



**ISTITUTO DI ISTRUZIONE SUPERIORE IIS
LICEO-IPSIA-ITT-ITC
AMANTEA**



RICERCA DELLA SALMONELLA SPP. NELLE ACQUE SUPERFICIALI

METODO 7080 APAT CNR-IRSA

A CURA DELLA CLASSE V^A

ARTICOLAZIONE BIOTECNOLOGIE AMBIENTALI

OBIETTIVO DEL LAVORO DIDATTICO:
ACCERTAMENTO DELLA QUALITÀ MICROBIOLOGICA DI
UN CAMPIONE INCOGNITO DI ACQUA SUPERFICIALE

LA PRESENZA DI CONTAMINANTI DI NATURA BIOLOGICA NELLE ACQUE SUPERFICIALI RIVESTE PARTICOLARE IMPORTANZA PER LE POSSIBILI CONSEGUENZE SULLA SALUTE DELL'UOMO E PER GLI UTILIZZI DELLA RISORSA IDRICA.

A CAUSA DELLE MALATTIE CHE PUÒ TRASMETTERE, UN'ACQUA CHE CONTIENE MICRORGANISMI PATOGENI NON È IDONEA AD IMPIEGHI QUALI L'USO IDROPOTABILE ED IRRIGUO O PER LA BALNEAZIONE.

OLTRE AGLI INDICATORI DI CONTAMINAZIONE FECALE (QUALI ESCHERICHIA COLI E STREPTOCOCCHI FECALI), CHE VENGONO RICERCATI COMUNEMENTE PER LA DEFINIZIONE DELLA QUALITÀ DELLE ACQUE SUPERFICIALI, IN ALCUNI CAMPIONI VENGONO EFFETTUATI RICERCHE DI MICRORGANISMI POTENZIALMENTE PERICOLOSI PER LA SALUTE UMANA COME LE SALMONELLE.

ECCO PERCHÉ SI È DECISO DI ESEGUIRE LA DETERMINAZIONE DELLA PRESENZA DI SALMONELLA SPP. SU UN CAMPIONE INCOGNITO DI ACQUA SUPERFICIALE, VOLUTAMENTE SPORCATO E MALTRATTATO .

LA SALMONELLA SPP.DEVE RISULTARE ASSENTE IN 1000 ML DI CAMPIONE

FASI OPERATIVE IN LABORATORIO



Terreni di coltura da preparare

Pesata dei terreni liofilizzati e loro dissoluzione alla fiamma.



Sterilizzazione in autoclave; si impiega il vapore saturo sotto pressione.



Si impiega la tecnica delle Membrane Filtranti (MF).

Apparecchiatura completa

Filtrazione di 1000 mL di campione. Membrana in nitrato di cellulosa.



La membrana si trasferisce in 100 mL del terreno di prearricchimento (Acqua Peptonata Tamponata), poi incubato in termostato a 37°C per 24 h.



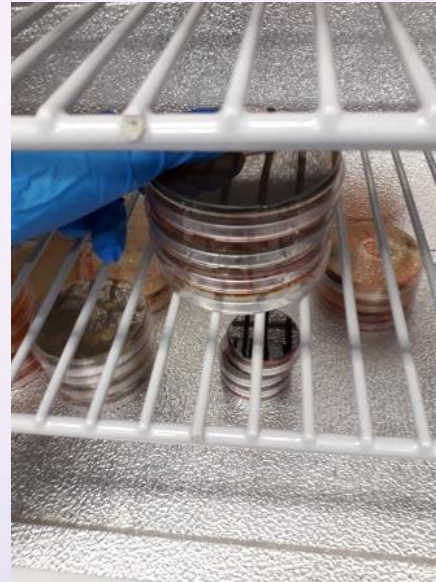
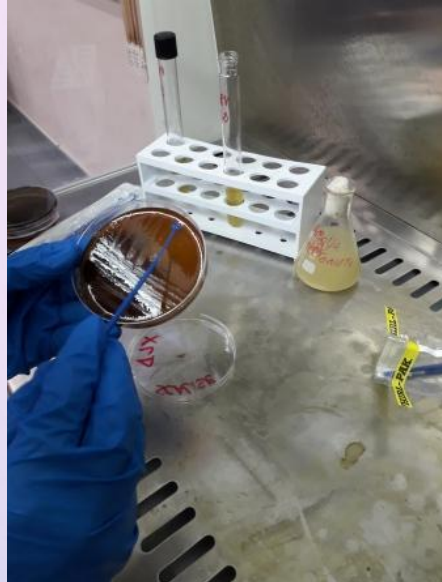
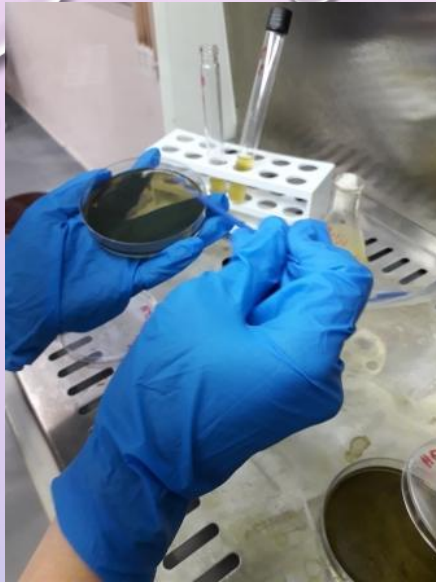
Dal brodo di prearricchimento si esegue l'inoculo di un'aliquota della brodocoltura, in rapporto 1:100 in brodo Rappaport-Vassiliadis.
Si incuba a 42°C per 24+24 h.



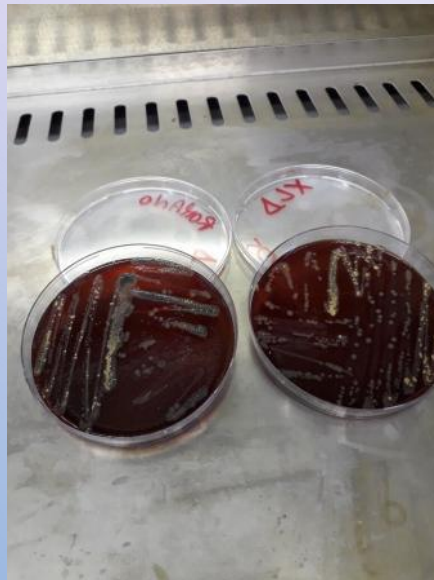
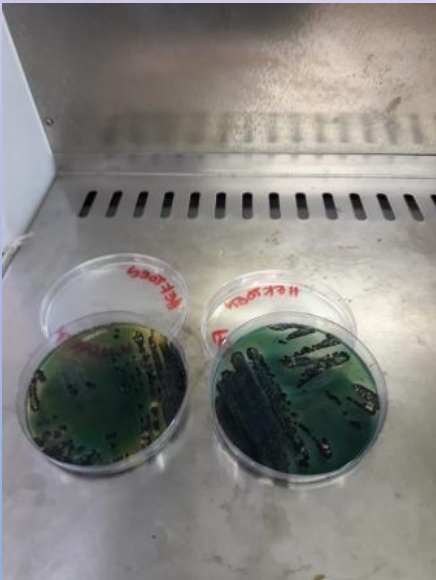
Viraggio di colore del brodo RV dopo incubazione.



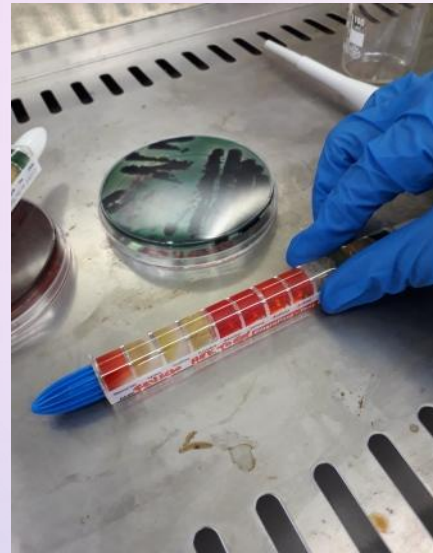
Dal brodo RV si effettuano due subcolture, la prima dopo 24 h di incubazione del brodo e la seconda dopo 48 h, sui terreni di isolamento Hektoen Enteric Agar e XLD Agar.



