave attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore.

2.2 Stufe a secco

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

2.3 Lampade a raggi UV

I sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (UV) sono particolarmente idonei per la sterilizzazione dell'ambiente sotto cappa o per piccoli locali. È da tenere presente che la vita media di una lampada a UV è di circa 5000 ore e che comunque è necessario effettuare, per mantenerne l'efficacia, una sua manutenzione periodica.

L'uso richiede precauzioni per evitare danni agli occhi e alla pelle degli operatori.

3. Attrezzature per l'incubazione

3.1 Armadi termostatici, camere termostatiche e termostati

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata e assicurare nei vari scomparti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti $\pm 1^\circ\text{C}$. Sono preferibili gli armadi termostatici a camicia d'acqua. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche e i termostati dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata.

Di norma vengono utilizzati incubatori regolabili da temperatura ambiente a 80°C . Per temperature intorno ai 20°C sono comunque da utilizzare frigotermostati. Essi devono garantire la temperatura di incubazione prevista dal metodo analitico.

È opportuno che queste apparecchiature siano provviste inoltre di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di 1°C , o di un display e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione.

Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.

È altresì opportuno che queste apparecchiature siano dotate di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compreso fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo.

Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione del calore e non essere eccessivamente ammassato.

3.2 *Bagni termostatici*

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata ed essere provvisti di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura e possibilmente di un sistema termometrico di registrazione ed eventualmente di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. Per il loro riempimento è necessario utilizzare acqua distillata che deve essere comunque rinnovata regolarmente. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo. L'eventuale sviluppo di alghe o di funghi nell'acqua deve essere eliminato mediante l'uso di composti ammoniaci quaternari da fare agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

4. **Bilance**

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con risoluzione di 0,1 g. Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di una bilancia analitica con risoluzione di 0,1 mg.

5. **Cappe a flusso laminare**

Per garantire la qualità del dato analitico e la protezione dell'operatore devono essere utilizzate cappe di sicurezza. Di norma, per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio basso o moderato (gruppi 2 e 3 del D.Lgs. 626/94) vengono utilizzate cappe a flusso laminare di classe II A. Sono cappe a flusso verticale, aperte frontalmente e progettate per la protezione dell'operatore, del prodotto al suo interno e dell'ambiente circostante.

Le cappe biologiche devono essere collocate in locali esenti da correnti d'aria e lontane da impianti di condizionamento e finestre.

6. **Centrifughe**

Possono essere utilizzate centrifughe da banco e da terra con rotori ad inclinazione fissa o variabile. Possono essere refrigerate o meno in base alle necessità. È necessario utilizzare centrifughe realizzate secondo le norme di sicurezza internazionali.

7. **Frigoriferi e congelatori**

Frigoriferi e congelatori devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura e impiegare per il controllo interno un termometro a minima e a massima oppure un termometro con bulbo immerso in glicerolo.

I frigoriferi devono assicurare una temperatura di circa +4°C ed i congelatori da utilizzare possono essere quelli che raggiungono temperature intorno a -20°C e a -70°C.

8. **Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione**

8.1 *Membrane filtranti*

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono costituite da dischi di esteri di cellulosa con

pori uniformemente distribuiti. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro di $0,45 \mu\text{m}$ ($\pm 0,02 \mu\text{m}$). A causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua che svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi del terreno colturale.

Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico delle acque vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47-50 mm.

In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate con raggi gamma o con ossido di etilene.

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

8.2 *Apparecchiature per la filtrazione*

Nel caso dell'esame batteriologico delle acque, vengono di norma utilizzate apparecchiature idonee per la filtrazione di piccoli volumi. Dette apparecchiature devono essere adatte per l'impiego di membrane filtranti del diametro di 47-50 mm. Sono costituite da una rampa con supporti e contenitori che possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Possono essere impiegate apparecchiature singole o in serie, utilizzando, come sistema aspirante, una pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua. È essenziale che fra sistema filtrante e sistema aspirante sia interposto un idoneo sistema per la raccolta dell'acqua filtrata.

I supporti e i contenitori devono essere sterilizzati in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti (pressione 1,1 atm); dopo accurato lavaggio ed asciugatura e prima della sterilizzazione devono essere avvolti in carta idonea per mantenere la sterilità durante la conservazione prima dell'uso. Possono essere utilizzati entro due settimane dalla sterilizzazione, se conservati in condizioni ottimali.

Apparecchiature per il supporto di membrane di diametro più grande (ad esempio, 120 mm), in genere di acciaio inossidabile, sono utilizzate per filtrazioni di volumi maggiori di acqua.

9. **Microscopio ottico**

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10, 40 e 100X, vetrini portaoggetto e coprioggetto e olio ad immersione. Dopo ogni utilizzo rimuovere il residuo di olio sulle lenti con carta ottica.

10. **Sistemi per anaerobiosi**

Consistono in giare, cappe o altri sistemi a tenuta, idonei a creare aree a composizione gassosa controllata. Le condizioni di anaerobiosi devono essere verificate con appositi dispositivi.

Per il loro corretto uso attenersi scrupolosamente alle indicazioni della ditta produttrice.

11. **Vetreteria e materiale monouso**

È da preferire la vetreteria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione (da effettuare in stufa a secco alla temperatura di circa 180°C per 1 ora e mezzo o in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti) la vetreteria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici

o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Dopo lavaggio e asciugatura la vetreria, per essere sterilizzata deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.

Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di manodopera impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro. I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti ed avere segni di taratura che corrispondano a precise indicazioni volumetriche.

Esistono in commercio anche articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

11.1 *Bottiglie per il prelievo*

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

11.2 *Bottiglie e tubi per diluizione, beute, cilindri tarati*

È da utilizzare preferibilmente materiale in vetro, resistente alla sterilizzazione.

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

11.3 *Pipette e micropipette*

Per le varie operazioni di analisi occorrono pipette di varia capacità (da 1 mL, da 5 mL e da 10 mL) graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL.

Sono disponibili in commercio confezioni di pipette monouso in materiale plastico, di varia misura, già sterili. Per piccoli volumi possono essere comunque utilizzate micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale da utilizzarsi con appositi puntali monouso.

Nell'eventualità si utilizzino pipette di vetro riutilizzabili, prima della sterilizzazione, esse dovranno essere munite di filtro di cotone grezzo all'estremità superiore. Le pipette vanno sterilizzate in confezione singola o multipla (in apposite custodie in metallo, preferibilmente acciaio inossidabile, o in vetro).

Non pipettare con la bocca, ma utilizzare sempre sistemi di aspirazione tipo pompette aspiranti a bulbo di gomma o pipettatrici automatiche.

11.4 *Tubi per coltura*

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

11.5 *Piastre di Petri*

L'uso delle piastre di Petri è indispensabile per l'isolamento di colture batteriche e per l'analisi effettuata con la tecnica della filtrazione su membrana. Vengono utilizzate piastre di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm ed un'altezza di 15 mm. Per la filtrazione dell'acqua, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di mem-

brane di 47 mm di diametro, si possono usare piastre di diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.

Piastre di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre monouso, in materiale plastico che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate.

Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le piastre di Petri devono essere con il fondo perfettamente piano e perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie.