

EDITORIALE

Il "Notiziario dei Metodi Analitici" presenta in questo numero due metodi microbiologici, uno riguardante l'isolamento e l'identificazione di oocisti di *Cryptosporidium* in acque reflue e l'altro la ricerca e l'isolamento di *Aeromonas* sp. in acque sotterranee o superficiali da destinare all'approvvigionamento idrico-potabile.

I metodi, risultato dell'attività del Gruppo di Lavoro che si interessa della predisposizione di metodi microbiologici per la tutela delle acque, si aggiungono a quelli ufficiali già pubblicati riguardanti la determinazione di coliformi totali, coliformi fecali e streptococchi fecali nelle acque ed arricchiscono il quadro delle determinazioni microbiologiche riportate nel manuale IRSA "Metodi Analitici per le Acque".

In particolare, la determinazione di oocisti di *Cryptosporidium* in acque reflue riveste notevole importanza dal punto di vista sanitario sia per la facilità di trasmissione dell'infezione attraverso l'acqua, sia per l'inefficacia dei tradizionali processi di depurazione delle acque nella rimozione di detti parassiti. I microorganismi del genere *Aeromonas*, invece, vengono isolati frequentemente nelle acque potabili su uno dei terreni colturali utilizzati per la conta dei coliformi totali e sebbene non siano tra gli indici da ricercare nella valutazione della qualità delle acque destinate al consumo umano, risultano di interesse per il ruolo svolto da alcune specie come patogeni gastrointestinali.

In questo numero viene anche presentato un metodo per la determinazione del solfito basato sull'impiego di un sensore enzimatico a solfito ossidasi. Al pari dei metodi enzimatici il metodo è caratterizzato da buona sensibilità ed elevata selettività ma, a differenza di questi, consente determinazioni più rapide e costi di analisi molto più contenuti che lo rendono particolarmente indicato per applicazioni analitiche di tipo routinario su matrici reali.

Con riferimento alle segnalazioni pervenute presso questo Istituto, da parte di alcuni laboratori di controllo, inerenti la presunta non univoca definizione dei protocolli analitici IRSA da considerarsi ufficiali ai sensi delle normative vigenti, si rammenta che sul frontespizio del volume "Metodi Analitici per le Acque" (Quad. IRSA n.100, 1994), edito dall'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, viene indicato che "la raccolta comprende i metodi previsti dalla legge 10 maggio 1976 n. 319 e dal D. Lgs. 25 gennaio 1992, n.

130". Si ribadisce, tuttavia, per maggiore chiarezza che i metodi inseriti in detto volume integrano e sostituiscono i precedenti metodi IRSA.

Per quanto concerne le metodologie da utilizzare in applicazione di altre normative riguardanti il controllo della qualità delle acque, diverse da quelle precedentemente indicate, si riafferma che i metodi IRSA, non avendo in questo caso carattere di ufficialità possono al più costituire, in assenza di altre metodiche ufficiali, un protocollo analitico utilizzabile alla stessa stregua di altre procedure analitiche standard pubblicate in ambito nazionale ed internazionale.

Si desidera, infine, ricordare che le metodologie analitiche pubblicate sul Notiziario IRSA dei Metodi Analitici sono da intendersi come metodi tentativi, sottoposti all'esame della comunità scientifica e dei laboratori di controllo, da cui si attendono valutazioni e/o preziosi suggerimenti circa eventuali modifiche da apportare al protocollo d'analisi prima che lo stesso divenga ufficiale attraverso la pubblicazione nel Manuale IRSA "Metodi Analitici per le Acque".

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, luglio 1997

INDICE

EDITORIALE	1
DETERMINAZIONE DEL SOLFITO PER MEZZO DI UN SENSORE ENZIMATICO A SOLFITO OSSIDASI.	2
METODO PER L'ISOLAMENTO E L'IDENTIFICAZIONE DI OOCISTI DI <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> IN ACQUE REFLUE.	8
METODO PER LA RICERCA E L'ISOLAMENTO DI <i>AEROMONAS</i> SP. IN ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO	11
OSSERVAZIONI E QUESITI	15

DETERMINAZIONE DEL SOLFITO PER MEZZO DI UN SENSORE ENZIMATICO A SOLFITO OSSIDASI.

L. Campanella, M.P. Sammartino e M. Tomassetti.

Dip.to di Chimica, Università "La Sapienza", Roma

RIASSUNTO

Viene descritto un biosensore per l'analisi del solfito basato sulla immobilizzazione con un metodo chimico della solfito ossidasi in membrana di nailon funzionalizzato e sulla misura del consumo di ossigeno a seguito dell'ossidazione biocatalitica del solfito a solfato.

SUMMARY

We aimed at developing an enzymatic sensor for sulphite determination characterised by simplicity, handiness, long lifetime, short response time, good analytical performance and suitable to be used in the analysis of authentic samples. The method is based on the catalytic action of sulphite oxidase, opportunely immobilised in functionalised nylon membranes, for the oxidation of sulphite to sulphate, with oxygen consumption, which is measured and related to sulphite concentration.

1 - INTRODUZIONE

È ben noto come il solfito e derivati (bisolfito, metabisolfito) vengono utilizzati in vari settori industriali: ad esempio nell'industria alimentare per conservare cibi e bevande, date le proprietà antimicrobiche ed antiossidanti; il solfito viene anche impiegato nell'industria tessile, nell'industria conciaria, nell'industria della carta, in numerosi trattamenti chimici connessi alla produzione della polpa di cellulosa, nel trattamento delle acque industriali, per la rimozione di ossigeno, o cloro in eccesso, nell'industria farmaceutica e fotografica. A causa di questi ed altri impieghi, il solfito viene a trovarsi nei prodotti finali delle varie lavorazioni, oppure è riversato nell'ambiente, attraverso gli effluenti; in questo ultimo caso, impoverendo di ossigeno le acque naturali, esso interferisce e danneggia l'ecosistema oltre a rappresentare un rischio per la salute umana (Sullivan e Smith, 1985). Degli aspetti analitici di questo problema ci siamo già occupati (Campanella *et al.*, 1995).

1.1 - Metodi analitici classici per il dosaggio del solfito

In letteratura sono riportate diverse tecniche analitiche per la determinazione del solfito. Uno dei più noti metodi di analisi utilizzati è quello di Monnier-Williams (1972) nonostante, come è noto, esso non sia esente da interferenze quando sono presenti solfuri, o composti solforati (Courtney *et al.*, 1986) e come sia inoltre piuttosto laborioso e poco adatto ad analisi di routine. Per questi motivi, come noto, sono state proposte delle modifiche al metodo classico, sia nella fase estrattiva del metodo (Tanner, 1963), per diminuire i tempi di analisi, sia nell'analisi del distillato (Johnson e Wedzicha, 1979), per risolvere il problema delle interferenze causato da altri composti solforati.

Per quanto riguarda la determinazione del solfito, in matrice acquosa, nella letteratura scientifica sono riportati soprattutto due metodi: un metodo per titolazione volumetrica ed un metodo spettrofotometrico. Nel primo caso (IRSA, 1972) si sfrutta la reazione di ossidazione del solfito in presenza di un eccesso di iodio, che viene poi retrotitolato con tiosolfato. Con questo metodo, in alcuni casi possono essere trovati risultati in forte eccesso rispetto al contenuto reale di solfito, a causa dell'interferenza di altre sostanze riducenti. Nel secondo caso (IRSA, 1982), il campione viene fatto reagire con p-rosanilina e formaldeide, per produrre un composto colorato, determinabile spettrofotometricamente a 550 nm; in questo caso il problema principale è rappresentato dalle possibili interferenze dovute ad eventuali composti solforati presenti, in quanto la reazione non è del tutto specifica per il solo solfito. In aggiunta tale metodo presuppone l'uso di un composto (la p-rosanilina) riconosciuto come cancerogeno; per questi motivi, negli ultimi anni il metodo è stato abbandonato in favore di altri metodi di analisi del solfito, basati principalmente sull'uso della cromatografia ionica (Steven *et al.*, 1977; Lindgren *et al.*, 1982; Grados *et al.*, 1986; IRSA, 1994).