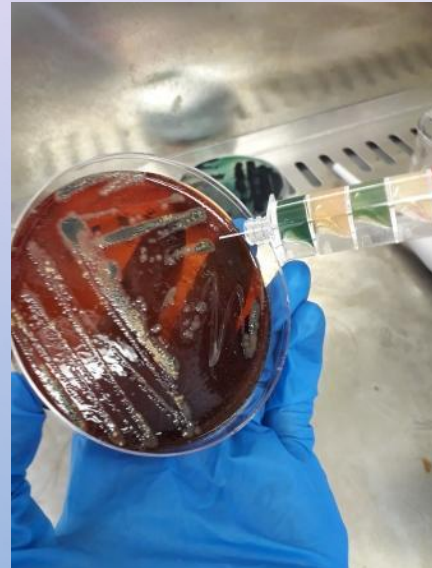
Le piastre di Hektoen Enteric e XLD vengono incubate a 37°C per 18-24 h.



Le colonie sospette su Hektoen Enteric e XLD dovranno essere sottoposte a prove di conferma e ad identificazione .

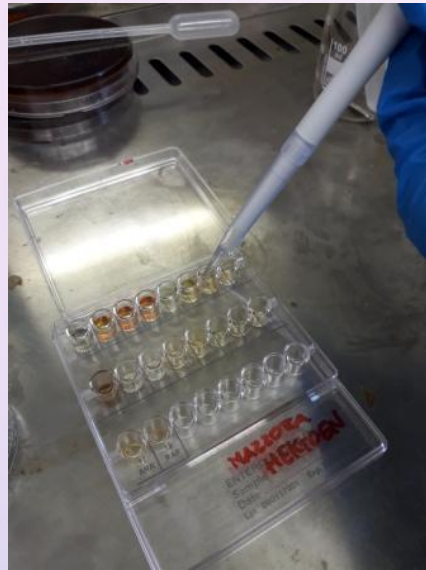


Impieghiamo i sistemi miniaturizzati di identificazione batterica.
Nel nostro caso, Enteropluritest ed Enterosystem 18 R.

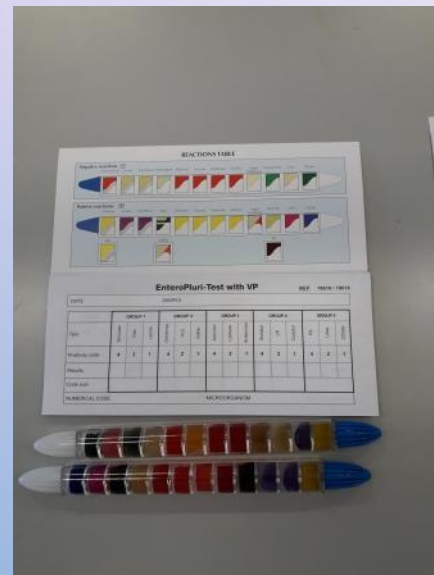


L'Enteropluritest è un piccolo tubo in plastica suddiviso in compartimenti che contengono i terreni di coltura adatti alla identificazione biochimica dei vari generi e specie di microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

Dopo la semina dei terreni presenti nel tubo, quest'ultimo si incuba a 37°C per 24 h.



Impieghiamo un secondo sistema di identificazione delle Enterobacteriaceae. L'Enterosystem 18 R contiene 18 tests biochimici essiccati in pozzetti. Questi vengono inoculati con una sospensione batterica e le reazioni si evidenziano dopo circa 18-24 ore di incubazione a 37°C.



Il germe viene identificato mediante codifica numerica ottenuta dai viraggi cromatici dei vari tests biochimici. Vengono addizionati in ogni gruppo di reazioni, i numeri di quelle positive, ottenendo un codice a sei cifre ed utilizzando l'apposito Code Book, viene identificato il batterio.

CODICI OTTENUTI DALLA LETTURA DELL'ENTEROPLURI-TEST:

- | | | |
|-----------------------|-------|----------------------------------------|
| 1- DA XLD | 76000 | CORRISPONDENTE ALLA SALMONELLA SPP. |
| 2- DA HEKTOEN ENTERIC | 50102 | CORRISPONDENTE ALLA KLEBSIELLA OZOENAE |

CODICI OTTENUTI DALLA LETTURA DELL'ENTEROSYSTEM 18 R:

- | | | |
|-----------------------|--------|------------------------------------------|
| 1- DA XLD | 711537 | CORRISPONDENTE ALL' ENTEROBACTER CLOACAE |
| 2- DA HEKTOEN ENTERIC | 551557 | CORRISPONDENTE ALL'ENTEROBACTER CLOACAE |

GENERALITÀ SULLE SALMONELLE

LE SALMONELLE SONO BATTERI DI FORMA BASTONCELLARE, GRAM-NEGATIVI, AEROBI E ANAEROBI FACOLTATIVI; MOBILI PER LA PRESENZA DI FLAGELLI O CIGLIA, NON SPORIGENI, APPARTENENTI ALLA FAMIGLIA DELLE ENTEROBACTERIACEAE.

