

## **VALIDAZIONE SECONDO LE NORME ISO ED UNI-ENV-ISO DEL METODO COLORIMETRICO QUANTITATIVO MBS CONTA DI COLIFORMI IN ACQUE SUPERFICIALI**

Le metodiche sperimentali e le analisi statistiche che vengono applicate per saggiare la ripetibilità e riproducibilità del sistema analitico colorimetrico denominato Microbo Biosensori (MBS) sono quelle descritte nella Norme Internazionali ISO 9998 (1991), ISO/TR 13843 (2000) e nella Norma Italiana Sperimentale UNI ENV ISO 13843 (2003) [1,2,3] .

- 1. Il metodo colorimetrico denominato Microbo BioSensori (MBS), mostra una risposta lineare a concentrazioni microbiche comprese tra  $1 \times 10^6$  e  $< 10$  CFU/ml.**
- 2. L'analisi statistica dimostra che la precisione e sensibilità del metodo colorimetrico MBS è paragonabile a quella ottenuta con il metodo delle conte su piastra.**
- 3. La ripetitività del metodo colorimetrico MBS è risultata superiore a quella del metodo delle conte su piastra.**

## SPECIFICHE

- **Scopo e campo di applicazione** Validazione del metodo colorimetrico MBS in paragone al metodo delle conte su piastra per la rilevazione e conta differenziale di microorganismi totali e di coliformi in campioni di acqua superficiale
- **Robustezza dell'incubazione e sensibilita' al tempo** Le piastre per la conta delle CFU sono state osservate a 24, 36 e 48 ore.
- **Definizione degli organismi di riferimento:** Coliformi, definiti come gruppo di bacilli Gram negativi, negativi al test della ossidasi e positivi a quello della catalasi, resistenti agli acidi biliari e capaci di utilizzare il lattosio con formazione finale di acidi organici e gas. Alcuni coliformi sono in grado di crescere ad una temperatura di 44°C e quindi sono definiti coliformi termoresistenti.
- **Identificazione degli organismi di riferimento (coliformi)** Nella conta su piastra sono state considerate positive solo le colonie di colore rosso mattone visibili dopo 36 ore su terreno solido MacConkey (Peptone 17.0 g/l, Proteose Peptone 3.0 g/l, Lattosio 10.0 g/l, Bile Salts No.3 1.5 g/l, Cloruro di sodio 5.0 g/l, Agar 13.5 g/l, Rosso Neutro 0.03 g, Crystal Violet 1.0 mg/l). Nel metodo colorimetrico MBS e' stato considerato positivo il cambiamento di colore (rosso → giallo)
- **Limiti inferiore e superiore del protocollo sperimentale:** Campioni naturali di acqua superficiale contaminati con microorganismi fino a  $1 \times 10^6$  CFU/ml con diluizione successive in brodo lattosato fino a  $10^{-8}$ .
- **Recupero relativo:** I campioni sono stati contati alle diverse diluizioni con il metodo di confronto delle conte su piastra

## PROTOCOLLO SPERIMENTALE

È stato prelevato 1 litro di acqua dal Tevere. All'acqua è stato aggiunto 1 g di peptone e lasciata a temperatura ambiente in quanto lo scopo dell'esperimento era la validazione del metodo colorimetrico MBS, e non la determinazione esatta del contenuto di coliformi nell'acqua del Tevere. Il giorno seguente sono state effettuate le diluizioni (come descritto di seguito) e seminati gli inoculi con il reattivo Microbo Biosensori (MBS) per coliformi e su piastre di MacKonkey agar (terreno selettivo per coliformi). La procedura analitica è basata sulla rilevazione, attraverso indicatori di pH, del cambiamento dello stato del mezzo di reazione dovuto all'azione degli enzimi posseduti dai microorganismi. Il reattivo perciò misura la carica batterica di un campione rilevando l'attività di enzimi batterici, mentre i metodi tradizionali utilizzano la capacità replicativa dei microorganismi. Il tempo necessario per il viraggio del colore è inversamente correlato con la concentrazione dei microorganismi presenti nel campione da analizzare.

Le prove sono state svolte dalla dr.ssa Maria Teresa Massucci sotto la supervisione del Prof. Antonini presso i laboratori del Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre.

