

EDITORIALE

*In anni recenti il notevole sviluppo dei metodi di indagine ha determinato una svolta decisiva nello studio della microbiologia acquatica e ha condotto alla rivalutazione del ruolo del batterioplancton nel ciclo del carbonio.*

*La sostanza organica, presente in forma disciolta negli ambienti acquatici, costituisce la maggiore riserva di carbonio organico del pianeta e il batterioplancton ne rappresenta pressoché l'unico utilizzatore. Di conseguenza l'attività dei batteri nell'ecosistema acquatico costituisce un importante anello di congiunzione tra la fase disciolta e particolata della materia organica e un passaggio critico nel trasferimento di energia ai livelli trofici superiori, in grado di influenzare la produzione di tutto il sistema. Nel seguito vengono descritti due metodi relativi alla determinazione dell'abbondanza cellulare e alla misura della produzione batterica. Attraverso la determinazione dell'abbondanza batterica è possibile, applicando coefficienti di conversione, risalire alla biomassa del batterioplancton. La determinazione della produzione batterica consente invece di stimare la quantità di sostanza organica, espressa in termini di C, metabolizzata dai batteri per la produzione di nuove cellule. L'acquisizione di tali informazioni consente di valutare il flusso di C nel comparto microbico per effetto dell'attività batterica. Poiché si stima che i batteri siano in grado di utilizzare fino al 50% della sostanza organica prodotta dall'attività fotosintetica, i processi suddetti rivestono un ruolo determinante nei cicli biogeochimici che non può essere trascurato.*

*In questo numero viene inoltre presentato un aggiornamento dei metodi analitici per la determinazione di enterococchi/streptococchi fecali alla luce dell'inserimento, secondo quanto stabilito dal D.Lgs. 152/99, degli enterococchi tra i parametri da ricercare per la definizione della qualità delle acque marino-costiere e un metodo tentativo per la determinazione del cloro residuo totale nelle acque.*

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, febbraio 2002

CONTA DIRETTA DELL'ABBONDANZA MICROBICA (DAPI)

a cura di A. Zoppini, B. Di Rado e A. Barra Caracciolo, IRSA - CNR, Roma

Riassunto

Il metodo qui proposto permette la misura diretta delle abbondanze cellulari dei batteri acquatici. La conta diretta delle cellule, colorate con un fluorocromo specifico degli acidi nucleici, il 4'-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), è diventata uno strumento essenziale per quantificare le popolazioni di batterioplancton. I batteri acquatici oltre a costituire una importante frazione di carbonio, che spesso supera quello dovuto alla biomassa di altri gruppi di microrganismi, sono in grado di rendere la sostanza organica disciolta disponibile agli altri organismi della catena trofica. Attualmente i batteri sono riconosciuti come importanti costituenti degli ambienti acquatici e inseriti in indagini o modelli sul flusso del carbonio e dei nutrienti.

Summary

The method described here is designed to be used for the enumeration of aquatic bacteria. Direct microscopic counts of bacterial cells, stained with nucleic acid fluorochromes such as 4'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), are essential for studying and enumerating populations of bacterioplankton. Aquatic bacteria represent an important carbon pool often achieving more biomass than other group of organisms and make dissolved organic matter available to the rest of the food web.

INDICE

CONTA DIRETTA DELL'ABBONDANZA MICROBICA (DAPI)	1
METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE BATTERICA PLANCTONICA MEDIANTE CENTRIFUGAZIONE	6
ENTEROCOCCHI/STREPTOCOCCHI FECALI NELLE ACQUE: SIGNIFICATO SANITARIO E METODOLOGIE DI ANALISI	11
PROPOSTA DI METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL CLORO RESIDUO TOTALE NELLE ACQUE POTABILI	19

Bacteria are now recognised as a large part of the aquatic ecosystem and are an important component of investigations or models of aquatic carbon and nutrients flow.

## Introduzione

Alla fine degli anni '70 i metodi disponibili per lo studio dell'ecologia microbica fornivano informazioni parziali sulla biomassa e l'attività microbica degli ecosistemi acquatici. Nonostante fosse stata già riconosciuta l'importanza della componente microbica nel ciclo dei nutrienti e del carbonio, non si era in grado di quantificare con precisione le abbondanze cellulari. I metodi disponibili erano affetti da errori tali da produrre stime di abbondanze cellulari pari solo al 10% di quelle effettuate con i metodi odierni. I metodi di stima erano indiretti (conta su piastra e MPN) e soffrivano di quei fenomeni legati alla vitalità cellulare, tra cui la selettività del mezzo di coltura, le diverse velocità di crescita degli organismi e l'aggregazione. L'utilizzo di fluorocromi ad elevata specificità, unitamente alla tecnica di microscopia ad epifluorescenza e alla disponibilità di membrane filtranti a superficie piana e porosità di elevata precisione, ha permesso un notevole avanzamento delle conoscenze. Contemporaneamente lo sviluppo di metodi affidabili e sensibili per lo studio dell'attività batterica, e degli aspetti riguardanti la caratterizzazione delle specie e del diverso metabolismo, ha stimolato negli ultimi 15 anni la ricerca nel campo della trofodinamica del batterioplancton nell'ambiente acquatico.

La componente eterotrofa è ritenuta essere la maggiore utilizzatrice del carbonio organico disciolto (DOC) che in ambiente acquatico costituisce la maggiore riserva di carbonio organico del pianeta. La biomassa legata al batterioplancton spesso supera quella dovuta al fitoplancton persino nelle zone eufotiche di ecosistemi oligotrofici (Fuhrman *et al.*, 1989; Herndl, 1991), così come di frequente costituisce più del 50% del carbonio organico particolato presente nel sistema (Cho and Azam, 1990).

Nei sistemi aperti il DOC origina dall'attività planctonica e i batteri, attraverso la trasformazione del DOC in biomassa, mediano il processo di trasferimento di energia dalla fase disciolta a quella particolata rendendola così disponibile ai predatori e ai livelli trofici superiori della catena trofica. Diversi fattori ambientali possono limitare l'utilizzo di DOC da parte dei batteri rendendo questo passaggio critico per la produzione di tutto il sistema fino ad influenzare negativamente la produzione ittica.

In aree di mare aperto, in cui gli apporti esterni di sostanza organica sono assenti, l'abbondanza batterica è strettamente correlata alla produttività primaria di cui, è stato stimato, i batteri utilizzano tra il 10 ed il 50 % del carbonio totale fissato (Fuhrman and Azam, 1982). Un altro importante aspetto riguarda il ruolo svolto dai batteri nel ciclo dei nutrienti

inorganici. Per utilizzare il DOC disponibile i batteri hanno necessità di assimilare nutrienti inorganici ed in particolare il fosforo il cui fabbisogno è circa due volte superiore a quello conosciuto per il fitoplancton. Questo aspetto rende i batteri particolarmente importanti in ambienti oligotrofici perché parte attiva nei processi di remineralizzazione.

In generale il batterioplancton risponde alla trofia del sistema quanto il fitoplancton. Elaborazioni su larga scala di risultati ottenuti da diversi ambienti acquatici hanno dimostrato che le abbondanze batteriche sono positivamente correlate alla biomassa fitoplanctonica, espessa come clorofilla, senza presentare differenze sostanziali tra sistemi marini o di acqua dolce (Cole *et al.*, 1988). Ducklow and Shiah (1993) hanno ad esempio osservato che su 1100 campioni provenienti da aree di mare aperto soltanto il 5% delle abbondanze batteriche superava la soglia delle  $2 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup>, mentre su 2000 campioni provenienti da sistemi a più elevata trofia, come gli estuari, il 91% dei campioni superava quella soglia.

In Tab.1 sono riportati intervalli di valori tipici di abbondanze cellulari batteriche per diversi ambienti acquatici.

Tab. 1 - Intervalli di abbondanze batteriche riportati in letteratura per diversi ambienti acquatici

	Abbondanza batterica 10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup>	Riferimento bibliografico
<b>MARE</b>		
Oceano	0,2 - 2,0	Ducklow and Shiah, 1993
Mediterraneo orientale	0,16 - 0,4	Zohary and Robarts, 1998
<b>AREE COSTIERE</b>		
Adriatico centrale	0,3 - 3,0	Krstulovic and Sobot, 1982
Adriatico settentrionale Mar Baltico	0,3 - 1,7 2,8 - 4,36	Heinänen, 1991
<b>ACQUE DOLCI</b>		
Laghi Canadesi	2,2 - 10,1	Currie, 1990
Rio delle Amazzoni	0,9 - 1,4	Benner <i>et al.</i> , 1995

La tecnica di epifluorescenza per la stima delle abbondanze batteriche è attualmente la più diffusa nel campo della microbiologia acquatica in quanto permette stime affidabili e veloci.

I fluorocromi più utilizzati sono l'arancio di acridina (AO; Hobbie *et al.*, 1977) e il 4'6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI; Porter and Feig, 1980) che si legano specificamente agli acidi nucleici. Entrambi questi coloranti sono ad oggi utilizzati in indagini di microbiologia acquatica con rese simili, nonostante il DAPI sia preferito all'AO in quanto riduce la fluorescenza di fondo e l'interferenza dei fotopigmenti.

Dall'abbondanza cellulare così ottenuta è possibile stimare la biomassa, espressa in termini di carbonio, utilizzando fattori di conversione tra cui il più utilizzato attribuisce 20 fg C per cellula (Lee and Fuhrman, 1987). Questa elaborazione, pur fornendo in prima approssimazione una stima di biomassa, non tiene

conto del volume delle singole cellule che può variare significativamente in diverse condizioni ambientali. Quindi stime più accurate sono ottenibili dalla misura del biovolume cellulare determinato attraverso il metodo fotografico associato all'uso di un modello di conversione (Norland *et al.*, 1993; Sherr *et al.*, 2001).

## 1 - Principio del metodo

Le cellule colorate con un fluorocromo specifico e raccolte su un filtro a porosità 0,2 µm sono successivamente contate attraverso l'osservazione diretta al microscopio ad epifluorescenza. Il fluorocromo, legato al DNA cellulare, produce fluorescenza in seguito all'eccitazione con luce di appropriate lunghezze d'onda. Le cellule di dimensioni inferiori al limite di risoluzione del microscopio ottico (generalmente <1 µm) possono essere così visualizzate. L'operatore potrà quindi agevolmente distinguere, dal fondo scuro del filtro, le cellule colorate in blu e il materiale di origine detritica colorato in giallo.

Il campione colorato e raccolto su filtro comprende tutti gli organismi di dimensioni superiori a 0,2 µm, includendo sia organismi a metabolismo autotrofo che eterotrofo. Quindi, sebbene i procarioti acquatici morfologicamente siano riconducibili a poche e semplici forme (bastoncelli, sfere e filamenti), il loro metabolismo si differenzia in maniera significativa. La stima delle abbondanze cellulari tramite conta diretta su filtro si intende totale, in quanto non permette il riconoscimento delle cellule su base tassonomica o metabolica né fornisce indicazioni sulla vitalità delle cellule.

## 2 - Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutte le acque naturali (superficiali o sotterranee).

L'intervallo di abbondanze batteriche misurabile dipende dal volume di acqua filtrata. Il volume varia a seconda delle caratteristiche trofiche delle acque o della profondità di prelievo (v. par. 4 e 7.2).

## 3 - Interferenze e cause di errore

Diminuzioni significative di cellule nei campioni sono causate da una cattiva conservazione del campione o da fenomeni di aggregazione o adesione delle cellule al materiale in sospensione di diversa origine (neve marina, presenza di materiale particolato di origine fecale o detritica). Questi fenomeni sono causa sia di una irregolare deposizione delle cellule sul filtro che di una stratificazione delle stesse che rendono inadeguato il metodo di conteggio esposto.

Poiché questi casi non sono frequenti, si rimanda alla letteratura specializzata per ottenere informazioni sulla corretta procedura da seguire per ottenere un buon preparato (Velji and Albright, 1993).

Particolari cure devono essere riservate alla manipolazione del campione al fine di evitare contaminazioni.

La specificità del fluorocromo per il DNA, impedisce la discriminazione all'interno del campione tra cellule autotrofe ed eterotrofe. Nonostante questo limite, la conta delle cellule colorate con il DAPI è generalmente riferibile a cellule eterotrofe, in grado cioè di ossidare i substrati organici, poiché il loro contributo numerico generalmente domina nel batterioplancton. E' possibile però identificare le cellule a metabolismo autotrofo, sfruttando la proprietà di autofluorescenza dei pigmenti fotosintetici, e sottrarre la loro abbondanza dal totale (Davis and Sieburth, 1982). Tramite la tecnica innovativa della citometria di flusso è possibile distinguere e contare con molta efficacia nello stesso campione sia le cellule autotrofiche che quelle eterotrofiche (Olson *et al.*, 1993; Sherr *et al.*, 2001). Inoltre in letteratura sono disponibili metodi per misurare l'attività metabolica delle cellule batteriche al fine di distinguere le cellule viventi da quelle morte (Sherr *et al.*, 2001).

## 4 - Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento può essere effettuato con le normali procedure, utilizzando bottiglie a chiusura comandata del tipo Niskin.

Il volume di campione necessario per l'analisi varia tra 0,5 mL, sufficienti per acque ad elevata trofia, a più di 20 mL per acque oligotrofiche o di profondità. Il volume prescelto deve infatti garantire in fase di osservazione al microscopio un'adeguata densità cellulare (da 20 a 50 cellule per campo). In fase di prelievo è necessario prevedere un volume di campione sufficiente per consentire almeno una replica del preparato.

Entro 3 ore dal prelievo il campione deve essere fissato con formalina (concentrazione finale 2%) precedentemente filtrata su filtri a porosità 0,2 µm. Dopo l'aggiunta il campione va agitato energicamente e conservato al buio e in frigorifero. I campioni devono essere filtrati entro 24 ore dal prelievo e montati su vetrini da microscopio. I preparati possono così essere conservati a -20°C, senza subire alterazioni, fino ad un massimo di 70 giorni.

## 5 - Apparecchiature

**5.1 - Normale attrezzatura da laboratorio** - Tutta la vetreria che entra in contatto con il campione deve essere accuratamente lavata e sterile.

**5.2 - Provette sterili da 20 mL e da 2 mL a tenuta**

**5.3 - Appareto di filtrazione** completo di pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro e imbuto da filtrazione (diametro 25 mm), pinze a molla per fissare l'imbuto alla base e pinzetta per filtri.

5.4 – *Siringa completa di supporto per filtri e filtri sterili a porosità 0,2 µm.*

5.5 – *Filtri a membrana:* filtri di supporto (porosità 0,45 µm, diametro 25 mm), filtri neri in policarbonato (porosità 0,2 µm, diametro 25 mm). I filtri in policarbonato si trovano in commercio già colorati e con un basso livello di fluorescenza. In alternativa possono essere utilizzati filtri bianchi da colorare successivamente con Irgalan black (ad 1 litro di acqua distillata filtrata su 0,2 µm aggiungere 2 g di Irgalan black, 20 mL di acido acetico, 5,7 mL di formalina al 37%).

5.6 – *Micropipette e puntali sterili*

5.7 – *Vetrini da microscopio completi di coprioggetti.*

5.8 – *Olio da immersione per microscopia non fluorescente*

5.9 – *Freezer e frigorifero per la conservazione dei campioni e delle soluzioni*

5.10 – *Autoclave*

5.11 – *Guanti monouso*

5.12 – *Microscopio ad epifluorescenza, dotato di lampada a vapori di mercurio (100 W), combinazione di filtri (eccitazione 340-380 nm, lamina dicromatica 400 nm, filtro di sbarramento 425 nm), oculari 10x, di cui uno dotato di reticolo quadrettato, micrometro oggetto, obiettivo ad immersione 100 x.*

## 6 - Reattivi

6.1 - *Formaldeide al 37% filtrata attraverso filtri da 0,2 µm - Per campioni di acqua dolce è necessario utilizzare formaldeide tamponata a pH = 7,5, ottenuta aggiungendo con pipetta Pasteur alcune gocce di NaOH 2 N alla soluzione 6.1.*

6.2 - *Soluzione di 4'6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, 0,5 mg mL<sup>-1</sup>): tutte le operazioni devono essere condotte al riparo dalla luce per evitare il decadimento della fluorescenza del prodotto. Sciogliere 10 mg di sale in 20 mL di acqua distillata. Porre la soluzione in una provetta e agitare fino alla completa solubilizzazione del sale. Utilizzando una siringa e relativo portafiltro sterile filtrare la soluzione su un filtro a porosità 0,2 µm. Distribuire il filtrato in provette sterili da 2 mL con tappo a tenuta. La soluzione conservata a -20°C mantiene inalterate a lungo le proprie caratteristiche. Ogni preparazione va osservata al microscopio prima della conservazione per verificarne l'effettiva sterilità.*

**Nota:** il DAPI è un composto mutageno per l'elevata specificità di legame nei confronti del DNA. Si consiglia pertanto di evitare accuratamente il contatto diretto e l'inalazione.

## 7 - Procedimento

### 7.1 – Colorazione e filtrazione

Predisporre l'apparato di filtrazione ponendo con le apposite pinze il filtro nero da 0,2 µm sovrapposto a quello di supporto da 0,45 µm. Il filtro di supporto può essere utilizzato per numerose preparazioni. Evitare accuratamente il contatto delle dita con i filtri. Fissare l'imbuto da filtrazione alla base con le pinze a molla. Agitare energicamente il campione, introdurre un'aliquota nell'imbuto da filtrazione e aggiungere 2 µL di soluzione DAPI per ogni mL di campione da filtrare. Attendere 4 minuti, mantenendo il campione al buio. Il campione così colorato è stabile per ore. Procedere alla filtrazione esercitando una pressione di vuoto non superiore a 80 mm Hg. Una eccessiva essiccazione del filtro produrrebbe una sottostima dell'abbondanza cellulare. Non lasciare essiccare completamente il filtro per evitare la compromissione delle cellule.

### 7.2 – Preparazione del vetrino

Poggiare il filtro al centro del vetrino portaoggetto su cui è stata precedentemente posta una piccola goccia di olio (5.8). Porre un'altra goccia di olio sulla superficie del filtro e montare il coprioggetti esercitando una leggera pressione fino a che l'olio abbia ricoperto il filtro. L'uso di una quantità eccessiva di olio determina la fuoriuscita delle cellule dal vetrino e la distribuzione del campione su più piani focali. Nel caso in cui il preparato debba essere conservato si consiglia di verificare al microscopio la qualità dell'immagine, controllando in particolare che l'immagine giaccia su un solo piano focale e che le cellule siano uniformemente distribuite sul filtro.

### 7.3 – Osservazione al microscopio

Osservare da 20 a 40 campi distribuiti con criterio di casualità su tutta l'area del filtro e contare un minimo di 600 cellule per filtro. Una appropriata densità cellulare sul filtro è data da un numero di cellule approssimativamente compreso tra 20 e 50 per campo. Se le cellule sono troppo numerose è necessario ridurre il volume da filtrare. E' utile tenere presente che la fluorescenza delle cellule decade con il tempo durante l'osservazione.

## 8 - Calcoli

Il numero di cellule batteriche nel campione può essere così calcolato:

$$\text{cell mL}^{-1} = \frac{n \cdot a_r}{a_f \cdot v}$$

dove:

n = numero totale di cellule/numero dei campi esplorati (ai fini del calcolo un campo senza cellule va considerato come un campo esplorato)

$a_f$  = area del filtro su cui sono state raccolte le cellule ( $\text{mm}^2$ )

$a_r$  = area del reticolo quadrettato, ottenuta dalla misurazione con il micrometro oggetto ( $\text{mm}^2$ )

v = mL del campione filtrato/1,06 (fattore di correzione per la presenza nel campione del fissativo, alle condizioni sopraelencate)

## 9 - Precisione

Seguendo le indicazioni date la precisione della misura è di  $\pm 10\%$  al 95% di intervallo di confidenza. Per una migliore precisione è raccomandabile la lettura di due preparati per ogni campione. Se non è richiesta una precisione elevata è sufficiente contare un totale di 200 cellule per filtro.

## Bibliografia

Benner R., Opsahl S., Chin-Leo G., Richey J.E., Forsberg B.R. (1995): "Bacterial carbon metabolism in the Amazon River system", *Limnol.Oceanogr.* **40**(7), 1262-1270.

Cho B.C. and Azam F. (1990): "Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone", *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **63**, 253-259.

Cole J.J., Findlay S., Pace M.L. (1988): "Bacterial production in fresh and salt-water: a cross system overview", *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **43**, 1-10.

Currie D.J. (1990): "Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton, and phosphorous" *Limnol.Oceanogr.* **35**, 1437-1455.

Davis P.G. and Sieburth J.McN. (1982): "Differentiation of phototrophic and heterotrophic nanoplankton populations in marine waters by epifluorescence microscopy", *Ann.Inst.Oceanogr.*, **58** (S), 249-260.

Ducklow H.W. and Shiah F.K. (1993): "Bacterial production in estuaries" In: *Aquatic Microbiology: an ecological approach*. T.E. Ford ed., Blackwell Scientific Publication, Inc. Cambridge, MA, USA., 261-288.

Fuhrman J.A. and Azam F. (1982): "Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results", *Mar.Biol.*, **66**, 109-120.

Fuhrman J.A., Sleeter T.D., Carlson C.A., Proctor L.M. (1989): "Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications" *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, **57**, 207-217.

Heinänen A.P. (1991): "Bacterial numbers, biomass and productivity in the Baltic Sea: a cruise study", *Mar.Ecol.Prog. Ser.*, **70**, 283-290.

Herndl G.J. (1991): "Microbial biomass dynamics along a trophic gradient at the Atlantic Barrier Reef off Belize (Central America)", *PSZN I: Mar.Ecol.*, **12**, 41-51.

Hobbie J.E., Daley R. and Jasper S. (1977): "Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy", *Appl.Environ.Microbiol.*, **33**, 1225-1228.

Krstulovic N. and Sobot S. (1982): "Proportion of bacteria in total plankton of the central Adriatic", *Acta Adriat.*, **23** (1/2), 47-52.

Lee S. and Fuhrman J.A. (1987): "Relationship between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton", *Appl.Environ.Microbiol.*, **53**(6), 1298-1303.

Norland S., M. Heldal and O. Tumyr (1987): "On the relation between dry matter and volume of bacteria", *Microb.Ecol.*, **13**, 95-101.

Olson R.J., Zettler E.R., and Durand M.D. (1993) "Phytoplankton analysis using flow cytometry", In: *Handbook of methods in aquatic microbial Ecology* P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole, eds., Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 175-186.

Porter G.K. and Feig S.Y. (1980): "The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora", *Limnol.Oceanogr.*, **25** (5), 943-948.

Sherr B., Sherr E. and Del Giorgio P. (2001): "Enumeration of total and highly active bacteria" In: *Methods in Microbiology. Marine Microbiology*, H. Paul ed. Academic Press London, UK, **30**, 129-159.

Velji M.I. and Albright L.J. (1993): "Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria", In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology.*, P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, J.J. Cole eds. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA, 139-142.

Zohary T. and Roberts R.D. (1998): "Experimental study of microbial P limitation in the eastern Mediterranean", *Limnol.Oceanogr.* **43**(3), 387-395.

# METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE BATTERICA PLANCTONICA MEDIANTE CENTRIFUGAZIONE

a cura di A. Puddu, IRSA-CNR, Roma

## Riassunto

La produzione batterica permette di stimare la velocità di crescita del popolamento batterico e la quantità di sostanza organica disciolta utilizzata, consentendo di stimare processi determinanti nella circolazione della biomassa, e in particolare del C, nell'ecosistema. La tecnica illustrata è basata sulla misura della velocità di incorporazione di un precursore radioattivo, in alternativa tra  $^3\text{H}$ -timidina e  $^3\text{H}$ -leucina, che viene incorporato nel DNA, il primo, nelle proteine, il secondo. Sono inoltre discussi ed illustrati i coefficienti di conversione necessari per trasformare la velocità di incorporazione del precursore radioattivo in produzione batterica espressa in termini di C.

## Summary

The determination of bacterial production allows estimating the rates of bacterial growth and utilisation of dissolved organic matter, both processes very important in the biomass and C cycling through the ecosystem. The described technique is based on the measurement of rates of either  $^3\text{H}$ -thymidine or  $^3\text{H}$ -leucine incorporation in the DNA or in the protein fraction, respectively. Moreover, the coefficients applied to convert rates of radioactive incorporation into C production are presented.

## Introduzione

Caratteristica fondamentale di tutti gli organismi in natura è la velocità con cui producono nuova biomassa; questo parametro diventa particolarmente importante nel caso degli organismi microscopici. La stima della produzione microbica può infatti essere utilizzata come indicatore di attività e di velocità di crescita. Siccome molti processi nell'ecosistema sono correlati con l'attività microbica, la produzione di biomassa può essere usata per ottenere una stima di primaria importanza della velocità con cui si verificano molti processi nei quali il comparto microbico è coinvolto. Per esempio, nel caso dei batteri eterotrofi, gli organismi procarioti cui è rivolto il metodo descritto nel seguito, la misura della produzione è utile alla stima della quantità di sostanza organica disciolta metabolizzata. Poiché i batteri sono gli utilizzatori pressoché esclusivi della sostanza organica disciolta, quantificarne il ruolo significa descrivere uno dei processi fondamentali per la circolazione della biomassa, e in particolare del C. La produzione di biomassa equivale all'aumento di biomassa per unità di tempo e di volume (o area) ed è funzione sia della biomassa (B), normalmente

espressa in termini di C per unità di volume (ad esempio  $\mu\text{gC L}^{-1}$ ), che della velocità di crescita specifica ( $\mu$ ) per unità di tempo (ad esempio  $\text{h}^{-1}$ ) (Ducklow, 2000). In assenza di mortalità, da parte di predatori o di virus, la biomassa batterica aumenta in modo esponenziale secondo l'equazione

$$dB/dt = \mu B$$

ove t è il tempo e  $\mu$ , la velocità di crescita specifica, è uguale alla pendenza della regressione lineare di  $\ln(B)$  verso t. Conoscendo  $\mu$  è possibile calcolare altri due importanti parametri che descrivono la crescita del popolamento batterico, rappresentati dal tempo di generazione ( $g = \ln(2)/\mu$ ) e dal numero di duplicazioni per giorno (1/g). Nella maggior parte degli ecosistemi naturali però la produzione e la mortalità dei batteri si equivalgono, per cui  $(dB/dt) = 0$  (Kirchman, 2001).

Per le sue caratteristiche specifiche il metodo che verrà descritto misura comunque la produzione che si realizzerebbe in una situazione di mortalità uguale zero. Infatti è basato su incubazioni di durata molto inferiore (1h) rispetto alla scala temporale con cui si verifica sia la crescita che la morte delle cellule batteriche (uno o più giorni).

Dal punto di vista metodologico la produzione batterica può essere stimata misurando la velocità di incorporazione di vari precursori che vengono utilizzati per la sintesi delle macromolecole. Le due molecole più comunemente utilizzate a tale scopo sono le forme radioattive della timidina ( $^3\text{H}$ -timidina), precursore del DNA, e della leucina ( $^3\text{H}$ -leucina), precursore delle proteine. Le due molecole, nelle condizioni sperimentali descritte, vengono utilizzate unicamente dai procarioti.

Le due tecniche, entrambe ampiamente diffuse, differiscono oltreché per lo specifico meccanismo fisiologico coinvolto, per la presenza di interferenze e per l'affidabilità dei coefficienti di trasformazione necessari per convertire la velocità di incorporazione del precursore marcato in numero di cellule prodotte o in biomassa, espressa in termini di carbonio (Bell, 1993; Kirchman, 1993). In estrema sintesi si può dire che la tecnica che utilizza la timidina è più adatta per stimare la velocità di crescita batterica, intesa come produzione di nuove cellule, mentre l'incorporazione di leucina fornisce una stima diretta della velocità di produzione di nuova biomassa. In realtà, nelle comunità complesse naturali, in condizioni di crescita bilanciata, le due attività sono accoppiate e le cellule non possono aumentare la loro biomassa senza dividersi, considerando intervalli temporali superiori al tempo di generazione (qualche giorno). Perciò, l'utilizzo contemporaneo delle due tecniche in osservazioni di campo non è normalmente di grande utilità a meno che non si ipotizzi una situazione in cui la crescita batterica sia sbilanciata. In tal caso la differenza tra le due misure potrebbe fornire un'informazione supplementare. Ma una diversa risposta tra i due metodi può anche derivare dall'applicazione di coefficienti di conversione non

appropriati o da alterazioni nelle condizioni che influenzano la validità dei coefficienti stessi. Questo argomento è ampiamente trattato in Ducklow (2000). Da un punto di vista operativo la tecnica basata sull'incorporazione della  $^3\text{H}$ -leucina offre comunque maggiori vantaggi, per una serie di motivi: a) l'estrazione viene effettuata a temperatura ambiente; b) il rapporto tra la quantità di leucina e di timidina sintetizzate, a parità di biomassa prodotta, è circa 10 volte maggiore nel caso della leucina, pertanto la tecnica che utilizza questo precursore è più sensibile; c) il coefficiente teorico di trasformazione di leucina in carbonio è più affidabile. Per questi motivi negli ultimi anni la tecnica basata sull'incorporazione di leucina è stata utilizzata con maggior frequenza (Kirchman, 2001).

La concentrazione ed estrazione delle macromolecole marcate può essere effettuata con due procedure diverse, mediante filtrazione o centrifugazione. Entrambe le procedure sono attualmente utilizzate, anche se la seconda, più recente, sta acquisendo una diffusione sempre maggiore. Questa procedura infatti, a fronte della necessità di disporre di una centrifuga, eventualmente refrigerata, ha caratteristiche superiori di praticità, nonché ridotto impatto ambientale e conseguente economicità per la minor quantità di prodotti chimici richiesti e di rifiuti radioattivi prodotti. In aggiunta, la filtrazione produce frequentemente valori molto elevati di bianco, per adesione del radioattivo alla membrana filtrante, difficili da evitare. Pertanto, si è scelto di presentare unicamente quest'ultima procedura, ampiamente sperimentata in diversi ecosistemi, tra cui le acque costiere italiane. Le procedure mediante filtrazione è ampiamente illustrata in Bell (1993) e Kirchman (2001).

Nel seguito verranno illustrate entrambe le tecniche, per incorporazione di timidina o leucina, evidenziandone le differenze solo quando necessario.

## 1 - Principio del metodo

Il metodo deriva dal lavoro di Furhman e Azam (1982), che prevede la filtrazione del campione, con le modifiche successivamente proposte da Smith e Azam (1992) per adattarlo alla procedura di centrifugazione. Con leggere modifiche, e con particolare riferimento all'incorporazione della leucina, è riportato anche in Kirchman (2001).

### *Incorporazione di timidina*

La  $^3\text{H}$ -timidina viene incorporata nel DNA cellulare per azione dell'enzima timidino-kinasi, in quantità proporzionale alla velocità di riproduzione delle cellule batteriche. Nella modalità illustrata, che prevede basse concentrazioni di timidina aggiunta e brevi tempi di incubazione, il metodo è specifico per i procarioti che sono gli unici a disporre dei meccanismi enzimatici che permettono l'incorporazione diretta della timidina nel materiale

genetico. Con coefficienti presi dalla letteratura o determinati sperimentalmente è poi possibile convertire la quantità di  $^3\text{H}$ -timidina incorporata in numero di cellule batteriche prodotte e queste in biomassa espressa come quantità di carbonio.

### *Incorporazione di leucina*

Incubando i batteri in presenza di leucina marcata ( $^3\text{H}$ -leucina) è possibile determinare sperimentalmente la velocità di incorporazione della molecola nel materiale proteico cellulare e stimare quindi la velocità di sintesi proteica. Quest'ultima, in base al rapporto relativamente costante tra proteine e biomassa, pari al 60% del peso secco (Simon and Azam, 1989), potrà essere convertita in produzione di biomassa totale, espressa anche in termini di carbonio.

## 2 - Campo di applicazione

Il metodo descritto è applicabile ad acque marine o estuarine, ma una salinità ridotta può avere influenza sulla precipitazione delle macromolecole. Recentemente però, Kirschner and Velimirov (1999) hanno dimostrato come, nella tecnica basata sull'incorporazione della leucina, l'aggiunta di NaCl durante la precipitazione delle proteine possa ovviare a tale inconveniente. Con tale modifica il metodo è pertanto applicabile anche ad acque dolci. I tempi di incubazione e le concentrazioni aggiunte di precursore radioattivo sono adatti alla maggior parte degli ecosistemi, ma potrebbero essere modificati in situazioni di produttività particolarmente ridotte, allungando i tempi di incubazione e riducendo la concentrazione di substrato radioattivo, facendo però attenzione alle osservazioni riportate in nota.

## 3 - Interferenze

Le interferenze in entrambe le tecniche sono numerose e non ancora del tutto conosciute. Riguardano la diluizione isotopica, la fissazione su molecole diverse, la precipitazione, etc (v. nota). Nel tentativo di risolverle sono numerose le modificazioni apportate ai metodi originali. Le tecniche proposte non hanno la presunzione di aver risolto tale problema, ma si presentano come un soddisfacente compromesso.

## 4 - Campionamento

Il campionamento può essere effettuato con le normali procedure, utilizzando eventualmente bottiglie a chiusura comandata (tipo "Niskin") nel caso di prelievi in profondità.

## 5 - Apparecchiature

➤ termostato, se l'incubazione non è effettuata *in situ*

- scintillatore liquido
- pompa da vuoto con trappola per l'acqua e tubo di raccordo per puntali in plastica
- centrifuga, refrigerata per la tecnica con timidina
- vortex
- pipette e puntali
- ghiaccio, per la tecnica con timidina
- fiale da 2 mL, tipo Eppendorf, con tappo a tenuta
- portaprovette per fiale da 2 mL

## 6 – Reattivi

- Acido tricloro acetico (TCA): preparare una soluzione al 100% W/v (1kg TCA in 452 mL H<sub>2</sub>O) e da questa la soluzione al 5%.
- <sup>3</sup>H-timidina: il prodotto commerciale, con attività specifica compresa tra 70 e 90 Ci mmol<sup>-1</sup>, deve essere diluito in condizioni asettiche con acqua distillata sterile in modo da ottenere una soluzione di lavoro che, con l'aggiunta di 20 µL a 1,7 mL di campione produca una concentrazione finale di <sup>3</sup>H-timidina pari a 20nM che è in genere saturante, cioè sufficiente per rendere massima la velocità di incorporazione (vedi nota). Tale soluzione di lavoro, mantenuta sterile, può essere conservata per qualche tempo in piccole aliquote in frigorifero. Per il calcolo della diluizione vedi nota.
- <sup>3</sup>H-leucina, il prodotto commerciale, con attività specifica compresa tra 40 e 85 Ci mmol<sup>-1</sup>, deve essere diluito in condizioni asettiche con acqua distillata sterile in modo da ottenere una soluzione di lavoro che, con l'aggiunta di 20 µL a 1,7 mL di campione produca una concentrazione finale di <sup>3</sup>H-timidina pari a 20nM (vedi sopra). Tale soluzione di lavoro, mantenuta sterile, può essere conservata per qualche tempo in piccole aliquote in frigorifero. Per il calcolo della diluizione vedi nota.
- Etanolo 80%, diluire v/v a partire dal prodotto assoluto o dal prodotto al 95%.
- Liquido di scintillazione, il prodotto "Ultima-Gold" della Packard Instruments ha dato ottimi risultati.

## 7 - Procedura

### 7.1 - Preparazione ed incubazione dei campioni

Predisporre un numero necessario di fiale da 2 mL, con chiusura a tenuta, ed introdurre 20 µL di <sup>3</sup>H-timidina o <sup>3</sup>H-leucina (concentrazione finale 20nM). Immediatamente dopo il prelievo 1,7 mL di campione vengono introdotti in ogni fiala ed incubati per 60' alla temperatura di origine e al buio. E' opportuno effettuare almeno 3 repliche per ogni campione. Per controllare l'incorporazione che avviene in assenza di attività batterica, una o più repliche ("bianchi") vengono addizionate con 90 µL di TCA 100% (concentrazione finale 5%) prima dell'aggiunta del campione e poi messe ad incubare insieme agli altri campioni.

### 7.2 - Estrazione delle macromolecole

Al termine dell'incubazione le fiale, ad eccezione dei bianchi, vengono addizionate con 90 µL di TCA 100% (concentrazione finale 5%) che precipita le macromolecole senza idrolizzarle, permettendone la separazione per centrifugazione. Dopo 20-30' di estrazione si procede ad una prima centrifugazione a circa 16000 rcf per 10'. Al termine si aspira il supernatante facendo attenzione a non disturbare il precipitato che si è depositato sulla parete esterna della fiala, rispetto alla posizione nella centrifuga. Si aggiungono 2mL di TCA 5%, si agita con vortex e si procede ad una seconda identica centrifugazione. Dopo nuova aspirazione del supernatante si aggiungono 1,7 mL di etanolo 80%, si agita con vortex e si centrifuga nuovamente. Al termine della terza centrifugazione, dopo aspirazione del supernatante, il precipitato viene disciolto in 1 mL di liquido di scintillazione.

Per l'aspirazione del supernatante può essere utilizzata una pompa da vuoto e un tubo in plastica con innestato un puntale per micropipetta che verrà fatto scorrere lungo la parete interna della fiala senza disturbare il precipitato.

La procedura esposta differisce nelle due tecniche unicamente per la temperatura di esecuzione. Utilizzando la leucina tutte le operazioni vengono effettuate a temperatura ambiente. Con timidina le operazioni devono essere effettuate a freddo: l'estrazione in bagno di ghiaccio (0°C), la centrifugazione a +5°C e i reagenti aggiunti devono essere anch'essi freddi (0°C).

Nel caso in cui non sia possibile procedere immediatamente alla centrifugazione, al termine dell'estrazione i campioni possono essere conservati in frigo (+4°C) per 1 o 2 giorni al massimo, mentre è sconsigliato sia il congelamento che l'aggiunta di fissativi. Dopo l'aggiunta del liquido di scintillazione la lettura è invece stabile anche per periodi più lunghi, nei campioni ben chiusi, senza particolari condizioni di conservazione.

### 7.3 - Lettura dei campioni

Dopo 20-24 h i campioni vengono letti mediante scintillatore liquido utilizzando le stesse fiale in cui si è proceduto all'estrazione. I colpi per minuti (CPM) vengono trasformati in disintegrazioni per minuto (DPM) tenendo conto dell'efficienza dello strumento ed eventualmente del fattore di quenching.

## 8 - Calcoli

Velocità di incorporazione del precursore radioattivo:

$$DPM_{inc} = DPM_{campione} - DPM_{bianco}$$



$$\text{pmoli}_{\text{inc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1} = \text{DPM}_{\text{inc}} \cdot \frac{4,5 \cdot 10^{-13}}{\text{SA} \cdot t \cdot V} \cdot 10^9$$

dove:

$4,5 \cdot 10^{-13}$  = numero di curie (Ci) per DPM

SA = attività specifica della soluzione commerciale di radioattivo, specificata per ogni lotto dal produttore in Ci mmole<sup>-1</sup>

t = tempo di incubazione, in ore, pari a 1 con la procedura descritta

V = volume del campione incubato, in litri, pari a 0,0017 con la procedura descritta

*Trasformazione della velocità di incorporazione in produzione batterica di carbonio (BCP):*

La trasformazione richiede l'applicazione di fattori di conversione che possono essere stimati empiricamente, caso per caso, oppure possono essere teorici. La stima empirica richiede esperimenti con il popolamento naturale e deve essere ripetuta per ogni specifico ambiente studiato (Kirchman and Ducklow, 1993); è quindi di difficile applicazione pratica. Nel seguito si suggeriscono pertanto i coefficienti di trasformazione teorici più ampiamente utilizzati che consentono una stima della produzione batterica confrontabile con quella di molti Autori.

per l'incorporazione di <sup>3</sup>H-timidina (TdR):

La conversione si effettua attraverso due passaggi:

- 1) conversione delle moli di timidina incorporata in numero di cellule batteriche prodotte per unità di tempo e di volume:

$$\text{cell L}^{-1} \text{ h}^{-1} = \text{pmoli}_{\text{TdR inc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1} \cdot \text{TCF}$$

- 2) conversione delle cellule prodotte in produzione di carbonio (BCP); è questa la trasformazione più critica in quanto è influenzata dal volume cellulare:

$$\text{BCP} (\mu\text{gC L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{cell L}^{-1} \text{ h}^{-1} \cdot \text{CCF}$$

dove:

TCF = "thymidine conversion factor" il cui valore più diffuso, sia in ambiente marino (Ducklow and Carlson, 1992) che di acqua dolce (Smits and Riemann, 1988), è pari a  $2 \cdot 10^6$  cell pmol<sup>-1</sup>

CCF = "carbon conversion factor", il cui valore più diffuso è quello proposto da Lee and Furhman (1987), pari a  $2 \cdot 10^{-8}$  μgC cell<sup>-1</sup>

utilizzando entrambi i fattori di conversione suggeriti, la trasformazione diretta da timidina incorporata in produzione di carbonio è pari a:

$$\text{BCP} (\mu\text{gC L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = 0,04 \cdot \text{pmoli}_{\text{TdR inc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

per l'incorporazione di <sup>3</sup>H-leucina (Leu):

- 1) conversione delle moli di leucina incorporate in velocità di produzione di proteine (BPP):

$$\text{BPP} = \text{pmol}_{\text{Leu inc}} \cdot \frac{131,2}{\% \text{Leu}} \cdot \text{ID} \cdot 10^{-9}$$

- 2) conversione della produzione di proteine in produzione di carbonio (BCP):

$$\text{BCP} (\mu\text{gC L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{BPP} \cdot (\text{C/PR})$$

dove:

131,2 = peso molecolare della leucina

e, secondo le stime di Simon and Azam (1989) ampiamente utilizzate:

%Leu = 0,073, frazione di leucina nelle proteine

ID = 2, diluizione intracellulare dell'isotopo

C/PR = 0,86, rapporto tra C cellulare e proteine

utilizzando i coefficienti suggeriti, la trasformazione diretta da leucina incorporata in produzione di carbonio è pari a:

$$\text{BCP} (\mu\text{gC L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = 0,0031 \cdot \text{pmol}_{\text{Leu inc}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

## Bibliografia

Bell R.T. (1993): "Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine", in: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, 495-503.

Ducklow H.W. (2000): "Bacterial production and biomass in the oceans", in *Microbial Ecology of the Oceans*, D.L. Kirchman (Ed.), John Wiley and Sons, New York, 85-120

Furhman J.A. and Azam F. (1982): "Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results", *Mar. Biol.*, **66**, 109-120.