LE SALMONELLE, NELL'AMBIENTE ESTERNO, POSSONO NON SOLO RESISTERE PER PARECCHIO TEMPO, MA ANCHE MOLTIPLICARSI QUANDO LE CONDIZIONI AMBIENTALI (TEMPERATURA, UMIDITÀ, PRESENZA DI PROTEINE) SONO FAVOREVOLI.

LA PRESENZA DI SALMONELLE NELL'AMBIENTE IDRICO È INDICE DI UNA CONTAMINAZIONE FECALE PRIMARIA (IMMISSIONE DIRETTA DI SCARICHI FOGNARI) O SECONDARIA (DILAVAMENTO DEI SUOLI CONTAMINATI); SI TROVANO FREQUENTEMENTE NEI LIQUAMI, IN ACQUE COSTIERE, LACUSTRI E NEL SUOLO DOVE SI MOLTIPLICANO PERÒ IN MANIERA NON SIGNIFICATIVA.

LA SALMONELLA VIENE SEMPRE RILEVATA NELLE ACQUE REFLUE E NEI FANGHI DI DEPURAZIONE E NESSUN CORPO IDRICO SUPERFICIALE È ESENTE DALLA SUA PRESENZA. I CORSI D'ACQUA ASSUMONO QUINDI UN SIGNIFICATO RILEVANTE SIA NELL'ECOLOGIA AMBIENTALE SIA DAL PUNTO DI VISTA IGIENICO-SANITARIO SE SI CONSIDERANO LE DIVERSE DESTINAZIONI D'USO DELL'ACQUA: APPROVVIGIONAMENTO A SCOPO POTABILE, USO RICREATIVO ED IRRIGUO. IN QUEST'ULTIMO CASO, INFATTI, L'UTILIZZO DI ACQUE INQUINATE PER USO AGRICOLO RAPPRESENTA UNA FONTE DIRETTA DI CONTAMINAZIONE ED UN RISCHIO PER LA SALUTE UMANA, SOPRATTUTTO QUANDO VENGONO IRRIGATI VEGETALI DA CONSUMARE CRUDI.

L'INFEZIONE SI TRASMETTE PER VIA ORO-FECALE, ATTRAVERSO L'INGESTIONE DI CIBI O BEVANDE CONTAMINATE O PER CONTATTO, ATTRAVERSO LA MANIPOLAZIONE DI OGGETTI O PICCOLI ANIMALI IN CUI SIANO PRESENTI LE SALMONELLE.

I PRINCIPALI VEICOLI DI TRASMISSIONE DELLA SALMONELLA SONO RAPPRESENTATI DA:

- ✓ACQUA CONTAMINATA
- ✓ALIMENTI
- ✓PICCOLI ANIMALI DOMESTICI

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

SUI TERRENI DI COLTURA, NON SOLO SONO RISULTATE PRESENTI COLONIE TIPICHE (COLONIE VERDI/NERE CON CENTRO NERO IN HEKTOEN ENTERIC E COLONIE NERE IN XLD), MA ANCHE COLONIE INDICANTI LA PRESENZA DEL GENERE ENTEROBACTER (COLONIE GIALLE) E KLEBSIELLA (COLONIE ROSSO SALMONE).

I TESTS BIOCHIMICI CON I SISTEMI MINIATURIZZATI HANNO IDENTIFICATO LE SEGUENTI SPECIE:

- SALMONELLA SPP
- KLEBSIELLA OZOENAE
- ENTEROBACTER CLOACAE

IL CAMPIONE DI ACQUA SUPERFICIALE ANALIZZATO È DA RITENERSI NON IDONEO ALL'USO POTABILE O IRRIGUO.

A CURA DELLA CLASSE V^A BIOTECNOLOGIE AMBIENTALI

DOCENTI: PRATICO' ANGELA EMMA – FERACA LILIANA