1.2 - Metodi enzimatici a rivelazione spettrofotometrica

Negli ultimi anni è stato proposto anche l'uso di metodi enzimatico-spettofotometrici. Un metodo (Cabrè *et al.*, 1990) prevede la determinazione del solfito tramite il dosaggio del "consumo" di ferricianuro di potassio: la reazione redox, che ha luogo tra solfito e ferricianuro, con conseguente produzione di solfato e ferrocianuro, è catalizzata dall'enzima solfito ossidasi, la concentrazione del solfito viene ottenuta determinando la diminuzione della concentrazione del ferricianuro di potassio misurata tramite la variazione dell'assorbanza a 420 nm.

Un altro metodo enzimatico (Beutler, 1984) sfrutta la reazione di ossidazione del solfito in presenza di ossigeno e dell'enzima solfito-ossidasi: il perossido di idrogeno, che si produce in questa reazione, viene ridotto in presenza dell'enzima NADH-perossidasi e di NADH, mentre quest'ultimo viene ossidato a NAD⁺. La quantità di NADH "consumata" risulta equivalente alla quantità di solfito. Il NADH viene determinato misurandone l'assorbanza a 340 nm.

Si osserva quindi che non mancano metodi classici, o più moderni per la determinazione del solfito, tuttavia il dosaggio del solfito, in matrici reali, è reso spesso difficoltoso da vari fattori:

- Il metodo analitico utilizzato deve necessariamente possedere buona sensibilità, ma soprattutto un basso limite minimo di rivelabilità, soprattutto se il solfito deve essere determinato in matrici ambientali.
- Possibilità di interferenze, a seconda anche del metodo di analisi scelto, a causa della presenza di altri composti solforati.
- Instabilità dell'analita, dovuta alla facilità con cui il solfito può essere ossidato da parte di numerosi agenti ossidanti, quali ad esempio l'ossigeno disciolto in soluzione. Ciò comporta la necessità di effettuare analisi estremamente rapide, o, alternativamente che si faccia uso di uno stabilizzante (Campanella *et al.*, 1990) la cui eventuale aggiunta, al campione reale, oltre che alle soluzioni utilizzate nelle calibrazioni, deve essere tuttavia attentamente valutata, perché potrebbe dar luogo ad interferenze.

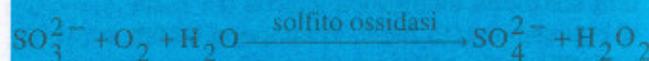
Praticamente tutte le tecniche analitiche impiegate, o proposte, hanno delle limitazioni che riguardano uno, o più d'uno, dei punti sopra esposti. Di qui la ricerca di nuove tecniche analitiche, alternative a quelle classiche.

1.3 - Biosensori elettrochimici

I metodi enzimatici, con rivelazione spettrofotometrica, sono dotati contemporaneamente di buona sensibilità ed elevata selettività, il loro costo tuttavia risulta notevolmente elevato per applicazioni routinarie. La quantità di enzima necessaria per il test, infatti, deve essere rinnovata ogni volta che si effettua una singola analisi (il suo recupero, è evidente, richiederebbe tempi troppo lunghi); ci siamo perciò dedicati alla messa a punto di sensori elettrochimici che, accoppiati ad un mediatore biologico (enzima), risultassero dotati di grande selettività verso la specie da analizzare (solfito), ma che, al tempo stesso, fossero applicabili anche in determinazioni routinarie di campioni reali, puntando quindi anche all'abbattimento dei costi e dei tempi di analisi, mantenendo tuttavia, i risultati analitici, sufficientemente precisi ed accurati.

Tutto ciò è stato possibile, in pratica, mettendo a punto dei biosensori elettrochimici per il solfito.

I biosensori elettrochimici, per la determinazione del solfito, si basano in genere (Fonong, 1986; Smith, 1987) sull'accoppiamento di un elettrodo indicatore amperometrico, per la determinazione dell'ossigeno, o del perossido di idrogeno e sulla seguente reazione di ossidazione del solfito:



che viene catalizzata dall'enzima solfito ossidasi. Per la determinazione del solfito nelle acque è stato sviluppato, in questa ricerca, un sensore enzimatico-amperometrico, per il quale è stato impiegato, come indicatore, un elettrodo di Clark ed utilizzato un metodo chimico di immobilizzazione, dell'enzima solfito ossidasi, su membrana di nailon funzionalizzato.

2 - PARTE SPERIMENTALE

2.1 - Apparecchiature

Potenziometro Orion ion-analyzer EA 940; elettrodo di Clark per la misura dell'ossigeno Orion Mod. 97-08-00; agitatore magnetico della Heidolph MR2002; registratore Amel Mod. 868-Recorder; termostato Julabo 5; cella termostata da 30 mL in vetro, con camicia a circolazione forzata di acqua.

2.2 - Reattivi

L'enzima solfito-ossidasi (E.C. 1.8.3.1.) 50 U (estratto dal fegato di pollo) è stato fornito dalla Sigma. Il solfito di sodio, il metabisolfito di sodio, il bisolfito di sodio e il D(-)-fruttosio sono stati forniti dalla Carlo Erba; la N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimide, dalla Sigma; la glicina, dalla Merck; la membrana di nailon funzionalizzato (nailon 6.6, porosità 0,45 µm), fornita dalla Pall Biodyne. Tutti i reattivi utilizzati erano di tipo "puro per analisi".

2.3 - Campioni

I campioni analizzati sono stati acque industriali di scarico, campionate in industrie di differente natura e conservate in bottiglie di vetro sigillate, oppure acque superficiali naturali (acqua di mare, o di fiume). L'analisi dei campioni è stata effettuata immediatamente dopo l'apertura del contenitore.

3 - METODI

3.1 - Assemblaggio del biosensore

È stato utilizzato un elettrodo indicatore amperometrico a diffusione gassosa per l'ossigeno (elettrodo di Clark). L'elettrodo è costituito da un catodo di platino ed un anodo di Ag/AgCl, immersi in una soluzione elettrolitica interna 0,1 mol/L in cloruro di potassio e 1/15 mol/L in tampone fosfato a pH 6,6, separata dalla soluzione da analizzare mediante una membrana di teflon, permeabile all'ossigeno e impermeabile all'acqua ed agli altri elettroliti, fissata all'estremità dell'elettrodo per mezzo di un O-ring. L'ossigeno diffonde, quindi, attraverso la membrana, nella soluzione elettrolitica interna; applicando al catodo di platino una differenza di potenziale pari a -650 mV, rispetto all'anodo, l'ossigeno si riduce al catodo. La riduzione dell'ossigeno al catodo provoca un passaggio di corrente nel circuito esterno, la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'ossigeno nella soluzione da analizzare.

L'assemblaggio del biosensore viene realizzato bloccando all'estremità dell'elettrodo di Clark, innanzitutto la membrana gas permeabile di teflon, quindi la membrana su cui è immobilizzato l'enzima, infine una membrana da dialisi, che risulta quindi sovrapposta alle prime due. Le tre membrane sono fissate sul sensore per mezzo di un apposito O-ring.

Il funzionamento del biosensore si basa sulla reazione enzimatica sopra riportata e sulla misura, tramite l'elettrodo di Clark, del consumo di ossigeno, che si produce nel corso di tale reazione e che risulta proporzionale alla concentrazione del substrato (solfito).

3.2 - Immobilizzazione dell'enzima

L'immobilizzazione (di tipo chimico), dell'enzima solfito ossidasi, è stata effettuata su una membrana di nylon funzionalizzato, che presenta cioè gruppi carbossilici liberi sulla superficie del polimero. Il reattivo impiegato, per "l'attivazione" del polimero funzionalizzato, è la N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide (Campanella *et al.*, 1990). Si pone in pratica la membrana di nylon funzionalizzato in una soluzione di NaH_2PO_4 0,5 mol/L, a pH 4,7, contenente 0,1 mol/L di carbodiimmide, lasciandola sotto agitazione magnetica per 40 minuti, a temperatura ambiente. La membrana viene quindi lavata con tampone fosfato 0,1 mol/L a pH 7. Si stratificano quindi 25 U dell'enzima solfito-ossidasi sulla membrana umida, cercando di rendere più omogenea possibile la sua deposizione. La membrana, così ottenuta, viene lasciata in camera umida per 24 ore a 4°C.

La membrana viene poi fissata all'elettrodo tra la membrana gas permeabile ed una membrana da dialisi, per mezzo di un O-ring di teflon.

3.3 - Curva di calibrazione

In una cella termostata a 25 °C, contenente 25 mL di tampone glicina 0,1 mol/L, pH 8, sotto agitazione magnetica, si immerge il biosensore e si attende la stabilizzazione del segnale dell'elettrodo; si aggiungono quindi volumi noti di una soluzione standard 0,025 mol/L di solfito sodico, preparata di fresco, si registra ogni volta la variazione del segnale, fino ad ottenere, dopo un tempo di 2 minuti, il 90% della risposta totale. Per ottenere la curva di calibrazione si riporta in grafico la risposta del sensore, in ΔppmO_2 (diminuzione della concentrazione di ossigeno registrata), in funzione della concentrazione di solfito in soluzione. Viene naturalmente registrata anche la risposta del sensore in assenza di enzima, ottenuta con le medesime modalità sopra descritte, ma utilizzando il sensore privo della membrana enzimatica.

3.4 - Analisi del campione

Una volta ottenuta la curva di calibrazione, si procede all'analisi del campione. Nella cella termostata (25 °C) e sotto agitazione magnetica, contenente 25 mL di tampone glicina si aggiunge un opportuno volume di campione e, con il biosensore immerso nella soluzione tampone, si registra la corrispondente variazione del segnale.

Si risale alla concentrazione di solfito nel campione, servendosi dell'apposita curva di calibrazione, costruita come sopra descritto.

4 - RISULTATI

L'ottimizzazione dei parametri elettrochimici e delle condizioni di lavoro del metodo proposto, che utilizza un biosensore a solfito ossidasi per l'analisi del solfito, è stata discussa dettagliatamente in una nota precedente (Campanella *et al.*, 1995). In Tab. 1 vengono quindi brevemente riassunte, sia le condizioni impiegate nella costruzione della curva di calibrazione, che i dati analitici ottenuti, relativi all'intervallo di concentrazione in cui la risposta del sensore è correlata linearmente alla concentrazione del solfito in soluzione. In Tab. 1 sono riassunti anche i dati di precisione ed accuratezza, operando in soluzioni standard di solfito, infine sono indicati il tempo di risposta ed il "tempo di vita" del biosensore da noi sviluppato.

In Tab. 2 sono indicati i risultati, trovati nelle esperienze effettuate allo scopo di evidenziare eventuali risposte del biosensore, verso altri composti solforati. Il confronto è effettuato con le risposte ottenute per soluzioni standard di solfito. I valori sono espressi come attività relativa % (determinata impiegando rispettivamente come substrato ognuno

di questi composti) rispetto all'attività ottenuta impiegando soluzioni standard di solfito, fatta uguale al 100%. Nella stessa tabella è riportata anche la risposta del biosensore verso il solfito, misurata in presenza di alcune sostanze con possibile azione interferente; anche in questo caso sono riportate le attività relative % trovate, rispetto a quella ottenuta con soluzioni standard di solo solfito, posta uguale al 100%. Tra le sostanze interferenti considerate vi sono anche gli ioni Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} , in quanto in letteratura è riportato che alcuni ioni metallici esercitano attività catalitica nella reazione di ossidazione del solfito (Campanella *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1979).

Come già detto, dopo essere stato standardizzato, l'elettrodo è stato utilizzato in misure su campioni reali. In Tab. 3 vengono quindi riportati i dati, sino a questo momento ottenuti, concernenti la determinazione del contenuto di solfito in acque industriali o superficiali. I campioni analizzati subito dopo l'apertura del contenitore, non sono stati sottoposti ad alcun pretrattamento prima dell'analisi. Sono state valutate sia la precisione che l'accuratezza delle misure nell'analisi dei campioni reali. L'accuratezza è stata valutata mediante prove di recupero, effettuate dopo aggiunta di quantità note di solfito ai campioni di acque industriali e a quelli di acqua di mare o di fiume naturali, è stato inoltre analizzato un campione di acqua di mare sintetica (Campanella *et al.*, 1995). A questo scopo in Tab. 3 sono riportati i valori dei recuperi (come mg/L di SO_2 totale), ottenuti con il metodo dell'aggiunta standard,

utilizzando il sensore enzimatico; nella stessa tabella la ripetibilità della misura è stata valutata in base ai valori delle RSD% ottenute.

5 - DISCUSSIONE

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di sviluppare un metodo per il dosaggio del solfito che fosse competitivo, sotto il profilo analitico, con le tecniche generalmente utilizzate, ma, rispetto a queste, risultasse al tempo stesso molto più rapido e conveniente, anche rispetto al costo per analisi. Vari ricercatori, negli ultimi anni, hanno realizzato biosensori per il dosaggio del solfito. In questo contesto sono stati realizzati sistemi di misura, ottenuti con tecniche diverse. Ad esempio Karube e Tamiya (1987) hanno realizzato un biosensore accoppiando organelli subcellulari (contenenti solfito ossidasi) con un elettrodo per l'ossigeno, dello stesso tipo di quello da noi impiegato; Smith (1987) ha invece realizzato un biosensore analogo, utilizzando però l'enzima solfito ossidasi purificato, intrappolato su gel. Infine Fontong (1986), e Nabirahni e Vaid (1991) hanno realizzato biosensori per il solfito accoppiando un elettrodo per H_2O_2 , rispettivamente con l'enzima solfito ossidasi immobilizzato chimicamente su collagene, oppure su una membrana fisiologica di intestino di maiale.

Tab. 1 - Condizioni di lavoro e principali dati analitici, in soluzioni standard di solfito, per il biosensore a solfito ossidasi

Elettrodo indicatore	(Clark) amperometrico a diffusione gassosa
Enzima	solfito ossidasi
Metodo di immobilizzazione	in membrana di nailon funzionalizzato
Substrato	solfito
Agente stabilizzante	fruttosio (in rapporto 1:1 (p/p) con il solfito)
Tampone	glicina 0,5 mol/L
pH	8
Temperatura (°C)	25
Tempo di risposta (min)	2
Tempo di vita (giorni)	≥ 15
Intervallo di linearità (mol/L)	$4,0 \cdot 10^{-5}$ - $8,0 \cdot 10^{-4}$
Precisione su standard (Pooled SD%)	4,2
Curva di calibrazione	$y = 0,293(\pm 0,003)x + 0,018$
($x = (\text{mol/L}) \cdot 10^4$, $y = \Delta \text{ppmO}_2$)	($r = 0,9994$)
Accuratezza su standard (%)	-3,3 - +6,5

Tab. 2 - Valutazione di possibili interferenti nell'analisi del solfito con il biosensore a solfito ossidasi.

Interferente	Attività relativa dell'interferente *	Variazione % dell'attività relativa del solfito **
Metabisolfito	116,0	
Bisolfito	106,0	
Solfato	0,0	
Tiosolfato	0,0	
Solfuro	15,9	
Citrato	0,0	112,4
Nitrito	0,0	115,4
Fe ²⁺	24,6***	124,6
Fe ³⁺	0,0	101,3
Cu ²⁺	0,0	117,8
Mn ²⁺	0,0	448,0

* valore % della pendenza della curva di calibrazione, per ognuna delle specie interferenti studiate, riferito al valore della pendenza della curva di calibrazione del solfito, presa come 100%.

** valore % della pendenza della curva di calibrazione del solfito, ottenuta in presenza della specie interferente indicata nella prima colonna a sinistra, riferito al valore della pendenza della curva di calibrazione del solfito, in assenza di interferente, presa come 100%.

