

Corso di Laurea Magistrale in
“BIOLOGIA PER LA SOSTENIBILITÀ”

Anno Accademico 2023-2024

Igiene dell'ambiente e del territorio

Prof.ssa Valeria Di Onofrio

valeria.dionofrio@uniparthenope.it



SIS

Scuola Interdipartimentale
delle **Scienze**, dell'**Ingegneria**
e della **Salute**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE (DIST)

Conta microbica: tecniche indirette in terreno liquido

MPN (coliformi totali)

MPN = *Most Probable Number* (Numero Più Probabile)

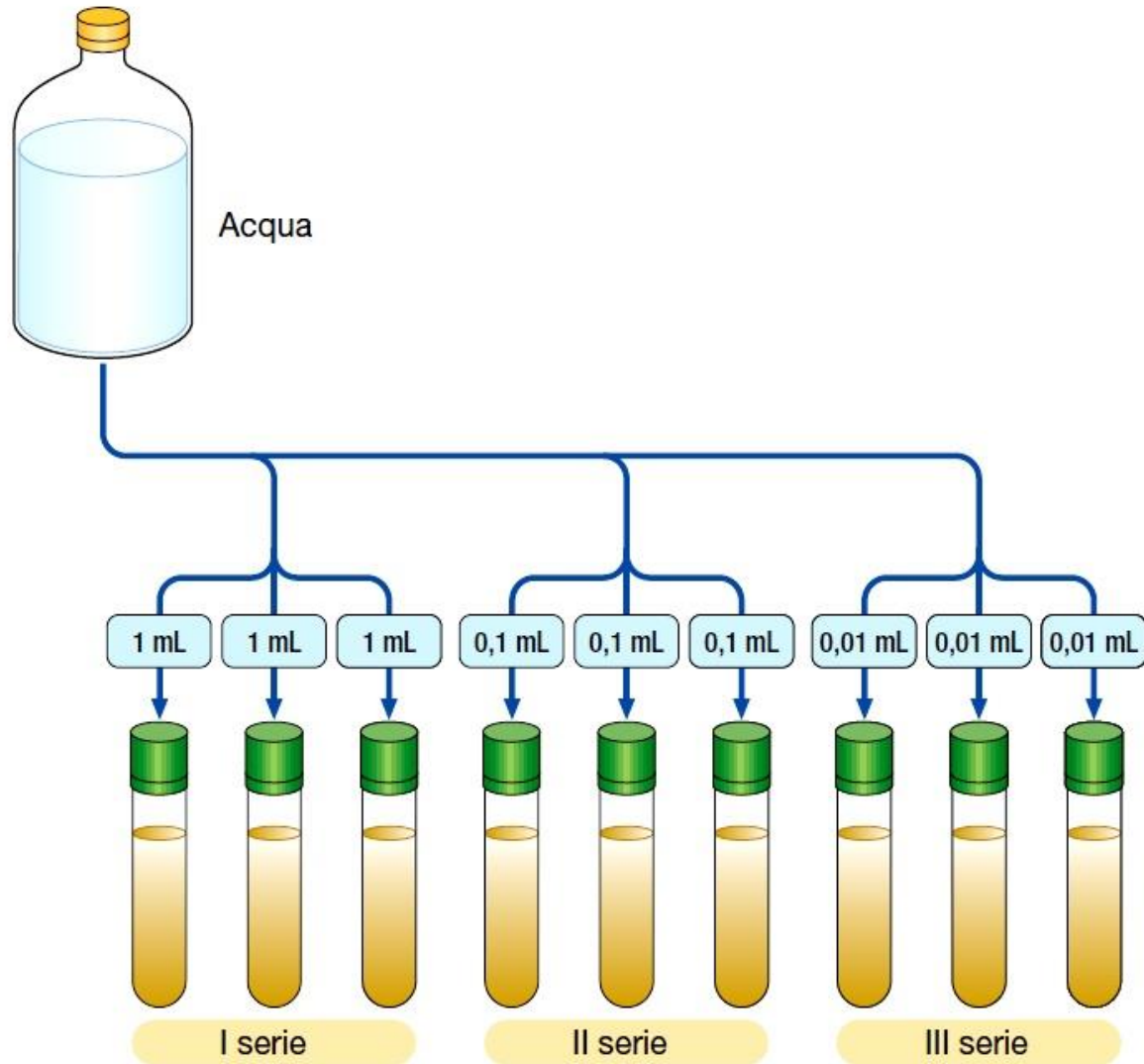
principio del metodo

- ✓ distribuzione casuale e non uniforme dei microrganismi nel campione
- ✓ elaborazione statistica dei risultati

MPN: tecnica

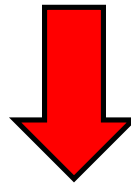
- allestire 3 serie di colture in provette (3 o 5 provette per ogni serie)
- le provette di ogni serie contengono la stessa quantità di campione
- ogni serie viene inoculata con aliquote decrescenti del campione
- valutare, sul totale di provette per ogni serie, quelle positive (torbidità e/o sviluppo di gas)