**Metodo colorimetrico MBS:** Le fiale contenenti 9 ml di reattivo MBS per coliformi sono state inoculate con 1 ml di campione ed incubate a 44 °C ed osservate ad intervalli regolari ogni 30 minuti per osservare quando avvenisse l'eventuale cambiamento di colore (rosso □ giallo). La procedura analitica e' basata sulla rilevazione, attraverso indicatori di pH , del cambiamento dello stato del mezzo di reazione dovuto all'azione degli enzimi posseduti dai microorganismi. Il reattivo percio' misura la carica batterica di un campione rilevando l'attivita' di enzimi batterici, mentre i metodi tradizionali utilizzano la capacita' replicativa dei microorganismi. Il tempo necessario per il viraggio del colore e' inversamente correlato con la concentrazione dei microorganismi presenti nel campione da analizzare.

**Figura 1:** Aspetto delle fiale all'inizio della prova (colore rosso-viola) e dopo il cambiamento di colore (colore giallo)



Dopo aver inoculato e posto in termostato a 44 °C le fiale, l'operatore ha osservato ad intervalli di 30 minuti il colore delle fiale e quando ha osservato il cambiamento di colore ha registrato il tempo trascorso tra l'inizio della prova e l'osservazione del cambiamento di colore.

## Metodo della conta su piastra:

Le piastre sono state inoculate con 0.1 ml di campione (-1A, -1B, etc.) e sono state incubate in termostato a 44 °, eventualmente dopo ulteriore diluizione in PBS. La osservazione per la conta delle Unità Formanti Colonie (UFC) e' stata ripetuta a 24 e 36 ore, senza differenze significative.

**Figura 2 Piastra di terreno solido MacConkey inoculata con coliformi e con altri microorganismi Gram negativi non coliformi** (immagine da manuale DIFCO-BBL)

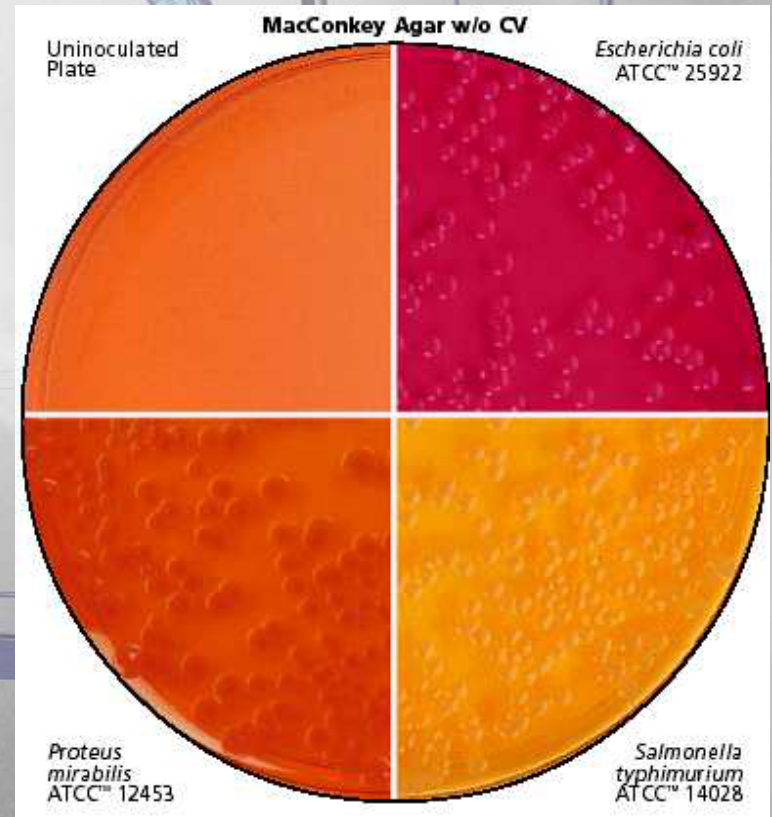
**Piastra non inoculata:** sezione in alto a sinistra

**Coliformi** (colonie positive):

*Escherichia coli* in alto a destra.

**Non coliformi** (colonie negative)

*Proteus mirabilis* in basso a sinistra e *Salmonella typhimurium* in basso a destra