*** risposta "non enzimatica" del sensore dovuta ad ossidazione "spontanea" del Fe²⁺ a Fe³⁺

Tab. 3 - Recupero di solfito (come SO₂ totale), ottenuti con il metodo dell'aggiunta standard, in campioni di acque industriali (industria alimentare, cartaria), o in acque di superficie (mare, fiume), utilizzando il sensore enzimatico.

campione	valore trovato † come SO ₂ totale (mg/L) *	standard aggiunto come SO ₂ totale (mg/L)	totale trovato † come SO ₂ totale (mg/L) *	recupero%
1 (scarico industriale)	207,5 [1,7]	36,0	280,1 [0,7]	115,3
	"	72,0	330,9 [1,3]	118,6
	"	144,0	396,8 [2,6]	113,0
2 (scarico industriale)	105,0 [2,4]	36,0	156,5 [1,7]	111,0
	"	54,0	175,0 [0,8]	110,1
	"	72,0	204,5 [3,0]	115,5
3 (acqua di mare)	**	57,0	56,2 [1,1]	98,6
	"	77,0	77,5 [0,0]	100,6
	"	96,0	94,9 [2,5]	98,8
4 (acqua di fiume)	**	57,0	55,1 [2,5]	96,7
	"	77,0	75,9 [2,6]	98,6
	"	96,0	96,0 [1,0]	100,0
5 (acqua di mare sintetica)	**	57,0	54,2 [1,3]	95,1
	"	77,0	82,4 [0,9]	107,0
	"	96,0	100,7 [0,4]	104,9

* le concentrazioni riportate sono quelle trovate inizialmente nel campione, o presenti nel campione stesso dopo l'aggiunta. Le concentrazioni finali, determinate nella cella di misura, risultavano circa 10 volte più diluite, in modo da rientrare nell'intervallo di linearità.

** la concentrazione di solfito nella matrice, prima dell'addizione è risultata al di sotto del limite minimo di rivelabilità del metodo.

† in parentesi quadre sono riportati i valori della RSD%

Il biosensore sviluppato in questa ricerca utilizza certamente un metodo di immobilizzazione più moderno, rispetto a quelli riportati in letteratura, che unisce, all'efficacia dell'immobilizzazione, di tipo chimico, la semplicità, rapidità e riproducibilità del metodo stesso. Infatti l'enzima è stato immobilizzato su membrana di nylon funzionalizzato (facilmente reperibile in commercio), dopo semplice "attivazione" dello stesso mediante carbodiimide.

Rispetto ai biosensori riportati in letteratura, il nostro sensore si è rivelato più rapido (tempo di risposta di circa 2 minuti, contro i 3-5 minuti occorrenti in genere agli altri biosensori ricordati). Se si confronta l'intervallo di linearità, con quello dei biosensori più simili al nostro, riportati in letteratura, quelli cioè che utilizzano un elettrodo per l'O₂ (Smith, 1987; Karube e Tamiya, 1987), si osserva che nel nostro caso si raggiunge un limite inferiore dell'intervallo di linearità certamente più basso. Infine se, come elettrodo indicatore si utilizzasse un elettrodo per l'H₂O₂, anziché per l'O₂, dovrebbe essere possibile, come riportato in letteratura, arrivare a limiti di rivelabilità ancora più bassi, ma con un apprezzabile aumento della possibilità di interferenze, soprattutto da parte dello ione ammonio o di riducenti quali l'acido ascorbico (Fonong, 1986).

L'analisi di campioni, sia di acque di scarico industriali, che di acque superficiali, effettuata con il biosensore da noi proposto, è risultata soddisfacente, sia dal punto di vista della precisione, che dell'accuratezza. Le prove di recupero hanno confermato inoltre che, l'accuratezza delle misure, è senz'altro buona o accettabile. Si può inoltre osservare che con il biosensore da noi proposto si registra anche una buona ripetibilità delle misure, sia su standard che su campioni reali (vedi Tab. 1 e 3).

Possiamo concludere dicendo che, il biosensore proposto, risulta valido anche sotto il profilo analitico, ancorché sotto quello della semplicità e rapidità di esecuzione. Inoltre, il costo delle analisi è senz'altro molto competitivo, tenendo conto dei prezzi contenuti, sia dell'apparecchiatura, che dei reattivi necessari. Ad esempio, il metodo enzimatico-spettofotometrico (Beutler, 1984) il cui kit è reperibile anche in commercio, richiede un'apparecchiatura certamente più costosa, rispetto a quella elettrochimica necessaria al biosensore amperometrico descritto, esso comporta inoltre un notevole consumo di enzima e del cofattore (NADH), entrambi molto costosi. Infine si può affermare che, rispetto al metodo enzimatico-spettofotometrico, risultano eliminate, operando con il biosensore, tutte le possibili interferenze cromatiche, dovute a colorazione, o torbidità del campione analizzato. Questo vantaggio è particolarmente significativo nel caso di molti dei comuni campioni industriali.

Rispetto ai metodi ufficiali ed ai più comuni metodi riportati in letteratura, per l'analisi del solfito, quello qui descritto offre caratteristiche di rapidità ed automatizzabilità certo di non trascurabile interesse.

Ringraziamenti

Lavoro effettuato con il contributo finanziario del CNR, progetto finalizzato "Tecnologie Chimiche Innovative"

BIBLIOGRAFIA

Beutler H.O. (1984): "A new enzymatic method for determination of sulfite in food", *Food Chemistry*, **15**, 157-164.

Cabré F., M. Cascante and E.I. Canela (1990): "A sensitive enzymatic method of sulfite determination", *Analytical Letters*, **23**(1), 23-30.

Campanella L., M. Maione and R. Pucci (1990): "Behaviour of different eluents and stabilizing agents in the determination of sulphite in water by ion-chromatography", *Talanta*, **37**, 201-205.

Campanella L., P. Cipriani, T.M. Martini, M.P. Sammartino and M. Tomassetti (1995): "New enzyme sensor for sulfite analysis in sea and river waters", *Analytica Chimica Acta*, **305** 32-41.

Campanella L., T. Beone, M.P. Sammartino and M. Tomassetti (1993): "Determination of phenol in wastes and waters using an enzyme sensor", *Analyst*, **118**, 979-986.

Courtney A., C. Warner, D. Daniels, and K. Padgett (1986): "Reevaluation of Monier-Williams method for determining sulfite in food", *Journal Association of Official Agricultural Chemistry*, **69**(1), 3-5.

Fonong T. (1986): "Amperometric determination of sulfite with sulfite oxidase immobilized at a platinum electrode surface", *Analytica Chimica Acta*, **184**, 287-290.

Grados N., L. Campanella, E. Cardarelli and M. Maione (1986): "Determinazione del solfito nelle acque mediante cromatografia ionica" *Metodi Analitici per le acque*, **6**(4), 37.

Hansen, B.E. Richter, D.K. Rollins, J.D. Lamb and D.J. Eatough (1979): "Determination of arsenic and sulfur species in environmental samples by ion chromatography", *Analytical Chemistry*, **51**, 633-637.

IRSA (1972): "Metodi Analitici per le acque-Solfiti", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **11**, vol. II, 1-6

IRSA (1982): "Metodi Analitici per le acque-Solfiti", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **11**, Scheda D-015, 1-3.

IRSA (1994): "Metodi Analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**, 342 pp.

Johnson M.K. and B.L. Wedzicha (1979): "A variation of the Monier-Williams distillation technique for the determination of sulphur dioxide in ginger ale", *Analyst*, **104**, 694-696.

Karube I. and E. Tamiya (1987): "Biosensors for environmental control", *Pure Applied Chemistry*, **59**(4), 545-554.

Lindgren M., A. Cedergren, and J. Lindberg (1982): "Conditions for sulfite stabilization and determination by ion chromatography", *Analytica Chimica Acta*, **141**, 279-286.

Monnier G. and S. Williams (1927): "Determination of sulphur dioxide in foods", *Analyst*, **52**, 415-416.

Nabirahni M. A. and R.R. Vaid (1991): "Development and application of an immobilized enzyme electrode for the determination of sulfite in foods and feeds" *Analytical Letters*, **24**(4), 551-565.

Smith V.J. (1987): "Determination of sulfite using a sulfite oxidase enzyme electrode", *Analytical Chemistry*, **59**, 2256-2259.