MPN: schema operativo



MPN: lettura

Serie	Tubi positivi
I	3
II	2
III	0



numero caratteristico di riferimento per tabelle Mc Crady = 320

$$\text{MPN} = 9,5$$

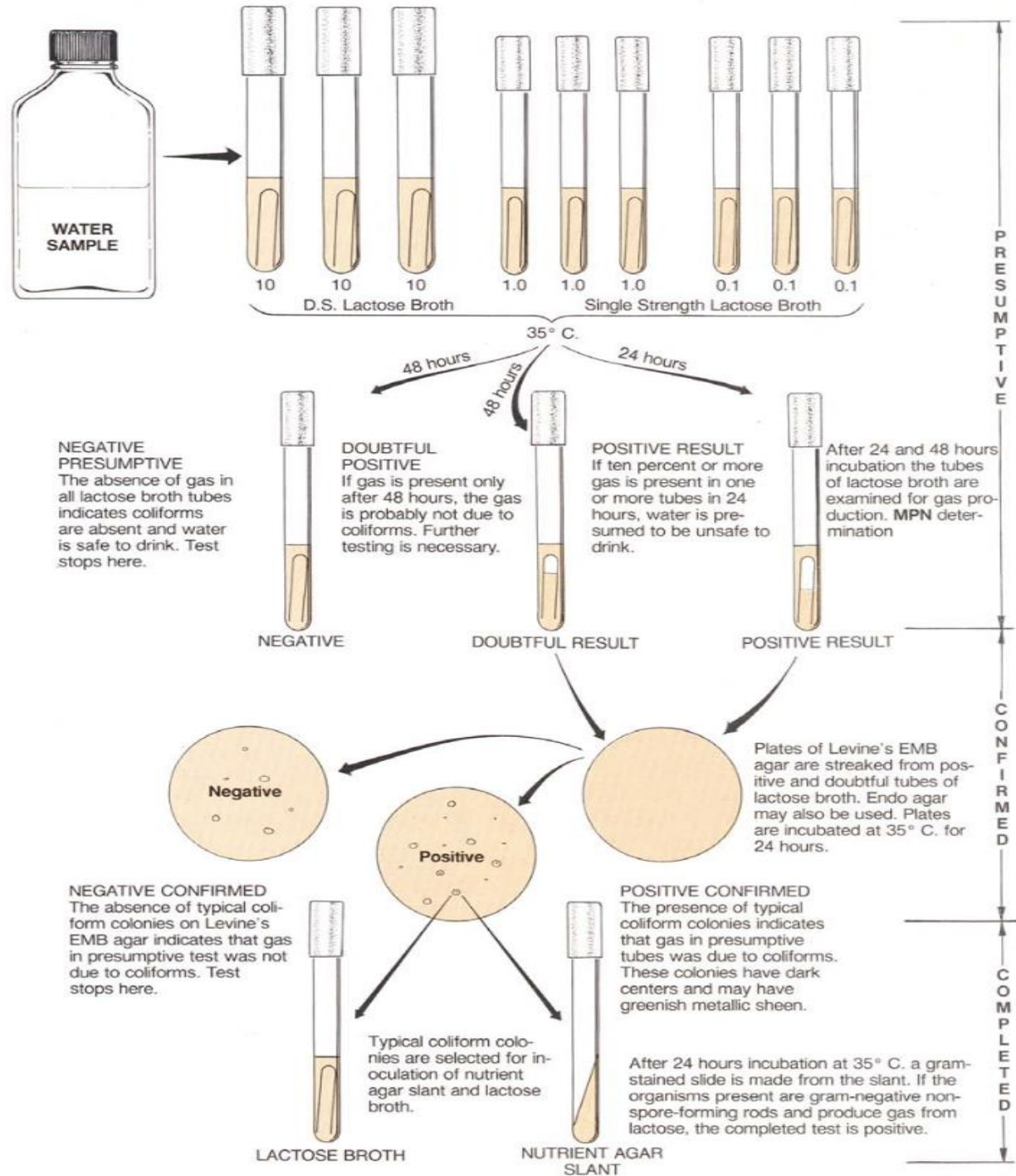
MPN

tabelle di McCrady

Tavola di McCrady. Tre tubi per diluizione, inoculi 1; 0,1; 0,01 g o mL. Numero caratteristico MPN/g o mL

NUMERO CA- RATTERISTICO	NUMERO DI MICRORGANI- SMI	NUMERO CA- RATTERISTICO	NUMERO DI MICRORGANI- SMI	NUMERO CA- RATTERISTICO	NUMERO DI MICRORGANI- SMI
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

Most Probable Number





ENUMERAZIONE BATTERICA

Formula di Thomas per MPN

$$X = \frac{P}{\sqrt{NT}} \bullet 100$$

P = numero di tubi positivi

N = volume del campione nei tubi negativi

T = volume totale del campione inoculato in tutti i tubi

X = numero di germi per 100 ml

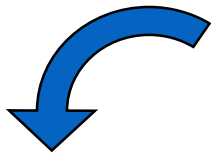


ENUMERAZIONE BATTERICA

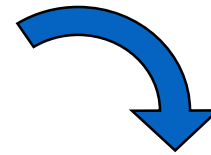
Tecnica MPN

SVANTAGGI

- ❖ Metodica lenta (48-96 h) e laboriosa
- ❖ Procedimento costoso
- ❖ Manca di precisione nei risultati
- ❖ I risultati possono essere inficiati da fenomeni di interferenza dovuti alla presenza nel campione di:



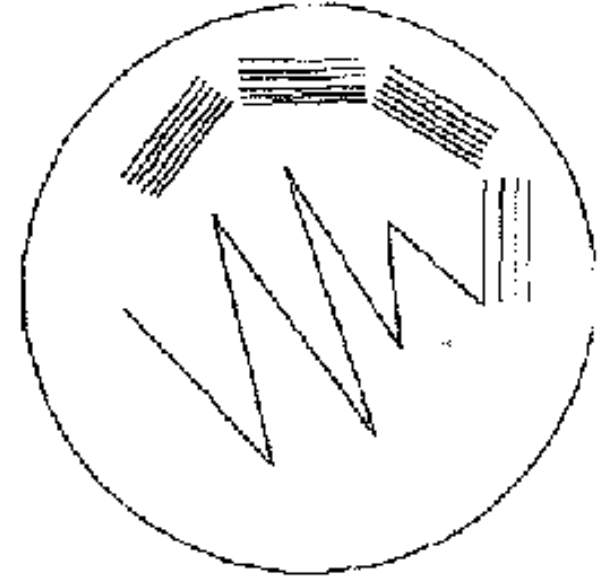
Flora microbica
concorrente



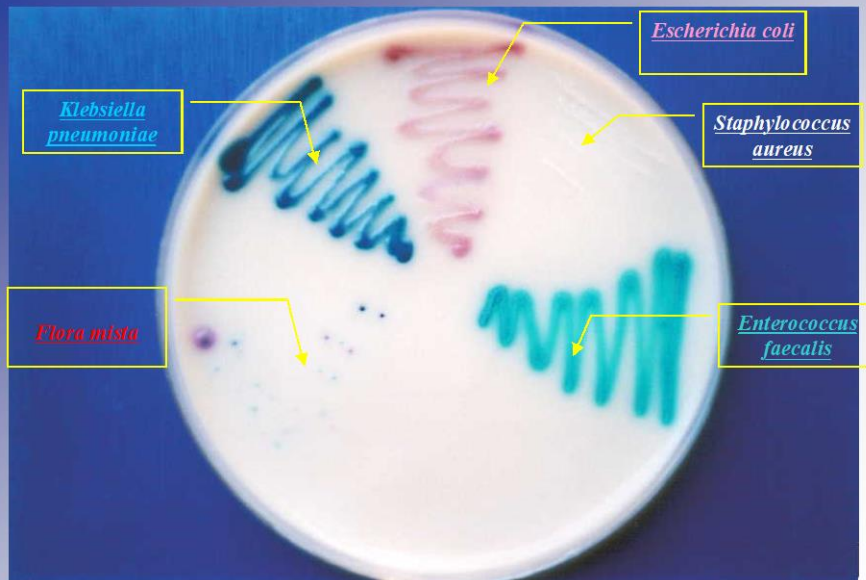
Elevata concentrazione di nitrati che inibisce
l'attacco fermentativo dei coliformi agli
zuccheri (EFFETTO ANAEROGENICO)

isolamento

Scegliere una colonia separata su una piastra di