## ESPERIMENTO 1: RISULTATI SPERIMENTALI

Diluizioni / Campioni	metodo delle conte	metodo colorimetrico
	su piastra (CFU)	tempi di viraggio (h)
-1A: 1ml acqua + 9 ml reattivo MB	(dil. $10^{-2}$ ) 1605	6.05
-1B: 1ml acqua + 9 ml reattivo MB	(dil. $10^{-2}$ ) 1458	6.05
-1C: 1ml acqua + 9 ml reattivo MB	(dil. $10^{-2}$ ) 1420	6.05
-2A: 1ml di -1A + 9ml reattivo MB	(dil. $10^{-1}$ ) 857	8.05
-2B: 1ml di -1B + 9ml reattivo MB	(dil. $10^{-1}$ ) 837	8.05
-2C: 1ml di -1C + 9ml reattivo MB	(dil. $10^{-1}$ ) 848	8.05
-3A: 1ml di -2A + 9ml reattivo MB	756	10.05
-3B: 1ml di -2B + 9ml reattivo MB	878	10.05
-3C: 1ml di -2C + 9ml reattivo MB	725	10.05
-4A: 1ml di -3A + 9ml reattivo MB	67	12.05
-4B: 1ml di -3B + 9ml reattivo MB	101	12.05
-4C: 1ml di -3C + 9ml reattivo MB	78	12.05
-5A: 1ml di -4A + 9ml reattivo MB	22	14.05
-5B: 1ml di -4B + 9ml reattivo MB	4	14.05
-5C: 1ml di -4C + 9ml reattivo MB	12	14.05
-6A*: 1ml di -5A + 9ml reattivo MB	1	non virato dopo 18 h
-6B *: 1ml di -5B + 9ml reattivo MB	2	16.05
-6C *: 1ml di -5B + 9ml reattivo MB	0	non virato dopo 18 h

\* Le diluizioni -6A, -6B, -6C non sono state utilizzate per l'analisi statistica.

## ESPERIMENTO 2: RISULTATI SPERIMENTALI

Diluizioni / Campioni	conte	coliformi nel campione	metodo colorimetrico
	su piastra (CFU)	(CFU/ml)	tempi di viraggio (h)
	0.1 ml di campione		
-1A: 1ml acqua + 9 ml reattivo MBS	(dil. $10^{-3}$ ) 12	1.2e5	5.50
-1B: 1ml acqua + 9 ml reattivo MBS	(dil. $10^{-3}$ ) 50	5.0e5	5.50
-2A: 1ml di -1A + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-2}$ ) 24	2.4e4	0,34375
-2B: 1ml di -1B + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-2}$ ) 43	4.3e4	0,34375
-3A: 1ml di -2A + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-1}$ ) 81	8.1e3	9.00
-3B: 1ml di -2B + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-1}$ ) 49	4.9e3	9.00
-4A: 1ml di -3A + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 22	2.2e2	11.25
-4B: 1ml di -3B + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 56	5.6e2	11.25
-5A: 1ml di -4A + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 1	10	0,59375
-5B: 1ml di -4B + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 1	10	0,59375
-6A*: 1ml di -5A + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 0	0	non virato dopo 18 h
-6B*: 1ml di -5B + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 1	10	

## ESPERIMENTO 3: RISULTATI SPERIMENTALI

Diluizioni / Campioni	conte	coliformi nel campione	metodo colorimetrico
	su piastra (CFU)	(CFU/ml)	tempi di viraggio (h)
	0.1 ml di		
-1A: 1ml acqua + 9 ml reattivo MBS	(dil.10 <sup>-3</sup> ) 10	1.0e5	0,21875
-1B: 1ml acqua + 9 ml reattivo MBS	(dil.10 <sup>-3</sup> ) 63	6.3e5	0,21875
-2A: 1ml di -1A + 9ml reattivo MBS	(dil. 10 <sup>-2</sup> ) 27	2.7e4	7.00
-2B: 1ml di -1B + 9ml reattivo MBS	(dil. 10 <sup>-2</sup> ) 31	3.1e4	7.00
-3A: 1ml di -2A + 9ml reattivo MBS	(dil. 10 <sup>-1</sup> ) 44	4.4e3	0,385416667
-3B: 1ml di -2B + 9ml reattivo MBS	(dil. 10 <sup>-1</sup> ) 46	4.6e3	0,385416667
-4A: 1ml di -3A + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 58	5.8e2	11.00
-4B: 1ml di -3B + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 52	5.2e2	11.00
-5A: 1ml di -4A + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 2	20	13.25
-5B: 1ml di -4B + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 2	20	13.25
-6A*: 1ml di -5A + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 0	0	non virato dopo 18 h
-6B *: 1ml di -5B + 9ml reattivo MBS	(T.Q.) 0	0	