Steven T.S., V.T. Turkelson and W.R. Albe (1977): "Determination of anions in boiler blow-down water with ion chromatography", *Analytical Chemistry*, **49**, 1176-1178

Sullivan D.M. and R.L. Smith (1985): "Determination of sulfite in foods by ion chromatography", *Food Technology*, July, 45-53

Tanner H., "Die bestimmung der gesamten schwefligen säure in getränken, konzentraten und in essigen" *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung and Hygiene*, **54** 158-174 (1963).

METODO PER L'ISOLAMENTO E PER LA IDENTIFICAZIONE DI OOCISTI DI *CRYPTOSPORIDIUM* IN ACQUE REFLUE.

a cura di R. Briancesco e L. Bonadonna, *Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Igiene Ambientale, Roma.*

RIASSUNTO

Non esiste attualmente un metodo analitico in grado di fornire una valutazione quantitativa specifica per la specie *Cryptosporidium parvum*, agente eziologico di forme acute di gastroenterite nell'uomo. Pertanto il metodo quantitativo riportato, che permette di contare

il numero di oocisti del parassita presenti nell'acqua, dà informazioni sulla sua potenziale presenza e comunque su quella di protozoi appartenenti al genere *Cryptosporidium*.

SUMMARY

The occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in water can provide information on the presence of pathogenic protozoa, as *Cryptosporidium parvum*, recognized as an etiological agent of gastrointestinal illness in humans. The procedure allows to enumerate the oocysts of the parasite throughout filtration and concentration steps.

1 - INTRODUZIONE

1.1 - Generalità

Il protozoo coccide *Cryptosporidium parvum* è riconosciuto come agente eziologico di forme acute di gastroenterite nell'uomo dal 1976 e più recentemente è stato segnalato un caso di infezione attribuita a *C. bailey*. La trasmissione dell'infezione ha luogo attraverso l'ingestione di oocisti del parassita. L'OMS riporta che infezioni da *Cryptosporidium* sono state segnalate in 26 Paesi con una prevalenza dello 0,6-20% nei paesi sviluppati e del 4-20% in quelli in via di sviluppo. Questa ampia diffusione e distribuzione del parassita in aree geografiche diverse indica una particolare capacità di adattamento ai più diversi ambienti. I dati più recenti hanno dimostrato che le oocisti possono essere ritrovate in acque superficiali e profonde, in acque potabili, marine e reflue. La presenza del parassita nelle acque assume particolare rilevanza sanitaria se si considera che: l'infezione può trasmettersi attraverso l'acqua rapidamente e diffondersi in modo epidemico, le dimensioni delle oocisti sono ridotte (4 - 6 μ m), caratteristica che permette l'attraversamento dei filtri a sabbia durante i trattamenti di depurazione delle acque, e che la dose media infettante è molto bassa (dell'ordine delle decine di unità).

Attualmente *Cryptosporidium* è considerato ubiquitario dell'ambiente idrico negli Usa e in Gran Bretagna. In Europa, la sua presenza nelle acque è stata segnalata in Spagna, Germania, Svezia, Danimarca e Italia. Le acque di superficie possono essere contaminate sia direttamente tramite l'apporto di feci, sia indirettamente da acque di scarico, da percolati, e da acque di dilavamento di suoli agricoli adibiti a pascolo di animali infetti o trattati con fanghi di depurazione contaminati. Nasce da questa sua ampia diffusione nell'ambiente e in relazione al suo ruolo di patogeno, la necessità di definire un metodo per la sua ricerca anche in acque reflue dove le oocisti si caratterizzano per una elevata capacità di

resistenza sia ai fattori ambientali, sia ai processi di trattamento, compresa la disinfezione.

1.2 - Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* sp., quale indice della presenza di protozoi patogeni. Nel caso particolare si fa riferimento alla ricerca di oocisti in acque reflue.

1.3 - Principio del metodo

Le oocisti di *Cryptosporidium* vengono concentrate a partire da un volume di 10-40 L di acqua grezza mediante filtrazione attraverso una membrana con porosità nominale 1,2 µm. Il filtro viene quindi eluito e il liquido di lavaggio sottoposto a concentrazione mediante centrifugazione e chiarificazione. Si procede quindi all'identificazione mediante immunofluorescenza diretta.

1.4 - Campo di applicazione

Il metodo fornisce indicazioni sulla presenza di organismi del genere *Cryptosporidium* nell'acqua analizzata. Anche se il metodo non è in grado di fornire una valutazione quantitativa specifica per la specie *C. parvum* e di stimare la vitalità e l'infettività del protozoo, l'applicazione di questa metodica fornisce tuttavia informazioni utili sulla presenza di protozoi potenzialmente patogeni, quale *C. parvum*, presenti in un campione di acqua.

1.5 - Possibili interferenze

Campioni di acqua particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio, particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi potrebbero nascondere la presenza delle oocisti e anche, organismi e residui che presentano fenomeni di autofluorescenza potrebbero interferire con la lettura.

1.6 - Controllo di qualità

E' opportuno procedere allo svolgimento di un controllo di qualità mediante prove atte a valutare l'efficienza del metodo eseguito dal laboratorio utilizzando standard specifici contenenti una concentrazione nota di oocisti.

2 - REAGENTI E MATERIALI

2.2 - Reagenti

2.2.1 - Soluzioni al Tween 80

Soluzione a: 0,1% di Tween 80 (poliossietilene sorbitan mono-oleato)(v/v) è sospeso in acqua distillata.

Soluzione b: 1% di Tween 80 (poliossietilene sorbitan mono-oleato)(v/v) è sospeso in acqua distillata.

2.2.2 - Soluzione di SDS/ Tween 80

Preparare una soluzione al 2% di SDS (sodio dodecil solfato) (w/v) e Tween 80 (poliossietilene sorbitan mono-oleato)(v/v) in acqua distillata.

2.2.3 - Soluzione di saccarosio $d_{20} 1,18$

Sciogliere al calore 50 g di saccarosio in 32 mL di acqua distillata e aggiungere 6,5 g di fenolo dopo riscaldamento a 50 °C.

2.2.4 - Soluzione di PBS

Preparare una soluzione sterile di tampone fosfato (PBS, Phosphate Buffer Saline) a pH 7,2 sciogliendo:

- 8 g di sodio cloruro (NaCl)
- 0,34 g di potassio fosfato monobasico (K_2HPO_4)
- 1,21 g di potassio fosfato bibasico anidro (KH_2PO_4)

portare a volume con 1 L di acqua distillata.

2.2.5 - Acetone (C_3H_6O)

2.2.6 - Kit di identificazione

Identificare le oocisti di *Cryptosporidium* mediante:

- anticorpo monoclonale rivolto contro le oocisti di *Cryptosporidium* coniugato con FITC (isotiocianato di fluoresceina);
- mounting medium;
- vetrini per controllo positivo e negativo.

2.3 - Strumentazione e vetreria

Per la conduzione dell'analisi sono necessari:

- apparato di filtrazione a flusso incidente composto da contenitore a pressione, pompa da vuoto e supporto per filtro

- camera umida
- centrifuga provvista di tubi conici da 250 mL, 125 mL e 50 mL
- contaltri
- filtri di nitrato di cellulosa di diametro di 150 mm con porosità nominale 1,2 μm
- incubatore settabile a 37°C
- micrometro oculare tarato per 0,5 μm
- microscopio ad epifluorescenza dotato di filtri di eccitazione ≤ 490 nm e di emissione 520 nm e di obiettivi 40x e 100x
- piastre petri da 150 mm di diametro
- pipettatrice automatica
- pipette da 1, 10, 50 mL
- siringa da 10 mL con cannula di ≈ 10 cm
- stomacher
- vortex

3 - PROCEDURA

3.1 - Campionamento

Prelevare un volume variabile tra 10 e 40 L di acqua reflua grezza, filtrando direttamente al sito di prelievo o trasportando il campione in laboratorio per procedere alla filtrazione.

3.2 - Filtrazione

Il campione deve essere mantenuto a +4°C, areato e processato entro le 24 ore dal campionamento.