Kirchman D.L. (1993): "Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria", in: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, 509-512.

Kirchman D.L. (2001): "Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments", in "Marine Microbiology. Methods in Microbiology", Vol.30, J.H.Paul (Ed.), Academic Press, San Diego, 227-237.

Kirchman D.L. and Ducklow H.W. (1993): "Estimating conversion factors for the thymidine and leucine methods for measuring bacterial production", in: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, 513-517.

Kirschner, A.K.T. and Velimirov, B. (1999): "Modification of the  $^3\text{H}$ -leucine centrifugation method for determining bacterial protein synthesis in freshwater samples", *Aq. Microb. Ecol.* **17**, 201-206.

Lee S. and Fuhrman J.A. (1987): "Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton", *Appl. Environ. Microbiol.*, **53** (6), 1298-1303.

Simon, M. and Azam, F. (1989): "Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria", *Marine Ecology Progress Series*, **51**, 201-213.

Smith D.C. and Azam F. (1992): "A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using  $^3\text{H}$ -leucine", *Mar. Microbial Food Webs*, **6** (2), 107-114.

Smits J.D. and Riemann B. (1988): "Calculation of cell production from [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation with freshwater bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** (9), 2213-2219.

Ducklow H.W. and Carlson C.A. (1992): "Oceanic bacterial productivity", *Adv. Microb. Ecol.*, **12**, 113-181.

## NOTE

### Concentrazione saturante

20nM sono la concentrazione sia di  $^3\text{H}$ -timidina che di  $^3\text{H}$ -leucina raccomandate per la maggior parte degli ambienti. In ambienti oligotrofici, dove l'attività è particolarmente bassa, potrebbe essere sufficiente anche una concentrazione minore. In presenza di abbondante particolato la concentrazione raccomandata potrebbe invece non essere sufficiente. E' pertanto consigliabile effettuare test preliminari con concentrazioni di precursore tra 2 e 50nM per valutare quale sia, nell'ecosistema specifico, la concentrazione al di sopra della quale non si verifica ulteriore incorporazione di radioattivo (concentrazione saturante). Tali test, effettuati ripetutamente dall'Autore in acque costiere e pelagiche dell'Adriatico settentrionale, hanno portato

alla scelta delle 20nM che è la stessa concentrazione suggerita in Kirchman (2001). Con la leucina, per la maggiore sensibilità, si può anche utilizzare una miscela di  $^3\text{H}$ -leucina e leucina non radioattiva, che rende la misura più economica. In tal caso nei calcoli deve essere considerato il rapporto tra leucina radioattiva e leucina totale.

### Tempo di incubazione

Il tempo proposto, 60', è quello più ampiamente utilizzato perchè fornisce una sensibilità adeguata pur evitando la sintesi dei precursori da parte di organismi diversi dai batteri. Si trova all'interno di un intervallo di tempi, generalmente compresi tra le decine di minuti e le 2 ore, in cui la cinetica di assimilazione si mantiene costante. In particolari ecosistemi, molto o poco produttivi, il tempo di incubazione potrebbe essere diverso, per cui, in tali situazioni, è consigliabile determinare sperimentalmente la cinetica di incorporazione in funzione del tempo di incubazione.

### Diluizione del prodotto commerciale

Calcolo della diluizione da effettuare a partire dal prodotto commerciale per ottenere una soluzione di lavoro con concentrazione tale che aggiungendo al campione un volume definito di soluzione si ottenga la concentrazione finale voluta:

- 1) determinazione della concentrazione della molecola radioattiva nel prodotto commerciale ( $K_{iniziale}$ ), a partire dalla concentrazione di radioattivo ( $K_{rad}$ ) e dall'attività specifica (AS) dichiarate dal produttore:

$$K_{iniziale} \text{ (nmoli L}^{-1}\text{)} = \frac{K_{rad} \text{ (Ci L}^{-1}\text{)}}{AS \text{ (Ci nmole}^{-1}\text{)}}$$

- 2) calcolo della diluizione, noti il volume del campione ( $V_c$ ), la concentrazione finale che si vuole ottenere ( $K_{finale}$ ) e il volume di soluzione di lavoro che si vuole aggiungere ( $V_{ag}$ ):

$$\text{Diluizione} = \frac{V_{ag} \text{ (}\mu\text{L)} \cdot K_{iniziale} \text{ (nmoli L}^{-1}\text{)} \cdot 10^4}{K_{finale} \text{ (nmoli L}^{-1}\text{)} \cdot V_c \text{ (mL)}}$$

Esempio:

$K_{rad} = 5$ ,

AS = 69,

$K_{finale} = 20$ ,

$V_c = 1,7$ ,

$V_{ag} = 20$ .

$K_{iniziale} = 72$ ,

Diluizione = 42,63

## Interferenze

Diluizione isotopica. E' la principale causa di interferenza in entrambe le tecniche. I batteri infatti durante l'incubazione potrebbero anche utilizzare molecole non radioattive presenti *in situ*, oppure sintetizzarle *de novo* da altri composti. L'aggiunta di quantità elevate di radioattivo, come quelle raccomandate, volutamente superiori a quelle riscontrabili nei diversi ambienti, è voluta per ridurre tali interferenze. Concentrazioni più elevate sono sconsigliate perché potrebbero provocare una diffusione del radioattivo oltretutto un utilizzo da parte di organismi diversi dai batteri. Per la leucina si è raccomandato in aggiunta l'utilizzo di un fattore di correzione (ID = 2) che deriva dalla misurazione diretta della diluizione intracellulare isotopica effettuata da Simon e Azam (1989) in presenza di 10nM di <sup>3</sup>H-leucina.

Altre cause di interferenza sono dovute, per la timidina, alla possibilità che il precursore radioattivo si fissi anche su molecole diverse dal DNA, ma l'estrazione a freddo indicata garantisce la precipitazione dell'intera frazione macromolecolare, DNA, RNA e proteine (Bell, 1993). Altra interferenza potenziale, particolarmente rilevante nella determinazione dell'incorporazione di leucina, è dovuta al turnover delle proteine. Infatti i batteri durante l'incubazione potrebbero degradare le proteine e riutilizzare i materiali degradati, soprattutto in condizioni di ridotte velocità di crescita e con tempi di incubazione più lunghi dei 60' consigliati, causando una sovrastima della produzione di biomassa. Non è necessario operare in condizioni di sterilità. Deve essere invece evitata la contaminazione con materiale organico che potrebbe stimolare l'attività batterica.

## Norme di Sicurezza

L'impiego di sostanze marcate con trizio rappresenta un rischio da radiazioni ionizzanti per il personale. Pertanto al fine di minimizzare il rischio, la detenzione e la manipolazione sono regolate per legge (D.L.vo 17 Marzo 1995, n.230 e successive modifiche e integrazioni).

Al fine di evitare il contatto diretto e la dispersione della radioattività nell'ambiente è necessario l'utilizzo di materiale a perdere (guanti, fiale, puntali), da smaltire tramite ditta specializzata e autorizzata.

Lo smaltimento dei liquidi di scintillazione, anche qualora non siano contaminati da materiale radioattivo, va effettuato nel rispetto della normativa che regola gli scarichi delle sostanze tossiche organiche.

## ENTEROCOCCHI / STREPTOCOCCHI FECALI NELLE ACQUE: SIGNIFICATO SANITARIO E METODOLOGIE DI ANALISI

a cura di L. Bonadonna - Istituto Superiore di Sanità, Roma

### Riassunto

Il più recente ordinamento tassonomico del gruppo degli streptococchi fecali, tradizionali indicatori di contaminazione fecale nelle acque, distingue, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, tre generi diversi di cui due (*Enterococcus* e *Streptococcus*) comprenderebbero specie intestinali o di origine fecale. L'introduzione del termine Enterococchi tra i parametri da ricercare per la determinazione della qualità delle acque, sia in recenti Direttive Europee sia nel D.Lgs. n. 152/99, richiede l'integrazione e l'aggiornamento dei metodi analitici mediante l'introduzione di tecniche più specifiche e rapide.

### Summary

Faecal streptococci have received widespread acceptance as useful indicators of faecal pollution in natural aquatic ecosystems. Nevertheless the taxonomy of this group, comprising species of the genera *Enterococcus* and *Streptococcus* has been subject to extensive revision in recent years. New and more rapid methods are now available.

### INTRODUZIONE

La determinazione della qualità igienico-sanitaria delle acque viene effettuata sulla base di una serie di controlli che, dal punto di vista microbiologico, sono basati tradizionalmente sul rilevamento di indicatori - coliformi e streptococchi fecali - di contaminazione fecale che, più che avere una loro specifica valenza, consentono di acquisire dati atti a valutare l'evoluzione dei fenomeni che inducono l'inquinamento delle acque in esame. Un microrganismo per essere elevato al ruolo di indicatore deve presentare una correlazione dotata di significato statistico con agenti eziologici specifici di malattie, i patogeni, la ricerca diretta dei quali non è però praticabile di routine per la mancanza di metodi sufficientemente specifici, sensibili, economici e di pronta e facile esecuzione. I microrganismi indicatori oltre a segnalare la presenza dei patogeni, dovrebbero esibire, rispetto a questi, un analogo spettro di sensibilità ai disinfettanti ed una stessa capacità di risposta alle condizioni ambientali; dovrebbero inoltre essere facilmente rilevabili con metodi sensibili, specifici ed economici e, possibilmente, non essere dotati di vita autonoma nell'ambiente, in modo da poter indicare selettivamente il tipo di evento da cui derivano.

Il gruppo degli Streptococchi fecali è stato considerato per lungo tempo efficace indicatore di

contaminazione fecale per gli ecosistemi acquatici. Sebbene Bartram and Rees (2000) considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo, negli ultimi anni, è stato soggetto ad ampia revisione. Con il termine Streptococchi fecali viene indicato un gruppo di microrganismi eterogeneo sia dal punto di vista tassonomico sia ecologico, raggruppati insieme sulla base della morfologia microscopica, della reattività alla colorazione di Gram e della assenza dell'enzima catalasi. Una prima classificazione del gruppo è stata proposta su base sierologica da Lancefield (1933) che individuò antigeni gruppo-specifici che sono distinti con lettere dell'alfabeto; Sherman (1937) ha successivamente fornito una classificazione differenziando gli streptococchi in quattro gruppi: viridans, streptococchi piogenici, lattici ed enterococchi. Gli studi più recenti (Leclerc *et al.*, 1996) hanno distinto invece, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridazione del DNA, tre generi diversi di cui due (*Enterococcus* e *Streptococcus*) comprenderebbero specie intestinali o di origine fecale.