agar inoculata con il campione e strisciarla con un'ansa da batteriologia



Identificazione batterica su piastra cromogena



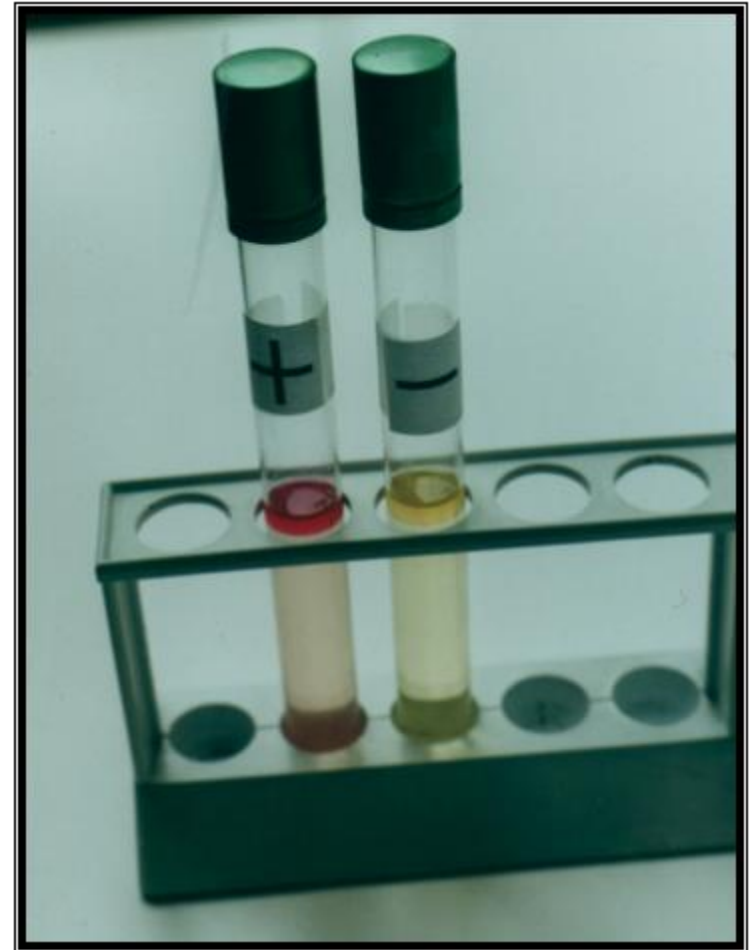
Terreno cromogeno

identificazione

Prova di conferma della presenza dell'indolo con acqua triptonata e reattivo di Kovacs*