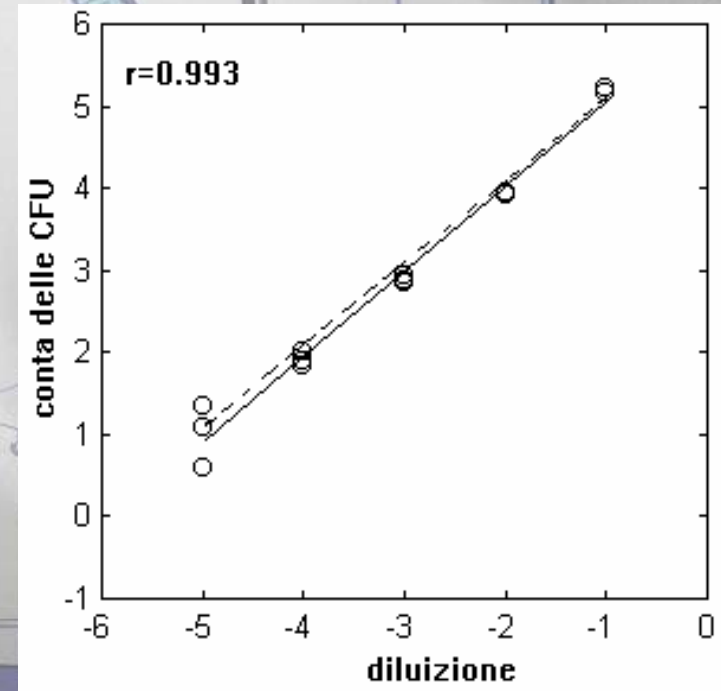
## ESPERIMENTO 4: RISULTATI SPERIMENTALI

<b>Diluizioni / Campioni</b>	<b>conte su piastra (CFU) 0.1 ml di campione</b>	<b>coliformi nel campione (CFU/ml)</b>	<b>metodo colorimetrico tempi di viraggio (h)</b>
-1A: 1ml acqua + 9 ml reattivo MBS	(dil. $10^{-3}$ ) 120	1.2e6	5.42
-1B: 1ml acqua + 9 ml reattivo MBS	(dil. $10^{-3}$ ) 145	1.45e6	5.42
	(dil. $10^{-2}$ ) 1238	1.24e6	5.42
	(dil. $10^{-2}$ ) 1240	1.24e6	5.42
-2A: 1ml di -1A + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-2}$ ) 8	8,00E+03	0,355555556
-2B: 1ml di -1B + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-2}$ ) 46	4.6e4	0,355555556
-3A: 1ml di -2A + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-1}$ ) 78	7.8e3	10.17
-3B: 1ml di -2B + 9ml reattivo MBS	(dil. $10^{-1}$ ) 57	5.7e3	10.17

## LINEARITA' DELLA RISPOSTA ED ALLESTIMENTO DELLA RETTA DI TARATURA

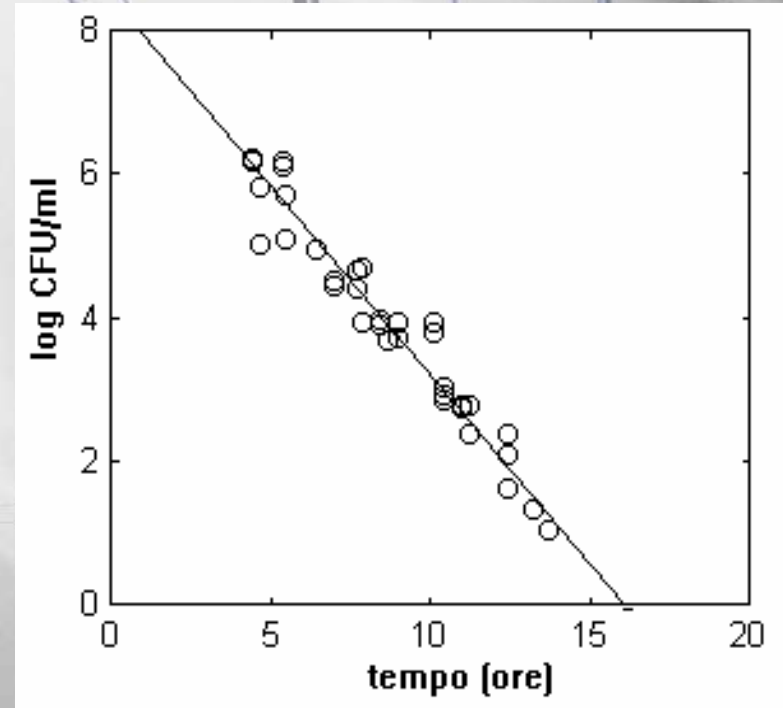
### Figura 3: linearita' della risposta ottenuta mediante la conta su piastra delle CFU/ml.