La filtrazione del campione viene effettuata attraverso il filtro (porosità nominale 1,2 μm) di 150 mm di diametro posto sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione. La pompa da vuoto deve produrre un flusso di $\approx 1,5\text{-}2$ L min^{-1}

3.3 - Eluizione

Il filtro/i, sottoposto ad agitazione meccanica nello Stomacher, viene eluito in una soluzione (*soluzione a*) di Tween 80 allo 0,1 % e l'eluato raccolto in flask.

3.4 - Concentrazione

L'eluato è centrifugato a 1500xg per 10 min. Il supernatante viene accuratamente rimosso e il pellet sottoposto di nuovo a centrifugazione, usando tubi di volume minore, qualora il volume fosse superiore a 10-20 mL. Il pellet ricavato viene quindi sospeso nella soluzione all'1% di Tween 80 (*soluzione b*) e nuovamente centrifugato a 1500xg per 10 min in tubi da 50 mL. Il supernatante viene rimosso con cura e il campione viene sottoposto ad agitazione con il vortex. Dopo agitazione si porta di nuovo a 50 mL con la soluzione di Tween 80 all'1% (*soluzione b*) e si

centrifuga a 1500xg per 10 min. Si aspira il supernatante fino a lasciarne 10 mL in cui si risospende il pellet stesso tramite agitazione con vortex. Per eventuali analisi di conferma è possibile risospingere il pellet in 20 mL e processare separatamente 10 mL per volta.

3.5 - Flottazione su cuscino di saccarosio

Ai 10 mL di campione si aggiungono 10 mL della soluzione 2.2.2 e si mescola con il vortex per 30 min. Successivamente si centrifuga a 1500xg per 10 min in tubi da 50 mL. Si rimuovono 10 mL di supernatante e nei restanti 10 mL viene risospeso, per agitazione, il pellet. Con l'ausilio della siringa dotata di cannula, 10 mL di soluzione di saccarosio (2.2.3) vengono stratificati al di sotto dei 10 mL di campione. Si centrifuga a 1000xg per 5 min. Si recupera il supernatante e si porta a 50 mL con PBS (2.2.4). Si centrifuga a 1500xg per 10 min. Si elimina il supernatante e si ripete l'operazione precedente. Il supernatante è alla fine eliminato fino a lasciare 1 mL in cui si risospinge il pellet, prendendo nota del volume finale.

4 - IDENTIFICAZIONE E CONTEGGIO

Dopo avere agitato il campione si prelevano 20 μL e si stemperano sul vetrino per l'identificazione. Si lascia ad asciugare a temperatura ambiente. Si procede alla fissazione del campione con una goccia di acetone che si lascia evaporare a temperatura ambiente. Per l'identificazione si procede aggiungendo 10 μL di anticorpo-FITC e incubando il vetrino in camera umida a 37°C per 30 min. Si lava il vetrino con acqua distillata e si lascia asciugare a temperatura ambiente. Si pone una goccia di mounting medium sul vetrino e lo si copre con un vetrino coprioggetti. Si esamina il vetrino con il microscopio a fluorescenza agli ingrandimenti 400x e 1000x.

5 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le oocisti di *Cryptosporidium* appaiono rotonde o ovali, di colore verde mela con diametro 4-5 μm , con fluorescenza limitata al contorno o estesa all'intera superficie. Tuttavia, a differenza dei campioni di origine fecale, le oocisti isolate nell'acqua possono apparire con contorni irregolari, rugose e con fluorescenza poco marcata.

Si registrano le dimensioni e il numero delle oocisti rilevati, procedendo all'esame di almeno il 25% del campione.

5.1 - Calcolo del numero di oocisti

Per determinare il numero di oocisti presenti in un litro di acqua esaminata si esegue il seguente calcolo:

$$\text{N}^\circ \text{ oocisti nel pellet} = \frac{\text{N}^\circ \text{ oocisti contate}}{\text{mL di pellet processati}} \times \text{mL totali di pellet}$$

BIBLIOGRAFIA

APHA (1992): "Standard Methods for examination of water and wastewater", APHA, AWWA, WPCF, 18 Ed. Washington D.C.

Blewett D.A. (1989): "Quantitative techniques in *Cryptosporidium* research". In: Angus K.W., Blewett D.A. eds. *Cryptosporidiosis. Proceedings of the First International Workshop*. Edinburgh, UK.

HMSO (1989): "Isolation and identification of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts and free living pathogenic amoebae in water". Methods for the examination of water and associated materials.

Rose J.B., Gerba C.P., Jakubowski W. (1991): "Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*", *Environ. Sci. Techn.* **25**, 1393-1400.

WHO (1992): "Guidelines for drinking-water quality". Protozoa, 56-58. World Health Organization, Geneva.

METODO PER LA RICERCA E L'ISOLAMENTO DI *AEROMONAS* SP. IN ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO.

a cura di M. Semproni e L. Bonadonna, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Igiene Ambientale, Roma

RIASSUNTO

Aeromonas è isolato molto frequentemente nelle acque potabili sebbene non sia tra i parametri da ricercare per la valutazione della qualità delle acque destinate al consumo umano. Infatti, è facile rilevarlo su uno dei terreni colturali utilizzati per

$$\text{N}^\circ \text{ oocisti/L} = \frac{\text{N}^\circ \text{ oocisti nel pellet}}{\text{volume di acqua esaminato}}$$

dove:

l'enumerazione dei coliformi totali dove produce la maggior parte delle colonie rosse atipiche. Da ciò, la necessità di definire un metodo specifico e idoneo al suo rilevamento, legata anche alla sua potenzialità di patogeno. Il metodo riportato è basato sulla filtrazione su membrana e può essere utilizzato per le acque sorgive, di falda, di fiume, di lago e comunque per acque da destinare al consumo umano dopo adeguati trattamenti.

SUMMARY

Aeromonas has been frequently isolated in drinking water although it is not included among the parameters stated by law. In fact, it can be easily detected on the medium used for the enumeration of total coliforms. The need to define a specific and suitable method for its detection arises also from its role as a potential pathogen. The reported method is based on the membrane filtration technique.

1 - INTRODUZIONE

1.1 - Generalità

I microrganismi compresi nel genere *Aeromonas* costituiscono un gruppo estremamente eterogeneo per caratteristiche biochimiche, strutturali e genetiche. A tutt'oggi il numero di specie comprende 13 gruppi di ibridizzazione. Alcune specie sono considerate responsabili di patologie per l'uomo. Infatti, sebbene il ruolo di *Aeromonas* come patogeno gastrointestinale sia ancora dibattuto, gli studi effettuati sembrano confermare che almeno alcuni ceppi possano essere agenti di malattie a carattere diarroico. Studi effettuati negli Stati Uniti hanno evidenziato che il 70% dei ceppi di *Aeromonas*, rilevati in acque clorate, erano enterotossigeni e pertanto potenziali patogeni enterici.

Sebbene la ricerca di *Aeromonas* spp non sia richiesta da alcuna normativa italiana, il microrganismo è isolato molto frequentemente nelle acque potabili in cui è facile evidenziarlo su uno dei terreni colturali utilizzati per l'enumerazione dei coliformi totali. Nasce da qui, e in relazione alla sua potenzialità di patogeno, l'opportunità di definire un metodo specifico e idoneo per il suo rilevamento in queste acque dove la sua presenza viene rilevata anche in assenza di *Escherichia coli*. Un aumento delle sue densità nelle acque potabili generalmente è stato messo in relazione ad una diminuzione della concentrazione di cloro libero in rete, sebbene sia stato evidenziato che più alte densità possono essere rilevate anche in acque clorate, soprattutto nel periodo estivo.

Così come non esistono normative che prevedano il rilevamento dei microrganismi appartenenti a questo genere, non esistono neanche valori limite di concentrazione nelle acque. Valori massimi "indicativi", da considerarsi come valori di riferimento, sono stati tuttavia proposti dalle autorità sanitarie olandesi: 20 UFC/100 mL nelle acque all'impianto di produzione e 200 UFC/100 mL nelle acque durante la distribuzione.

1.2 - Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la densità di microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas*. Nel caso particolare si fa riferimento alla loro ricerca in acque destinate al consumo umano.

1.3 - Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio diretto dei microrganismi presenti in un volume noto di acqua.

