

CONTA PER FILTRAZIONE SU MEMBRANA

a cura di Massimo Trauzzola e Rossana Baglioni



OBIETTIVO:

Determinare il numero complessivo di microrganismi presenti in un determinato campione (carica microbica totale): analisi quantitativa. (Tecnica delle membrane filtranti)

PRINCIPIO:

Filtrando volumi determinati di liquidi attraverso membrane sterili, con una porosità inferiore a $1 \mu\text{m}$, e ponendo tali filtri sulla superficie di terreni agarizzati in piastra, dopo incubazione, si otterranno colonie isolate che possono venire contate.

MATERIALI E STRUMENTI:

TERRENI DI COLTURA

PCA, ENDO broth MF, Faecal coliform broth, Azide maltose agar


VETRERIA, STRUMENTI

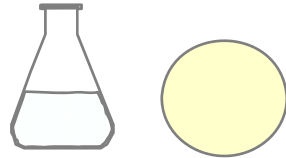
Pipette sterili da 1-10ml, provette, provettoni, beute, piastre sterili, filtri sterili con membrana da $0,2 \mu\text{m}$, apparato per la filtrazione, autoclave, contacolonie, bilancia, termostato, cappa sterile, pompa da vuoto, bunsen

METODICA

Procedimento A (Conta batterica totale)

(1^a FASE)


1  Sterilizzare dentro una busta per autoclave l'apparato di filtrazione (composto dall'imbuto, il porta filtro, la beuta codata), pinze di metallo, un cilindro da 100 ml, 5 matracci da 100 ml, pipette graduate da 10 ml.

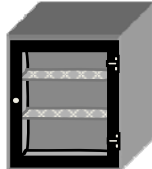
2  Sterilizzare e piastrare 6 piastre con il terreno PCA. Sterilizzare una beuta contenente 500 ml di acqua distillata per le diluizioni del campione.

Sotto la cappa sterile preparare le diluizioni del campione di acqua.

3 (2 campioni 1:10) Prelevare 10 ml di campione e metterlo in tre matracci da 100 ml, portare a volume con acqua sterile. Un matraccio servirà per la diluizione successiva .

(2 campioni 1:100) Prelevare 10 ml di campione dal matraccio 1:10 e metterlo in due matracci da 100 ml, portare a volume con acqua sterile.

4  Montare l'apparato di filtrazione inserendo tra l'imbuto e il porta filtro l'apposito filtro sterile, collegarlo ad una pompa da vuoto e filtrare i campioni di acqua partendo da quelli più diluiti. Dopo la prima filtrazione si toglie il filtro e lo si depone sulla superficie della piastra di PCA. Si procede così per tutti e sei i campioni (campioni 10^0 - 10^{-1} - 10^{-2}).

5  Mettere le piastre capovolte in termostato per 24h; una piastra a 22° e l'altra a 37° per ogni diluizione.

Procedimento B (Individuazione coliformi totali)



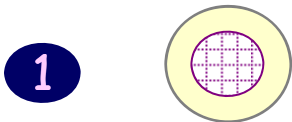
Filtrare 100 ml di campione e seminarlo in piastre con Endo broth agarizzato. Incubare a 36° per 24h.

Procedimento C (Identificazione coliformi fecali)



Filtrare 100 ml di campione e seminarlo in piastre con Faecal coliform broth agarizzato. Incubare a 44° per 24h.

Procedimento D (Individuazione Streptococchi fecali)



Filtrare 100 ml di campione e seminarlo in piastre con Azide maltose agar. Incubare a 36° per 48h.

Valutazione:

- Per la conta batterica totale si prendono in considerazione tutte le colonie presenti sulla membrana dopo incubazione. Riportare il valore alle diluizioni eseguite. (valori guida: 10 colonie a 36°C, 100 colonie a 22°C/1 ml)
- Per i coliformi totali contare le colonie rosse e tutte le colonie che presentano riflesso metallico (fucsina); queste ultime possono essere presumibilmente classificate come colonie di Escherichia coli. Altre colonie eventualmente presenti non vanno conteggiate. Riportare il valore a 100 ml di campione.
- Per i coliformi fecali contare le colonie in grigio, grigio-blu e blu. Altri tipi di colonie eventualmente presenti non si contano. Riportare il valore a 100 ml di campione.
- Per gli streptococchi fecali contare solo le colonie rosso, rosso-scuro, puntiformi (diametro max 1 mm) con contorni netti e cupoliformi. Ogni altro tipo di colonia non deve essere conteggiato. Riportare il valore a 100 ml di campione.

| Risultati: | 22°C | 36°C | 44°C |
|---|----------|-------------|-------------|
| Carica batterica totale 10 ⁰ |/ml |/ml | |
| 10 ⁻² |/ml |/ml | |
| 10 ⁻¹ |/ml |/ml | |
| Coliformi totali | |/100ml | |
| Coliformi fecali | | |/100ml |
| Streptococchi fecali | |/100ml | |