Il logaritmo della conta su piastra delle CFU per ml e' stato messo in grafico contro la diluizione. La regressione lineare ha dato un alto valore di correlazione ( $r=0.993$ ). La pendenza della retta (linea continua= $1.04$ ) ha dato un valore vicino al valore teorico (linea tratteggiata= $1.00$ ), probabilmente per una leggera sottostima alle diluizioni maggiori. Dalla regressione lineare si ricava anche la stima del contenuto iniziale del campione:  $10^{(6.09)}=1.23e6$ . Facendo la media delle conte (tenendo in considerazione le diluizioni) si ottiene :  $1.05 \pm 0.46 e6$  (ovvero  $\pm 43\%$ ).



**Figura 4: Retta di correlazione tra concentrazione di coliformi (espressa come log cfu/ml) e tempo occorso per il cambiamento di colore.**

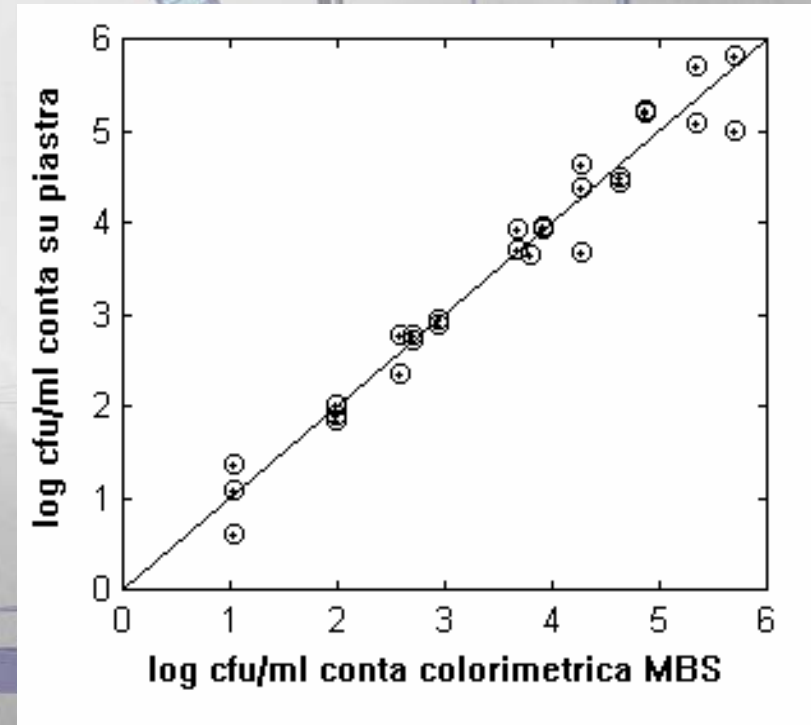
Notare la buona correlazione tra i tempi e le concentrazioni dei coliformi ( $r=0.977$ ), La regressione lineare dei punti fornisce l'equazione della retta:  $\log \text{CFU/ml} = 8.48 - 0.53 \times \text{tempo (ore)}$ .



## Figura 5: Paragone grafico tra i metodi

Il logaritmo delle conte su piastra delle CFU/ml ottenuti alle differenti diluizioni, e' stato messo in grafico rispetto al logaritmo della conta con metodo colorimetrico, espresso anch'esso come CFU/ml. Questo grafico permette una immediata visualizzazione della corrispondenza tra due metodi di analisi [13].

La linea retta rappresenta la corrispondenza tra le conte effettuate con il metodo della conta su piastra ed il metodo colorimetrico. Il valore ottenuto (1.005) e' molto vicino al valore teorico di completa corrispondenza (1.00). Inoltre, l'alto valore di correlazione ( $r = 0.982$ ) indica una piccola dispersione dei punti sperimentali che risultano vicini alla retta.



## ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 1: ANALISI DELLA VARIANZA AD UN FATTORE (ANOVA TEST)

Paragone tra due tipi di analisi, considerando la diluizione per tutte le osservazioni effettuate.