Attualmente il genere *Enterococcus* comprende 17 specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie di gruppo (Williams *et al.*, 1991). Le specie appartenenti al genere *Enterococcus* soddisfano specifici requisiti: crescita a 10°C e 45°C, resistenza a 60°C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e a 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucoside (MUD) in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC). I gruppi individuati in questo genere comprendono *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae*, *Ent. mundtii* (primo gruppo); *Ent. avium*, *Ent. pseudoavium*, *Ent. raffinosus* e *Ent. malodoratus* (secondo gruppo); *Ent. casseliflavus* e *Ent. gallinarum* (terzo gruppo); *Ent. faecalis*, *Ent. cecorum*, *Ent. colombae* e *Ent. Saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo. L'appartenenza al genere *Enterococcus* di specie diverse anche dal punto di vista molecolare comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere. Anche il test già comunemente utilizzato per una conferma dell'appartenenza al gruppo più ampio degli streptococchi fecali, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile ad individuare anche le nuove specie del genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*.

Secondo la nuova tassonomia, nel genere *Streptococcus* si individuano gli streptococchi orali, gran parte dei quali opportunisti patogeni e poco adattabili alla sopravvivenza nell'intestino e gli streptococchi di prevalente derivazione animale con habitat intestinale (streptococchi intestinali). Le specie che vengono comprese in quest'ultimo

sottogruppo (*Strep. bovis*, *Strep. equinus*, *Strep. alactolyticus*, *Strep. suis*, *Strep. intestinalis*, *Strep. hyointestinalis*) hanno caratteristiche diverse dal punto di vista genotipico e differente significato sanitario. La loro proporzione è diversa nelle feci delle diverse specie animali e comunque sempre prevalente rispetto alla loro concentrazione nelle feci umane. Tuttavia, se queste differenze avevano precedentemente consentito di avanzare l'ipotesi di ottenere indicazioni sulla origine fecale dell'inquinamento, anche sulla base del rapporto tra i due indicatori, coliformi e streptococchi, è stato verificato che la valutazione del rapporto tra gli indicatori, per stabilire l'origine della contaminazione, può portare a conclusioni ed interpretazioni errate (APHA, 1998). Infatti, è stato calcolato che, a causa della diversa capacità di sopravvivenza da parte dei microrganismi considerati e della maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte del gruppo degli enterococchi/streptococchi, nelle acque, la proporzione numerica tra i due gruppi di indicatori è alterata.

Il progressivo recepimento delle Direttive Europee in materia di gestione e qualità delle acque e l'introduzione del parametro Enterococchi, realizzata nel D.Lgs. n. 152/99 e nel successivo D.Lgs. n. 258/00, richiede l'aggiornamento dei metodi analitici mediante l'introduzione di tecniche più specifiche e rapide. Pertanto, allo scopo di fornire uno strumento applicativo di riferimento per la pianificazione e l'unificazione delle procedure di analisi delle acque vengono di seguito proposti alcuni metodi analitici, alcuni di nuova formulazione, altri già sperimentati e inseriti in normative nazionali.

## ENTEROCOCCHI / STREPTOCOCCHI FECALI: PROCEDURA ANALITICA

### Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti ai generi *Enterococcus* e *Streptococcus*.

### Principio dei metodi

La procedura analitica si basa sulla determinazione quantitativa dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

Possono essere utilizzate le seguenti tecniche analitiche:

**Metodo a:** metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei microrganismi tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione di acqua in

terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, sulla base della formula di Thomas e dall'apposita tabella già predisposta (IRSA, 1994).

**Metodo b:** metodo del numero più probabile (Most Probable Number, MPN) in micropiastre a 96 pozzetti, basato sul rilevamento dell'attività enzimatica della  $\beta$ -glucosidasi, evidenziabile dall'idrolisi di un  $\beta$ -glucoside, con rilascio di composti colorati e fluorescenti. Il campione diluito è inoculato in 96 pozzetti da 350  $\mu$ L contenenti il terreno di coltura disidratato. Dopo un periodo di incubazione di 36-72 ore a  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  si procede alla lettura dei risultati sotto lampada di Wood (366 nm). L'idrolisi del 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucoside (MUD) produce fluorescenza blu nei pozzetti. Il metodo fa riferimento alla norma ISO 7899-1:1998.

**Metodo c:** metodo della filtrazione su membrana (MF). Il metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato dopo filtrazione di un idoneo volume dell'acqua da analizzare.

**Metodo d:** metodo della filtrazione su membrana (MF). Il metodo fa riferimento alla norma ISO 7899-2:2000 e permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato dopo filtrazione di un idoneo volume dell'acqua da analizzare.

### Campo di applicazione

Le procedure analitiche possono essere utilizzate per l'analisi di acque superficiali, di fiume, di lago e di reflui anche sottoposti a trattamento.

### METODO A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei microrganismi in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

### Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

### Reagenti e terreni di coltura

Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

#### Brodo all'Azide Destrosio

Composizione:

Estratto di carne	4,5 g
Triptone	15 g
Glucosio	7,5 g
Sodio cloruro	7,5 g
Sodio azide	0,2 g
Acqua distillata	1000 mL
pH	$7,2 \pm 0,2$

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Adottare idonee precauzioni (dispositivi di protezione individuale) durante la preparazione del terreno che è tossico per la presenza di azide sodica. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 1 settimana a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

#### Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio

Composizione:

Peptone	20 g
Destrosio	5 g
Sodio cloruro	5 g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,7 g
Potassio diidrogeno fosfato	2,7 g
Sodio azide	0,4 g
Violetto di etile	0,83 mg
Acqua distillata	1000 mL
pH	$7,0 \pm 0,2$

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Adottare idonee precauzioni (dispositivi di protezione individuale) durante la preparazione del terreno che è tossico per la presenza di azide sodica. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 1 settimana a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

### Procedura

#### Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva, agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e

procedere all'incubazione in termostato entro 30 min. Incubare a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per  $48\pm 3$  ore. Dopo incubazione, agitare ciascun tubo per verificare la presenza di torbidità (risultato positivo). Registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano intorbidimento del brodo e sottoporre i tubi positivi alla prova di conferma.

#### Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (torbidità entro le  $48\pm 3$  ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio per la prova di conferma. Incubare i tubi a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per  $24+24$  ( $\pm 3$ ) ore. Considerare positivi i tubi che presentano intorbidimento accompagnato da un deposito grigio-violetto sul fondo del tubo.

Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la apposita tabella (IRSA, 1994), calcolare il valore dell'indice MPN.

#### Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

#### Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato

Tipo di acqua	N° di diluizioni	N° di pozzetti/diluizione		Valori limite di misura N° batteri/100 mL
superficiale marina	2±	64	a 1:2	$15-3,5 \times 10^4$
		32	a 1:20	
superficiale dolce	4	24	a 1:2	$40-3,2 \times 10^6$
		24	a 1:20	
		24	a 1:200	
		24	a 1:2000	
reflua grezza e trattata	6	16	a 1:200000	$60-6,7 \times 10^8$
		oltre 16		

#### Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, dalla preparazione del terreno colturale alla lettura dei risultati, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- essiccatore;
- lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- micropipetta a 8 canali per l'inoculo di 200 µL;
- nastro adesivo sterile;
- piastre Petri
- piastre sterili a 96 pozzetti da 350 µL, non fluorescenti e a fondo piatto;
- puntali sterili per micropipetta;
- tubi per diluizioni.

ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

#### METODO B: Metodo del numero più probabile (MPN) in micropiastre a 96 pozzetti

Il metodo di seguito descritto corrisponde alla Norma ISO 7899-1. E' applicabile all'analisi di tutti i tipi di acque superficiali e reflue, ed è particolarmente adatto all'esame di quelle ricche di materiale in sospensione. E' di facile e rapido impiego. L'allestimento del substrato colturale completo a partire dai singoli ingredienti e reagenti è sconsigliato anche per la tossicità di alcuni componenti.

La tecnica analitica è stata verificata anche nell'ambito di circuiti interlaboratoriali europei ed è previsto il suo inserimento tra i metodi proposti nella futura Direttiva Europea relativa alle acque di balneazione.

#### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare le diluizioni da inoculare in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Di seguito, per l'analisi di alcuni tipi di acqua vengono riportati alcuni esempi in funzione del presunto livello di contaminazione delle acque:

#### Reagenti e terreni di coltura

##### Soluzione diluente

##### Composizione:

Acqua di mare sintetica	22,5 g
Soluzione di blu di bromofenolo	10 mL
Acqua distillata	1000 mL

Miscelare gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a  $121\pm 3^\circ\text{C}$  per 15-20 min.

Preparare la soluzione di blu di bromofenolo aggiungendo 0,04 g a 100 mL di etanolo al 50%.

L'aggiunta di questa soluzione è facoltativa e utile solo per la colorazione della soluzione diluente.

### Acqua distillata

Utilizzare acqua distillata priva di sostanze inibenti la crescita nelle condizioni di prova. Sterilizzare l'acqua distillata a  $121\pm 3^\circ\text{C}$  per 15-20 min.

### Soluzione A: MUD/SF medium

#### Composizione:

Triptosio	40 g
Potassio fosfato biidrato	10 g
D(+)-galattosio	2 g
Poliossietilenesorbitano monooleato (Tween 80)	15 mL
Acqua distillata	900 mL

Il terreno completo si trova in commercio disidratato e pronto per l'uso, già distribuito in piastre a 96 pozzetti corredate di nastro adesivo. Per la procedura di analisi, seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Qualora si proceda alla sua preparazione, aggiungere, a 900 mL di acqua distillata, triptosio, potassio fosfato biidrato, galattosio e Tween 80 (il Tween 80 è uno dei prodotti utilizzabili, disponibili in commercio; possono comunque essere utilizzati prodotti equivalenti purché sia dimostrato forniscano gli stessi risultati), mantenendo in agitazione fino ad ebollizione e completa dissoluzione degli ingredienti. Fare raffreddare.

### Soluzione B: all'acido nalidixico

#### Composizione:

Carbonato acido di sodio	4 g
Acido nalidixico	250 mg
Acqua distillata	50 mL

Miscelare gli ingredienti a caldo mantenendo in agitazione. Fare raffreddare.

### Soluzione C: al TTC

#### Composizione:

Tallio acetato	2 g
TTC	0,1 g
Acqua distillata	50 mL

Miscelare gli ingredienti a caldo mantenendo in agitazione. Fare raffreddare.

### Soluzione D: al MUD

#### Composizione:

MUD 150mg	150 mg
N,N-dimetilformamide	2 mL

Miscelare gli ingredienti.

La N,N-dimetilformamide è tossica. Il prodotto può causare il cancro ed è *nocivo* per inalazione, contatto

con la pelle e per ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere e uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

La procedura di preparazione del substrato completo prevede la miscelazione delle soluzioni A, B, C, D. Aggiustare il pH a  $7,5\pm 0,2$ .

Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con porosità nominale di  $0,2\ \mu\text{m}$ . Distribuire in aliquote da 100  $\mu\text{L}$  in ciascuno dei 96 pozzetti in piastra. Disidratare immediatamente in un essiccatore o sotto cappa a flusso laminare.