1.4 - Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per le acque sorgive, di falda, di fiume, di lago e comunque per acque da destinare al consumo umano dopo adeguati trattamenti.

1.5 - Controllo di qualità

E' opportuno procedere allo svolgimento di un controllo di qualità mediante prove atte a valutare l'efficienza del metodo eseguito dal laboratorio utilizzando standard specifici contenenti una densità nota di microrganismi.

2 - REAGENTI E TERRENI DI COLTURA

2.1 - Substrato di isolamento

2.1.1 - Terreno di coltura selettivo: Ampicillina Destrina Agar (ADA)

Composizione:

Triptoso	5,00	g
Estratto di lievito	2,00	g
Destrina	11,40	g
Cloruro di sodio	3,00	g
Cloruro di potassio	2,00	g
Solfato di magnesio	0,10	g
Cloruro ferrico	0,06	g
Sodio desossicolato	0,10	g
Blu di bromotimolo	0,08	g
Agar	13,00	g
Acqua distillata	1000,00	mL
pH	8±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min. Lasciare raffreddare fino a 50°C ed aggiungere sterilmente Ampicillina in concentrazione di 1 mL/100 mL di terreno. Mescolare e distribuire in piastre petri. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per circa 1 settimana a +4°C.

2.1.2 - Supplemento selettivo: ampicillina

L'antibiotico è anche disponibile in commercio in forma disidratata in fiale. Sciogliere 5 mg di ampicillina in 5 mL di acqua distillata sterile e aggiungere al terreno colturale di isolamento (2.1.1) già sterilizzato in ragione di 1 mL/100 mL di terreno.

2.2 -Substrato di crescita

2.2.1 - Triptone Soia Agar (TSA)

Composizione:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH	7,2 ± 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando

frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121°C per 15 min. Distribuire in capsule petri e lasciare solidificare. Conservare a + 4°C per circa 2 settimane.

2.3 - Reattivi per la colorazione di Gram, secondo Hucker

Tutte le soluzioni già pronte sono anche disponibili in commercio.

2.3.1 - Soluzione A: Soluzione di cristal violetto.

Sciogliere 2 g di cristal violetto in 20 mL di etanolo al 95%.

2.3.2 - Soluzione B: Soluzione di ammonio ossalato

Sciogliere 0,8 g di ammonio ossalato in 80 mL di acqua distillata.

Mescolare la soluzione A alla soluzione B. Lasciare a riposo per 24 ore e poi filtrare attraverso carta da filtro. Conservare al riparo dalla luce in bottiglie scure.

2.3.3 - Soluzione C: Soluzione di Lugol

Sciogliere 2 g di KI e 1 g di I₂ in acqua distillata e portare a volume in 300 mL. Conservare al riparo dalla luce in bottiglie scure.

2.3.4 - Soluzione D: Soluzione di safranina

Sciogliere 0,25 g di safranina in un mortaio con 10 mL di etanolo al 95%. Portare a volume in 100 mL di acqua distillata. Conservare al riparo dalla luce in bottiglie scure.

2.4 - Reattivo alla tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Sciogliere 1 g di N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in 100 mL di acqua distillata. Preparare la soluzione al momento dell'uso sciogliendo il reattivo in acqua distillata sterile. In alternativa utilizzare i dischetti o i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio.

2.5 - Substrato per la prova della resistenza al vibriostatico

2.5.1 - Brodo al Triptone di Soia (TSB)

Composizione:

Digerito pancreatico di caseina	17,0	g
Digerito papainico di farina di soia	3,0	g
Sodio cloruro	5,0	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,5	g
Destrosio	2,5	g
Acqua distillata	1000,0	mL

pH 7,3±0,2

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratate il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121°C per 15 min. Prima della sterilizzazione distribuire in tubi (10mL/tubo).

2.5.2 - Agente vibriostatico O/129

Dischetti imbibiti del vibriostatico sono disponibili in commercio.

2.6 - Substrato per la fermentazione del glucosio

2.6.1 - Brodo rosso fenolo (base)

Composizione:

Peptone da caseina	5,000	g
Peptone di carne	5,000	g
Sodio cloruro	5,000	g
Rosso fenolo	0,018	g
Acqua distillata	1000,000	mL

pH 7,4±0,2

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratate il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere si sterilizza a 121°C per 15 min. Prima della sterilizzazione distribuire in tubi (10mL/tubo) con la campanella di Durham. Raffreddare sotto i 60°C e aggiungere sterilmente glucosio a una concentrazione finale dell'1%.

2.6.2 - Soluzione di glucosio

Preparare una soluzione, sterilizzata per filtrazione, di glucosio al 10%. Si può conservare a -20°C per un

mese.

2.7 - Substrato per la crescita in NaCl

2.7.1 - Brodo Nutritivo

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Digerito pancreatico di gelatina	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±0,1		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi (10mL/tubo) con NaCl in concentrazione finale pari a 1%, 3%, 6%. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121°C per 15 min.

2.8 - Strumentazione e vetreria

Per la conduzione dell'analisi sono necessari:

- apparato di filtrazione, pompa da vuoto e supporto per filtro
- bottiglie sterili per il prelievo
- cilindro tarato sterile
- membrane di acetato di cellulosa di diametro di 47 mm con porosità nominale 0,45 µm
- microscopio ottico con obiettivo 100x
- piastre petri da 90 mm di diametro
- pipette da 1 mL
- termostato regolabile

3 - PROCEDURA

3.1 - Campionamento

Il prelievo di campioni di acqua per l'esame microbiologico deve essere sempre effettuato con recipienti sterili e seguendo scrupolosamente le norme di asepsi.

Prelevare un volume di acqua di almeno 200 mL. Trasportare il campione in laboratorio in condizioni refrigerate nel più breve tempo possibile e conservare a +4°C fino al momento dell'analisi che dovrà essere svolta entro un massimo di 24 ore.

3.2 - Filtrazione e incubazione

Filtrare 100 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di

filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Trasferire sterilmente la membrana in piastre contenenti il terreno colturale di isolamento (2.1.1) addizionato con ampicillina (2.1.2), evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana stessa e la superficie del terreno agarizzato.

Incubare alla temperatura di 28±1°C in termostato per 24 ore.

4 - IDENTIFICAZIONE DELLE COLONIE

Sul terreno colturale di isolamento (2.1.1) i microrganismi riferibili al genere *Aeromonas* sviluppano colonie di colore giallo, caratteristica dovuta alla fermentazione della destrina, ben distinguibili da colonie di altri microrganismi che possono crescere sullo stesso terreno. In alcuni casi sono infatti state individuate colonie bianche (*Alcaligenes* sp.), rosse (*Serratia* sp.) e verdi (*Pseudomonas* sp.).

Contare tutte le colonie gialle riportando il numero come UFC/100 mL (Unità Formanti Colonia).

Nei casi dubbi, è possibile procedere alle seguenti prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Aeromonas*:

- Colorazione di gram
- Prova della citocromossidasi
- Prova della resistenza al vibriostatico
- Fermentazione del glucosio
- Prova della crescita con NaCl.

5 - PROVE DI CONFERMA

Prima di effettuare ciascuna prova è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie dubbie sul terreno di crescita non selettivo Triptone Soia Agar (2.2.1) ed eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

5.1 - Isolamento

Isolare le colonie dubbie da sottoporre a conferma sul terreno non selettivo Triptone Soia Agar (2.2.1) e incubare a 28±1°C in termostato per 24 ore.

5.2 - Colorazione di gram

Sulle colonie dubbie cresciute sul terreno non selettivo Triptone Soia Agar (2.2.1) eseguire la colorazione di gram utilizzando i reattivi indicati (2.3). Le cellule di *Aeromonas* si presentano come bastoncini gram negativi.

5.3 - Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. *Aeromonas* è ossidasi-positivo.

Dal terreno Triptone Soia Agar (2.2.1) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa di platino o di plastica la colonia cresciuta sul terreno e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.4) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione positiva si evidenzia quando una colorazione blu-viola si sviluppa entro 10 secondi.