Metodi (m)→	Conte su piastra corrette per la diluizione (log CFU/ml) (cp)	Conte colorimetriche corrette per la diluizione (log CFU/ml) (cc)	Totale
osservazioni (k) ↓			
1	62.055	59.400	
2	61.717	59.900	
3	61.523	60.400	
4	59.330	59.400	
5	59.227	59.900	
6	59.284	60.400	
7	58.785	59.400	
8	59.435	59.900	

Termine di correzione (quadrato della somma di tutte le osservazioni/mk)

$$(CT) = (\text{sum}(cp) + \text{sum}(cc)) \cdot \frac{1}{30} (\text{osservazioni totali}) = 1.0753e3$$

Somma dei quadrati tra i metodi (quadrato della somma delle osservazioni / le osservazioni-CT)

$$(A) = (\text{sum}(cp))^2 / 15 (\text{osservazioni}) + (\text{sum}(cc))^2 / 15 - ct = 2.612e-4$$

Somma totale dei quadrati (somma del quadrato di tutte le osservazioni-CT)

$$(B) = \text{sum}(cp.^2) + \text{sum}(cc.^2) - ct = 0.4995$$

Somma dei quadrati tra le osservazioni (C) = B-A = 0.4992

**ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 1:  
ANALISI DELLA VARIANZA AD UN FATTORE (ANOVA TEST)**

**Tabella della varianza**

<b>Sorgente della variazione</b>	<b>Gradi di liberta' (DF)</b>	<b>Somma dei quadrati (SS)</b>	<b>Media quadratica (MS=SS/DF)</b>	<b>valore di F (*/**)</b>
<b>tra i metodi</b>	<b>(2-1)=1</b>	<b>(A)= 2.612e-4</b>	<b>2.612e-4*</b>	<b>0.0147</b>
<b>tra le osservazioni</b>	<b>(30-2)=28</b>	<b>(C)= 0.4992</b>	<b>0.0178 **</b>	
<b>totale</b>	<b>(30-1)=29</b>	<b>(A+C=B)= 0.4995</b>	<b>0.0172</b>	

$F(1,28)=0.0147$ . Poiche' limite 1% per 1,28 gradi di liberta'= 4.17

**le differenze tra i metodi non sono statisticamente significative**

## ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 2: ANALISI DELLA VARIANZA A DUE FATTORI

Paragone tra due tipi di analisi, ciascuna provata a piu' diluizioni o su differenti campioni, usando piu' determinazioni per la stessa diluizione o per lo stesso campione

**m** tipi di analisi (conta su piastra e conta colorimetrica, qui = 2)  
**s** diluizioni o campioni (diluizioni o campioni utilizzati, qui = 5)  
**k** numero di osservazioni indipendenti per ciascuna diluizione o ciascun campione (numero di piastre o di fiale utilizzate per ciascuna diluizione o per ciascun campione, qui =3)  
**msk**= numero totale di osservazioni, qui 30

conta su piastra (**cp**) =  $\log_{10}(\text{conte.}/\text{dil})$   
 conte: dalla Tabella 1, conte di CFU su piastra

conta colorimetrica (**cc**)=  $\log_{10}(\text{contemb.}/\text{dil})$   
 contemb: dalla retta di taratura, corrispondenza tra tempo e CFU/ml (n.b. aggiunto un errore alla prima e terza determinazione di 5 minuti in meno ed in piu' rispettivamente)

numero totale di osservazioni (**msk**) =  $2 \cdot 5 \cdot 3 = 30$

Somma di tutte le osservazioni (**X**) =  $\sum([\text{cp}' \text{ cc}']) = 179.6115$

Termine di correzione Quadrato della somma di tutte le osservazioni / numero totale di osservazioni (**CT**):  
 $(X)^2 / msk = 179.6115^2 / 30 = 1.0753e3$

Somma totale dei quadrati Somma di tutte le osservazioni elevate al quadrato / CT  
**(E)** =  $\sum \text{cp}(1)^2 + \text{cp}(2)^2 + \dots + \text{cc}(15)^2 - \text{CT} = \sum([\text{cp.}^2 \text{ cc.}^2]) - \text{ct} = 0.4983$

Diluizione o campione	Conta su piastra (cp)	Conta colorimetrica (cc)
1e-1	6.2055	5.9400
	6.1717	5.9900
	6.1523	6.0400
1e-2	5.9330	5.9400
	5.9227	5.9900
	5.9284	6.0400
1e-3	5.8785	5.9400
	5.9435	5.9900
	5.8603	6.0400
1e-4	5.8261	5.9400
	6.0043	5.9900
	5.8921	6.0400
1e-5	6.3424	5.9400
	5.6021	5.9900
	6.0792	6.0400

## ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 2: ANALISI DELLA VARIANZA A DUE FATTORI

**Tabella 2 Osservazioni raggruppate per diluizione (o per campione)**

diluizione	$\Sigma_{cp}$	$\Sigma_{cc}$	Totale Tc
1e-1	18.5489	17.9700	36.5189
1e-2	17.7841	17.9700	35.7541
1e-3	17.6824	17.9700	35.6524
1e-4	17.7225	17.9700	35.6925
1e-5	18.0237	17.9700	35.9937
<b>Totale Tr</b>	89.7615	89.8500	179.6115

**$\Sigma_{cp}$**  Sommatoria dei tre valori di conta su piastra (cp) della Tabella precedente ottenuti alla stessa diluizione o sullo stesso campione (**scp(1:5)**):  $scp(1)=\text{sum}(cp(1:3))$ ; .....;  $scp(5)=\text{sum}(cp(12:15))$ ;

**$\Sigma_{cc}$**  Sommatoria dei tre valori di conta colorimetrica (cc) della Tabella precedente ottenuti alla stessa diluizione o sullo stesso campione (**scc(1:5)**):  $scc(1)=\text{sum}(cc(1:3))$ ;...;  $scc(5)=\text{sum}(cc(12:15))$ ;

**Tc**: Totale delle osservazioni effettuate con entrambi i metodi su una stessa diluizione o campione

**Tr**: Totale delle osservazioni effettuate su tutti le diluizioni od i campioni con lo stesso metodo

Somma dei quadrati dei trattamenti *Somma dei quadrati delle somme di tutte le osservazioni su tutti i campioni / k - CT*

$$(T) = \Sigma (\Sigma_{cp(1)}^2 + \Sigma_{cp(2)}^2 + \dots \Sigma_{cc(5)}^2) / k - CT = \text{sum}([\text{scp.}^2 \text{ scc.}^2]) / 2 - ct = 1.73e-1$$

Somma dei quadrati tra i valori *Somma dei quadrati delle somme delle osservazioni su ciascun campione / km - CT*

$$(S) = \Sigma (\text{Totalec}(1)^2 + \dots \text{Totalec}(5)^2) / km - CT = \text{sum}([(scp(1)+scc(1)).^2 \dots (scp(5)+scc(5)).^2]) / 6 - ct = 0.0870$$

Somma dei quadrati tra le somme totali *Somma dei quadrati delle somme delle osservazioni con ciascun metodo / ks - CT*

$$(M) = \text{Totaler}(1)^2 + \text{Totaler}(2)^2 / ks - CT = (\text{sum}(scp))^2 + (\text{sum}(scc))^2 / 15 - ct = 2.66e-4$$

Somma dei quadrati delle interazioni (I) = T - (M + S) = 8.58e-2

Somma dei quadrati degli errori (R) = E - T = 0.4983 - 0.173 = 3.25e-1

## ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 2: ANALISI DELLA VARIANZA A DUE FATTORI

### Tabella della varianza

sorgente della variazione	gradi di liberta' (DF)	somma dei quadrati (SS)	media quadratica (MS=SS/DF)	valore di F (*/**)
campioni (5)	4	0.0870 (S)	0.0217	
analisi (2)	1	2.66e-4 (M)	2.66e-2	
interazioni	4*1=4	8.58e-2 (I)	2.15e-2 *	0.264
errore	20	3.25e-1 (R)	1.63e-2 **	

Quindi  $F(4,20)=0.264$  .Poiche' limite 1% per 4,20 gradi di liberta'= 2.87

**le differenze tra i metodi non sono statisticamente significative**

Errore massimo possibile della conta colorimetrica: Poiche' nella conta colorimetrica i campioni vengono osservati ogni 30 minuti, viene assunto un errore massimo possibile di 0.5 ore. Per tale motivo le tre osservazioni compiute con il metodo colorimetrico ad ogni diluizione sono state distanziate di 30 minuti anche se in realta' l'operatore ha osservato il cambiamento di colore simultaneamente.

**Tabella degli errori sulle conte su piastra e sulle conte colorimetriche**

Diluizione	Conta su piastra (cp)	Media ( $\pm$ DS)	RDS (DS/M)	Conta colorimetrica (cc)	Media ( $\pm$ DS)	RDS (DS/M)
1e-1	1605 1458 1458	1507.0 $\pm$ 84.8705	0.0563	6.0 6.5 7.0	6.5 $\pm$ 0.5	0.0769
1e-2	857 837 848	847.3 $\pm$ 10.0167	0.0118	8.0 8.5 9.0	8.5 $\pm$ 0.5	0.0588
1e-3	756 878 725	786.3 $\pm$ 80.8847	0.1029	10.0 10.5 11.0	10.5 $\pm$ 0.5	0.0476
1e-4	67 101 78	82.0 $\pm$ 17.3494	0.2116	12.0 12.5 13.0	12.5 $\pm$ 0.5	0.0400
1e-5	22 4 12	12.7 $\pm$ 9.0185	0.7120	14.0 14.5 15.0	14.5 $\pm$ 0.5	0.0345