### Procedura

#### Preparazione delle diluizioni

#### Acque con salinità < 30‰

Aggiungere 9 mL di soluzione diluente in tutti i tubi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione diluente (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

#### Acque con salinità $\geq 30\text{‰}$

Aggiungere 9 mL di acqua distillata sterile nel tubo della prima diluizione e 9 mL di soluzione diluente a tutti i tubi successivi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di acqua distillata (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

### Semina delle diluizioni e incubazione

Con le adeguate regole di asepsi, versare la diluizione iniziale in una piastra Petri vuota sterile e, usando una micropipetta a 8 canali, distribuire 200  $\mu\text{L}$  in ciascun pozzetto contenente il terreno disidratato, corrispondente alla prima diluizione. Operare in modo analogo per le diluizioni successive, cambiando la piastra Petri e i puntali ad ogni diversa diluizione. Coprire la piastra di inoculo con nastro adesivo sterile per prevenire contaminazioni esterne e disidratazione dell'inoculo.

Incubare le piastre inoculate a  $44\pm 1^\circ\text{C}$  per almeno 36 ore e fino ad un massimo di 72 ore.

#### Letture dei risultati

I pozzetti che sotto luce ultravioletta risultano blu-fluorescenti sono considerati positivi.

#### Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

Se nessuno dei pozzetti è positivo, esprimere il risultato come  $<n/100$  mL, dove  $n$  è il valore dell'indice MPN per 1 pozzetto positivo nelle condizioni di diluizioni impiegate.

Per il calcolo dell'indice MPN procedere determinando il numero caratteristico in base al numero di pozzetti positivi per ciascuna diluizione selezionata, che, con più di 3 diluizioni, dovrà corrispondere ad un numero composto da 3 cifre. Individuato il numero caratteristico, per calcolare il valore dell'MPN consultare la norma NF T 90-433: agosto 1997, ovvero consultare le tabelle fornite con il terreno colturale.

#### Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

#### METODO C: Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione di microrganismi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche.

#### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

#### Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

#### Reagenti e terreni di coltura

#### Terreni di isolamento

#### Terreno *m-Enterococcus agar*

Composizione:	
Triptosio	20 g
Estratto di lievito	5 g
Destrosio	2 g
Dipotassio idrogeno fosfato	4 g
Sodio azide	0,4 g
2,3,4 trifenil-tetrazolio cloruro	0,1 g
Agar	10 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $7,0\pm 0,2$	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L). Adottare idonee precauzioni (dispositivi di protezione individuale) durante la preparazione del terreno che è tossico per la presenza di azide sodica. Non sterilizzare. Dopo avere sciolto la polvere distribuire in capsule di Petri e conservare a circa  $+4^\circ\text{C}$  per non più di 1 settimana in condizioni ottimali.

#### Substrato di crescita

#### Agar Soia Triptone

Composizione:	
Triptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $7,2\pm 0,2$	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a  $121\pm 3^\circ\text{C}$  per  $15\pm 1$  min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa  $+4^\circ\text{C}$  per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

#### Substrato di conferma

#### Terreno all'Esculina e bile

Composizione:	
Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Bile	40 g
Esculina	1,0 g
Citrato ferrico	0,5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $7,1\pm 0,2$	



Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a  $121\pm 3^\circ\text{C}$  per  $15\pm 1$  min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa  $+4^\circ\text{C}$  per non più di 1 settimana in condizioni ottimali.

*Reattivo per la prova della catalasi*

Acqua ossigenata al 3%.

La soluzione è disponibile in commercio pronta all'uso alla concentrazione indicata. Conservare al riparo dalla luce diretta e ad una temperatura di circa  $+4^\circ\text{C}$ .

### Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di  $0,45\ \mu\text{m}$  di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per 48 ore. Sono considerate di streptococchi fecali le colonie di colore dal rosso scuro al rosso chiaro. Qualora sia opportuno procedere alla verifica dell'appartenenza al gruppo, effettuare le prove dell'idrolisi dell'esculina e della catalasi, quali prove di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

### Conferma biochimica

*Prova dell'idrolisi dell'esculina*

Trasferire, dopo incubazione, dal terreno m-Enterococcus Agar sul terreno all'esculina e bile, le membrane su cui si sono sviluppate le colonie di presunti streptococchi fecali. Dopo incubazione a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per 2 ore si considerano enterococchi/streptococchi quelli che hanno formato colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana, sul terreno all'esculina compare un alone nero-marrone.

*Prova della catalasi*

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su Agar soia triptone ed incubare a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per  $24+48$  ( $\pm 2$ ) ore.

*Procedura*

Strisciare su un vetrino portaoggetti una colonia cresciuta sul substrato di crescita e ricoprirla con alcune gocce di acqua ossigenata al 3%. Evidenziare la reazione: l'assenza della formazione di bolle costituisce una prova positiva per la

caratterizzazione dei microrganismi ricercati che mancano di catalasi. La presenza dell'enzima è invece rilevata dallo sviluppo di bollicine di gas.

### Espressione dei risultati

Il numero di enterococchi/streptococchi si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, sul substrato di isolamento, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL). Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \times N \times V_1 \times F}{B \times V_s} \quad (1)$$

dove

- C è il numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
- A è il numero di colonie confermate
- B è il numero di colonie da sottoporre a conferma
- N è il numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
- $V_1$  è il volume di campione analizzato
- $V_s$  è il volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
- F è il fattore di diluizione

### Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

### METODO D: Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione di microrganismi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche. Il metodo riportato corrisponde alla norma ISO 7899-2:2000.

### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

## Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

## Reagenti e terreni di coltura

Terreno di isolamento

*Substrato di Slanetz e Bartley*

### Terreno di base

Composizione:	
Triptosio	20 g
Estratto di lievito	5 g
Destrosio	2 g
Dipotassio idrogeno fosfato	4 g
Sodio azide	0,4 g
Agar	da 8 a 18 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata con l'aggiunta di trifeniltetrazoliodocloruro in idonea concentrazione e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione.

### Soluzione di trifeniltetrazoliodocloruro (TTC)

Composizione:	
2,3,5-trifeniltetrazoliodocloruro	1 g
Acqua	100 mL

Sciogliere nell'acqua agitando la soluzione e sterilizzare per filtrazione (0,2 µm). Proteggere dalla luce ed eliminare nel caso in cui si sviluppi una colorazione rosa.

### Terreno completo

Composizione:	
Terreno di base	1000 mL
Soluzione di TTC	10 mL
pH 7,2±0,1	

Aggiungere la soluzione di TTC al terreno di base mantenuto a temperatura tra 50 e 60°C. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L). Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare.

## Substrato di conferma

*Terreno all'Esculina-bile-azide Agar*

Composizione:	
Triptone	17 g
Peptone	3 g

Estratto di lievito	5 g
Bile	10 g
Esculina	0,1 g
Ferro (III) ammonio citrato	0,5 g
Sodio cloruro	5 g
Sodio azide	0,15 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,1±0,1	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

## Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con pori di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 36±1°C per 44±4 ore. Sono considerate come tipiche le colonie di colore dal rosa al rosso scuro e marrone (al centro o su tutta la colonia).

In presenza di colonie tipiche trasferire la membrana o singole colonie su piastre di esculina-bile-azide agar preriscaldate a 44°C. Incubare a 44±1°C per 2 ore. Dopo incubazione si considerano positive le colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana, sul terreno all'esculina compare un alone nero-marrone.

Si consiglia di procedere all'esecuzione della prova della catalasi, come indicata nel Metodo C. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

## Espressione dei risultati

Il numero di microrganismi si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, sul substrato all'esculina, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL)

Dal numero di colonie caratteristiche contate, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \times N \times V_1 \times F}{B \times V_2}$$

dove:

- C è il numero di colonie che sono state confermate per 100 mL  
 A è il numero di colonie confermate  
 B è il numero di colonie da sottoporre a conferma  
 N è il numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana  
 V<sub>1</sub> è il volume di campione analizzato  
 V<sub>s</sub> è il volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)  
 F è il fattore di diluizione

### Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

### Bibliografia

- APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard methods for the Examination of Water and Wastewater", 19th ed., Washington D.C.
- Bartram J. and Rees G. (ed.) (2000): "Monitoring bathing waters" E & FN Spon, London and New York.
- Decreto Legislativo (1999): "Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della Direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della Direttiva 91/676/CEE, relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole", *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 29 maggio 1999, n. 101/2.
- Decreto Legislativo (2000): "Disposizione correttiva e integrativa del Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, a norma dell'art. i, comma 4 della Legge 24 aprile, n. 128", *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* del 18 settembre 2000, n. 218..
- IRSA (1994): "Metodi microbiologici", in "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, ed., Roma.
- ISO 7899-1. (1998): "Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water", Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium.
- ISO 7899-2 (2000): "Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci", Part 2: Membrane filtration method.
- Lancefield R. C. (1933): "A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci", *J. Exp. Med.* **57**, 571-595.
- Leclerc H., Devriese L.A. and Mossel D.A.A. (1996): "Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water", *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 459-466.
- Sherman J.M. (1937): "The streptococci", *Bacteriol. Rev.*, **1**, 3-97.
- Williams A.M., Rodriguez U.M. and Collins M.D. (1991): "Intragenetic relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA", *Res. Microbiol.*, **142**, 67-74.

## PROPOSTA DI METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL CLORO RESIDUO TOTALE NELLE ACQUE POTABILI

L. Campanella, R. Dragone, G. Favero, J. Bianchi, Dipartimento di Chimica - Università "La Sapienza", Roma

### Riassunto

Viene presentato un procedimento analitico per la determinazione del "cloro residuo totale", che abbia un limite di rilevabilità più basso rispetto al metodo ufficiale (N,N-diethyl-p-fenilendiammina), cioè tale da rilevare concentrazioni minori di 0,05 mg/L. Il procedimento consta di due fasi: la prima, di riduzione del "cloro residuo totale" a cloruro ad opera del vanadio (III) formatosi per reazione del metavanadato di ammonio con zinco metallico; la seconda, di determinazione spettrofotometrica della concentrazione degli ioni cloruro prima e dopo la riduzione, in modo da conoscere dalla differenza, il cloro residuo inizialmente presente nell'acqua.

### Summary

An analytical procedure to determine total residual chlorine at a concentration lower than 0,05 mg/L, that is the level detected by the official method based on N,N-diethyl-p-phenylendiammine, is proposed. The procedure is articulated in two phases: in the first one total residual chlorine is reduced to chloride by vanadium(III) obtained by reaction of ammonium metavanadate with metal Zn; in the second one chloride is spectrophotometrically determined before and after the reduction: from the differential value chlorine is determined.