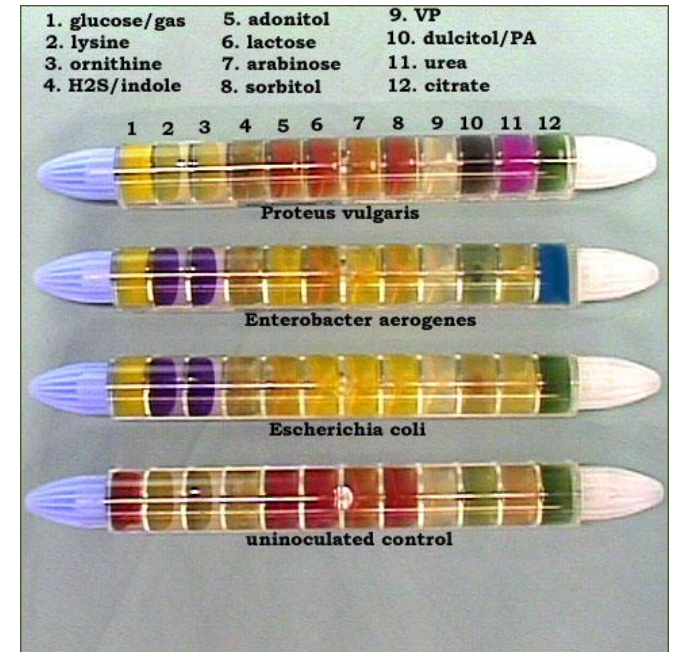
* I batteri che hanno l'enzima triptofanasi sono capaci di idrolizzare e deaminare il triptofano contenuto in un terreno colturale con produzione di indolo, acido piruvico e ammoniaca. L'indolo reagisce con il gruppo aldeidico della p-dimetilaminobenzaldeide con la formazione di un complesso rosso. La produzione di indolo è un importante carattere per l'identificazione di molte specie microbiche ed è particolarmente utile nel separare *E. coli* (+) dai membri del gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* (per lo più negativi al test)



identificazione

enterotube

Test
Biochimici



api

DECRETO LEGISLATIVO 23 febbraio 2023, n. 18

**Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 del
Parlamento europeo e del Consiglio, del 16
dicembre 2020, concernente la qualità delle acque
destinate al consumo umano**



ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

Art. 2 - *Definizioni* - Comma 1 lettera a)

**«ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO»,
DENOMINATE «ACQUE POTABILI»:**

- 1) tutte le acque trattate o non trattate, destinate a uso potabile, per la preparazione di cibi, bevande o per altri usi domestici, in locali sia pubblici che privati, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne o in bottiglie o contenitori, comprese le acque di sorgente di cui al decreto legislativo 8 ottobre 2011, n. 176;
- 2) tutte le acque utilizzate in un'impresa alimentare e incorporate negli alimenti o prodotti destinati al consumo umano nel corso della loro produzione, preparazione, trattamento, conservazione o immissione sul mercato



DECRETO LEGISLATIVO 23 febbraio 2023, n. 18

Non si applica



- ⇒ Acque minerali naturali
- ⇒ Acque medicinali riconosciute
- ⇒ Acque destinate esclusivamente a quegli usi per i quali la qualità degli stessi non ha ripercussioni, dirette o indirette, sulla salute dei consumatori interessati



ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

Devono essere

Salubri & Pulite

Non devono contenere microrganismi e parassiti, né altre sostanze, in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana

Conformità ai parametri indicatori (art. 4)



CONTROLLI



I controlli (interni ed esterni) devono essere effettuati:

- a) Ai punti di prelievo delle acque superficiali e sotterranee da destinare al consumo umano
- b) Agli impianti di adduzione, di accumulo o di potabilizzazione
- c) Alle reti di distribuzione
- d) Agli impianti di confezionamento di acqua in bottiglia o in contenitori
- e) Sulle acque confezionate
- f) Sulle acque utilizzate nelle imprese alimentari
- g) Sulle acque fornite mediante cisterna, fissa o mobile