**Conta su piastra:** Media quadratica dello scarto relativo=  
 $\sqrt{((RSD(1))^2+RSD(2))^2+ \dots +RSD(5)^2)/5} = \sqrt{(\text{sum}(rds.^2))/5} = 0.3363$

**Conta colorimetrica:** Media quadratica dello scarto relativo=  
 $\sqrt{((RSD(1))^2+RSD(2))^2+ \dots +RSD(5)^2)/5} = \sqrt{(\text{sum}(rds.^2))/5} = 0.0537$

**L'incertezza sulla misura e' maggiore per il metodo delle conte su piastra, anche considerando l'errore massimo possibile del metodo colorimetrico (30 minuti).**

### **Precisione:**

Sono stati utilizzati i test statistici dell'analisi della varianza ad una via e dell'analisi della varianza a due vie per determinare la precisione del metodo colorimetrico MBS utilizzando come metodo di confronto il metodo delle conte su piastra.

**Analisi della varianza:  $F(1,28)=0.0147$ . (limite 1% = 4.17)**

**Analisi della varianza a due vie:  $F(4,20)=0.264$  . (limite 1% = 2.87)**

### **Stima dell'incertezza:**

E' stata calcolata per mezzo dell'analisi statistica della media quadratica dello scarto relativo (RDS)

**Conta su piastra= 0.3363; Conta colorimetrica MBS: = 0.0537**

### **Limiti operativi affidabili:**

Il metodo colorimetrico MBS e' risultato paragonabile al metodo della conta su piastra per **concentrazioni di coliformi comprese tra  $1 \times 10^6$  e  $\leq 10$  CFU/ml.**

## CONCLUSIONI

Il metodo colorimetrico denominato Microbo BioSensori (MBS), utilizzato per la rilevazione e conta di coliformi in campioni di acque superficiali, **mostra una risposta lineare a concentrazioni microbiche comprese tra  $1 \times 10^6$  e  $< 10$  CFU/ml.**

L'analisi statistica dimostra che **la precisione e sensibilita' del metodo colorimetrico MBS e' paragonabile a quella ottenuta con il metodo delle conte su piastra.**

**La ripetitivita' del metodo colorimetrico MBS e' risultata superiore a quella del metodo delle conte su piastra.**

### NORMATIVA DI RIFERIMENTO

- 1) Norma Internazionale ISO 9998 (1991)  
"Practices for evaluating and controlling colony count media used in water quality tests"
- 2) Technical Report ISO/TR 13843 (2000)  
"Water quality. Guidance on validation of microbiological methods".
- 3) Norma UNI ENV ISO 13843 (2003):  
"Guida per la validazione di metodi microbiologici"



**DALLA RICERCA LA VITA**

La MBS srl nasce dalle ricerche originali sviluppate in collaborazione con l'Università "Roma Tre" e rappresenta la migliore dimostrazione delle potenzialità di trasferimento tecnologico di ricerche universitarie che hanno importanti ricadute anche nel campo economico e sociale.



L'ing. Alberto Mari è l'amministratore delegato.

Il prof. Giovanni Antonini (Ordinario di Biologia Molecolare dell'Università Roma Tre) è il direttore scientifico

Fanno parte del team di ricerca e sviluppo le dr.sse Serena Salvucci, Alessandra Capodaglio, Alessandra Antonini, Eleonora Lo Cicero, Francesca Romana Priolisi.

**M.B.S. Srl**

Polo Tecnologico Tiburtino  
Via Giacomo Peroni 386,  
00131 Roma - Italy  
C.F. e P.I. 09423051003  
REA 1162609,  
tel +39.06.83767529  
fax +39.06.40040364

info@emmebiesse.net  
[www.emmebiesse.net](http://www.emmebiesse.net)

**MBS**

MICROBIOLOGICAL  
SURVEY

## **MBS-HACCP&ACQUE EASY TEST**

**IL LABORATORIO  
IN UNA PROVETTA**



**E' possibile richiedere una confezione di prova di**

**MBS HACCP&ACQUE easy test a:**

**info@emmebiesse.net**

**oppure**

**tel 06. 83767529**