5.4 - Resistenza all'agente vibriostatico O/129

Dal terreno Triptone Soia Agar (2.2.1) prelevare le colonie dubbie e inocularle in tubi contenenti Brodo al Triptone di Soia (2.5.1). Incubare a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

Dopo crescita in brodo, imbibire della brodocoltura un tampone sterile e strisciare abbondantemente sul terreno Triptone Soia Agar (2.2.1) in piastra. Sulla superficie dell'agar applicare un dischetto da 10 μg e uno da 150 μg di vibriostatico O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina fosfato) (2.5.2). Incubare a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

Dopo incubazione verificare l'eventuale presenza o assenza di aloni di inibizione intorno ai dischetti. *Aeromonas* spp è resistente al vibriostatico.

5.5 - Fermentazione del glucosio

Inoculare le colonie dubbie, cresciute sul terreno Triptone Soia Agar (2.2.1), in tubi contenenti Brodo Rosso Fenolo (2.6.1) addizionato con glucosio (2.6.2). Incubare a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore. La fermentazione del glucosio si evidenzia con con il viraggio del terreno dal rosso al giallo. *Aeromonas* fermenta il glucosio con formazione di acido e viraggio del terreno; in alcuni casi può essere messa in evidenza anche la produzione di gas.

5.6 - Prova della crescita con NaCl

Le colonie che presentano le caratteristiche morfologiche tipiche di *Aeromonas* sono sottoposte alla prova della crescita in Brodo Nutritivo (2.7.1) contenente diverse concentrazioni di NaCl (0%, 1%, 3%, 6%).

Dal terreno Triptone Soia Agar (2.2.1) isolare le colonie dubbie e sospenderle, evitando di intorbidire il brodo, in tubi di Brodo Nutritivo (10 mL/tubo) contenente concentrazioni diverse di NaCl. Incubare i tubi a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Dopo incubazione verificare la presenza di torbidità del brodo. *Aeromonas* non

cresce in brodo al 6% di NaCl.

BIBLIOGRAFIA

Altwegg M., and H.K. Geiss (1989): "*Aeromonas* as a human pathogen", *Crit. Rev. Microbiol.*, **16**, 253-286.

Bonadonna L. e I. Di Girolamo (1994): "*Aeromonas* in acque potabili: un rischio reale o potenziale?", *Ann. Ig. San. Pubbl.*, **50**, 81-90.

Havelaar A.H., M. During and J.F. M. Versteegh (1987): "Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration", *J. Appl. Bacteriol.*, **62**, 279-287.

Havelaar A.H. and M. Vonk (1988): "The preparation of Ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water", *Lett. Appl. Microbiol.* **7**, 169-171.

OSSERVAZIONI E QUESITI

Nel numero di marzo della rivista *Acqua-Aria* il dottor Nicola Oddo della Ecotox LDS, produttrice di strumenti scientifici, ha espresso delle osservazioni circa taluni aspetti tecnici del Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti pubblicato nel numero di giugno, 1996 di questo Notiziario. Nell'auspicare che in futuro le note contenenti osservazioni, commenti e proposte integrative ai metodi vengano indirizzate direttamente al Notiziario attraverso cui verrà garantita la diffusione allo stesso bacino di utenza al quale sono indirizzate le proposte di metodo, si dà la possibilità al Gruppo di Lavoro che ha predisposto la proposta di metodo, di replicare alle osservazioni ricevute.

Le osservazioni del dr. Nicola Oddo sul metodo Saggio di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* sono relative a sei punti.

→ In riferimento alla prima obiezione circa la conduzione del saggio con campioni a bassa tossicità (punto 3.3.2 del metodo) non si è voluto uniformarsi al basso proponendo una metodologia facilmente applicabile e non molto aggiornata, ma anzi si è proposto una metodica che prevede un'elevata precisione tecnica nell'aggiunta dei batteri e degli altri reattivi, precisione tale da permettere un'uniforme distribuzione dei batteri stessi che non pregiudichi dal punto di vista statistico la significatività del saggio. Con la procedura proposta si riesce infatti a saggiare i campioni sino a concentrazioni pari al 95% rispetto al campione iniziale, quindi sostanzialmente molto vicine al campione non diluito. Altre procedure attualmente in uso, basate sull'utilizzo di strumentazione specifica per il test, prevedono invece di poter saggiare una

concentrazione massima del campione pari soltanto all'80% circa della concentrazione iniziale.

Riteniamo non si tratti quindi di un uniformarsi al basso, in quanto per eseguire il saggio da noi proposto occorre una elevata precisione tecnica nell'aggiunta dei batteri e degli altri reattivi, tale da non pregiudicare dal punto di vista statistico la significatività del saggio.

Per quanto riguarda l'osservazione relativa al fatto che nella procedura da noi proposta non si misuri la luminescenza iniziale dei batteri, va rilevato come solo in tal modo sia possibile determinare i bassi livelli di tossicità previsti dal metodo. Peraltro la luminescenza iniziale non viene determinata neanche in altri test, tra cui quello proposto dall'Ecotox per il saggio cronico, per il quale si ritiene invece che tale determinazione sia decisamente più importante ai fini della significatività del test.

Si ritiene invece utile il suggerimento di introdurre un saggio di comparazione con un numero maggiore di repliche e un intervallo di concentrazioni del campione più stretto. La proposta di introdurre tale saggio verrà sottoposta all'approvazione del GdL.

- Per quanto concerne il secondo punto (paragrafo 4.1.1 del metodo) riguardante la diluizione di non effetto G_L , pur concordando con le perplessità indicate dal dr. Oddo, va rilevato come tale determinazione sia prevista dal Documento ISO/DIS 11348-1 di prossima pubblicazione che indica, come alternativa al calcolo della EC50, quello del valore di G_L . Si è ritenuto pertanto opportuno indicare anche tale procedura di calcolo, che ben presto sarà ufficializzata a livello internazionale.
- Relativamente al terzo punto (paragrafo 4.2 del metodo) si concorda con la necessità di meglio precisare che il coefficiente di variazione tra le repliche che non deve superare il 10% non soltanto per le sostanze di riferimento ma per qualsiasi tipo di saggio.

- Nel quarto punto (paragrafo 4.1.1) il significato della frase riportata nel testo originale "si considera diluizione di non effetto la più elevata tra quelle saggiate che determina una inibizione luminosa inferiore al 20%" è stata interpretata come "la diminuzione della luminescenza è significativa solo se superiore al 20%". E' quest'ultimo un concetto diverso che prevede la conduzione di un calcolo statistico sul risultato del saggio che indichi una significativa tossicità del campione secondo quanto indicato nel paragrafo 4.1.2 del metodo.
- Relativamente al quinto punto (paragrafo 4.3) è previsto che i risultati siano espressi in EC50 da cui facilmente possono essere ricavate, attraverso una divisione (100/EC50) le Unità Tossiche. Nella stesura definitiva del testo tale calcolo potrà essere indicato accanto a quello che fornisce l'EC50; peraltro anche il già citato Documento ISO/DIS 11348-1 non prevede l'espressione del risultato finale attraverso la stima delle Unità Tossiche.
- Infine per quanto riguarda il sesto punto (appendice C del metodo) è vero che non è previsto che i laboratori che producano in proprio i batteri siano obbligati a certificarli con fogli di lavorazione preparati ad hoc; ciò in quanto è già previsto dal metodo che qualsiasi risultato analitico sia accompagnato dai risultati dei saggi condotti con le sostanze di riferimento e da altre indicazioni così come previsto dai criteri di validazione del saggio (punto 4.2 del metodo). E' quindi evidente che chi vorrà produrre tali batteri da utilizzare secondo le metodiche IRSA per le acque di scarico e per quelle superficiali, siano questi laboratori pubblici o privati, dovrà fornire un prodotto che rispetti i criteri di validazione riportati nel metodo.

GdL Batteri Bioluminescenti

istituto di ricerca sulle acque - cnr

NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a Quaderni 100 (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)
Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche
Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque, Via Reno, 1 - 00198 Roma
Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861
Direttore responsabile: R. Passino
Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta
Segreteria di redazione: C. M. Blundo
Grafica ed elaborazione su computer: P. Fusco
Allestimento e stampa: C. Pastore