In sede di controllo debbono essere utilizzate, per l'analisi dei parametri dell'allegato I, le specifiche indicate nell'allegato III

CONTROLLI INTERNI



Quelli effettuati dal gestore del servizio idrico



Sono concordati con l'ASL



Si avvalgono di laboratori interni ovvero stipulano convenzioni con altri gestori. Non possono essere eseguiti dai laboratori che effettuano controlli esterni



I risultati dei controlli devono essere conservati 5 anni

CONTROLLI ESTERNI



Vengono svolti dall'ASL competente che comunica al Ministero della Salute e alla Regione i punti di prelievo e le frequenze di campionamento

..che assicura una ricerca supplementare per le sostanze o microrganismi non previsti dall'allegato I, qualora vi sia rischio per la salute pubblica

..e tiene conto dei risultati delle acque di cui all'art. 43 del D.lgs 152/99 (Art. 6 comma 1 lettera a) del presente decreto)

Ove gli impianti ricadano in territori interregionali, le Regioni d'intesa individuano l'azienda a cui attribuire i controlli

Per le attività di laboratorio si avvalgono delle ARPA che mensilmente inviano i risultati al Ministero della Salute e alla Regione



POSSIBILI CONTAMINAZIONI DELLE ACQUE

INTRODUZIONI INTENZIONALI

- Trattamenti per controllare flora e fauna
- Scarichi industriali
- Smaltimento di prodotti utilizzati
- Smaltimento di derrate contaminate
- Trattamenti di decontaminazione
- Pulizia in campo degli apparecchi distributori



POSSIBILI CONTAMINAZIONI DELLE ACQUE

INTRODUZIONI NON INTENZIONALI

- Deriva durante i trattamenti
- Trasporto per via eolica o idrica dalle aree di trattamento
- Utilizzo di acque di irrigazione provenienti da aree trattate
- Incidenti ai carichi trasportati
- Applicazioni con scopi e prodotti sbagliati



Campionamento

Costituisce la prima fase di ogni procedimento di analisi fase estremamente complessa e delicata

Determinazione dei parametri microbiologici

Prendere tutte le precauzioni per evitare la contaminazione

- ⇒ Utilizzare bottiglie di vetro neutro sterilizzabili con tappo a vite
- ⇒ Rispettare le condizioni di asepsi: la parte interna del tappo e il collo della bottiglia non devono venire a contatto con fonti di contaminazione (es. mani operatore)
- ⇒ Riempire la bottiglia completamente
- ⇒ Chiudere accuratamente la bottiglia



I campioni devono essere conservati a 4°C per non più di 24 h

Campionamento

Costituisce la prima fase di ogni procedimento di analisi fase estremamente complessa e delicata

Determinazione dei parametri chimici

Prendere tutte le precauzioni per evitare la contaminazione

- ⇒ Utilizzare bottiglie di vetro o plastica scure con tappo a vite
- ⇒ Non c'è la necessità di rispettare le norme di asepsi
- ⇒ Procedere all'ambientamento della bottiglia sciacquandola un paio di volte
- ⇒ Non riempire la bottiglia completamente
- ⇒ Chiudere accuratamente la bottiglia



I campioni possono essere conservati anche parecchi giorni previa acidificazione

ISO

(International Standardization Organization – Ente Mondiale di Normazione)

ha emesso fin dal 1987 una famiglia di standard (**NORME**) che definiscono le prescrizioni da adottare in azienda per realizzare un **SISTEMA di QUALITA'**: si tratta della famiglia di standard (**ISO 9000**)

CEN

(Comitato Europeo di Normazione – Ente Europeo di Normazione)

ha recepito le norme **ISO** come **EN ISO 9000**. In **ITALIA**

UNI

(Ente Italiano di Normazione)

le ha recepite come

UNI EN ISO 9000