### Introduzione

Il cloro viene usato con successo per la potabilizzazione delle acque; però proprio il cloro utilizzato a tale scopo, può portare ad un aumento del rischio di tumori. Nonostante sia complicato fissare univocamente una relazione tra la presenza di sostanze riscontrabili nell'acqua ed l'insorgere nell'uomo, poiché è difficile distinguere gli effetti

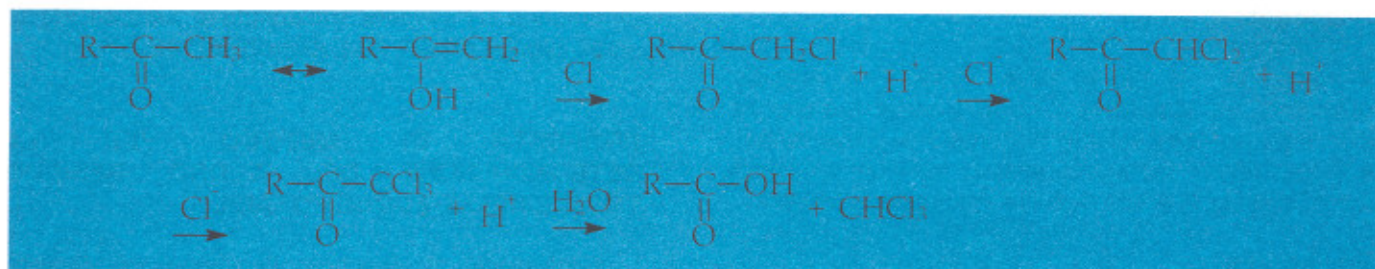
tossici prodotti da una singola sostanza da altri fattori inevitabilmente interagenti quali fumo, alimentazione, ambiente di lavoro, fattori ereditari, resta comunque indubbio che l'immissione di cloro nelle acque porta alla formazione di trialometani: composti organici clorurati con potenzialità cancerogena.

Poiché tra queste sostanze i trialometani sono certamente i più tossici, si rende necessario rintracciare ogni circostanza che concorre alla loro formazione.

È noto che la quantità di trialometani formata è

strettamente correlata alla quantità di carbonio organico non volatile, ma dipende anche dalla concentrazione di cloro residuo e dalla temperatura dell'acqua.

Tali sostanze si formano attraverso una reazione aloformica e quindi le rese sono maggiori a pH basici; inoltre i rapporti tra i quattro principali alometani (cloroformio, diclorobromometano, dibromoclorometano, bromoformio) dipendono dal contenuto di bromuri dell'acqua e comunque sempre dalla concentrazione di cloro residuo.



Per questo, se da una parte è importante che il "cloro residuo totale" sia presente ad indicare che la disinfezione delle acque è stata completata, dall'altra, è fondamentale che tale concentrazione sia la minore possibile, per assicurare una minima presenza dei trialometani.

#### Metodi esistenti per la determinazione del cloro totale

Il "cloro residuo totale" è la quantità di cloro che rimane nell'acqua sottoposta a clorazione, dopo un congruo periodo di contatto indispensabile per esplicare la sua azione ossidante. Il cloro suddetto può essere presente nell'acqua come cloro libero (nella forma di acido ipocloroso, ipoclorito e cloruro), sotto forma di cloro combinato (come clorammine ed altri composti cloro-derivati), oppure può essere presente contemporaneamente come cloro libero e combinato.

I metodi studiati per la determinazione qualitativa e quantitativa del cloro residuo presente nell'acqua sono numerosi e la maggior parte di essi è basata sull'energica azione ossidante esercitata dal cloro in soluzione acquosa.

I metodi più comunemente impiegati sono:

- metodo iodometrico;
- metodo all'ortotolidina;
- metodo dell'*N,N*-dietil-*p*-fenilendiammina;
- metodo amperometrico su anodo modificato con membrana fotopolimerizzata.

Alcuni brevetti sullo stesso soggetto, si basano sull'impiego di un sensore a stato solido, sull'impiego di una cella elettrochimica opportunamente disegnata, sulla colorazione derivante dalla reazione del cloro con un reattivo preparato *ad hoc*.

#### Scopo della ricerca

Obiettivo della ricerca era la messa a punto di un procedimento analitico per la determinazione del "cloro residuo totale", avente un limite di rilevabilità più basso rispetto al metodo ufficiale (*N,N*-dietil-*p*-fenilendiammina), cioè tale da rilevare concentrazioni minori di 0,05 mg/L. Il procedimento consta di due fasi: la prima, di riduzione del "cloro residuo totale" a cloruro ad opera di un opportuno riducente; la seconda, di determinazione spettrofotometrica della concentrazione degli ioni cloruro prima e dopo la riduzione, in modo da conoscere dalla differenza, il cloro residuo inizialmente presente nell'acqua.

Per quanto riguarda la fase di studio, sono stati sperimentati tre metodi: il primo prevede come agente riducente polvere di rame e farina fossile (in batch), il secondo cadmio metallico (in colonna) e, l'ultimo, che si è rivelato il migliore, una soluzione di vanadio (III) trisolfato. Nel primo caso la riduzione si è dimostrata particolarmente lunga, nel secondo non è risultata quantitativa; la riduzione con vanadio trisolfato invece, oltre ad essere quantitativa, è molto veloce, tanto che l'analisi può considerarsi terminata dopo tre minuti.

Tale determinazione, che deve essere necessariamente sensibile fino a misurare variazioni di concentrazione minori di 0,05 mg/L, si basa sulla competizione del cloruro con il difenilcarbazono nel complessare il mercurio (II). Dopo aver ottimizzato il metodo ed averlo caratterizzato per le interferenze, questo è stato applicato con successo all'analisi di tre campioni reali, ottenendo risultati al di sotto dei limiti di rilevabilità del metodo ufficiale.

#### Descrizione dell'attività sperimentale

L'intero procedimento analitico si svolge, come detto, fondamentalmente in due fasi: la prima consiste nella riduzione quantitativa del cloro sotto forma di

ipoclorito e clorammina, adoperando un adeguato riducente, la seconda, nel rilevamento spettrofotometrico della concentrazione finale degli ioni cloruro. Tale tipo di rilevazione si rende necessaria perché quella potenziometrica con elettrodo ionoselettivo da noi sperimentata si è rivelata inadeguata.

Per la prima fase sono stati sperimentati diversi sistemi riducenti.

#### Standard impiegati

- ✓ Sodio ipoclorito: soluzione,  $\geq 4\%$  di cloro attivo, Aldrich
- ✓ Clorammina B,  $C_6H_5ClNO_2SNa$ , Sigma
- ✓ Clorammina T,  $C_7H_7ClNO_2SNa$ , Sigma
- ✓ Candeggina, ACE: concentrazione media al confezionamento 4,9%.

#### Metodo della polvere di rame e farina fossile

**Reattivi usati:** Polvere di rame, 200 mesh 99%, Aldrich; farina fossile composta, per cromatografia, Carlo Erba Reagenti.

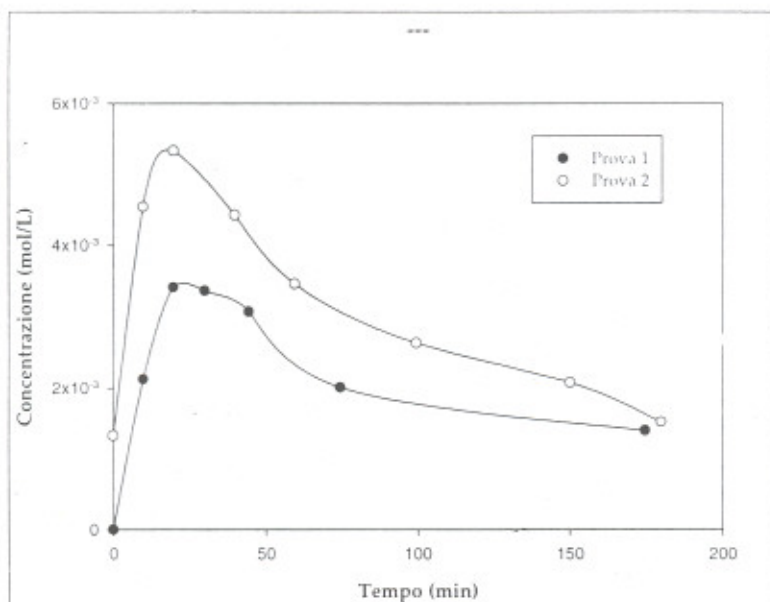
È stata preparata una polvere contenente il 20% di polvere di rame e l'80% di farina fossile, utilizzando un mortaio in quarzo per il mescolamento.

La farina fossile o terra di diatomee o, ancora, celite, è ricavata da giacimenti di scheletri silicei di piccoli fossili che si sono formati nel corso del tempo; ne esistono in commercio di svariati tipi che sono, però, tutti simili tra loro.

**Procedimento:** l'analisi è stata effettuata usando una beuta con tappo a smeriglio nella quale sono stati posti 100 mL di diversi campioni standard: candeggina, ipoclorito, clorammina B e clorammina T, ciascuno a concentrazione prefissata. Aggiungendo poi diverse quantità di polvere di rame e farina fossile, si è misurata, ponendo il tutto sotto agitazione, la variazione nel tempo della concentrazione di ioni cloruro in soluzione.

I risultati ottenuti, mostrano una riduzione solo parziale del cloro ed, anzi, dopo una prima riduzione, la reazione sembra tornare indietro probabilmente a causa di una reazione di disproporzione.

**Conclusioni:** i risultati raggiunti mostrano senz'altro che una maggiore quantità di agente riducente diminuisce il tempo di analisi; in genere tale tempo è molto lungo al punto che quando si usano eccessi di polvere con notevoli problemi per un ipotetico reattore di riduzione, l'analisi può considerarsi terminata in non meno di un'ora.



#### Metodo del metavanadato d'ammonio

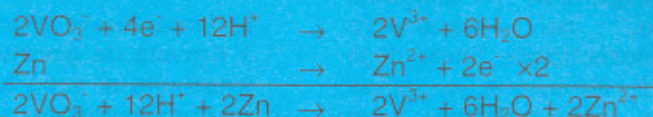
**Reattivi usati:** metavanadato d'ammonio,  $(NH_4VO_3)$ , Sigma; acido solforico, 96%, Carlo Erba Reagenti; polvere di zinco, Carlo Erba Reagenti.

**Procedimento:** 200 mL di reattivo riducente sono stati preparati come segue: pesati 2 g di  $NH_4VO_3$  sono stati aggiunti 25 mL di  $H_2SO_4$  1 mol/L e si è portato il

tutto a volume (200 mL). Quindi si sono aggiunti 0,8 g di polvere di zinco ottenendo un pH finale di circa 1,4. Il vanadio (V) reagisce, in ambiente acido, con lo zinco metallico e si riduce a vanadio (III) che è quindi l'agente che riduce il cloro, presente come ipoclorito e clorammina, a cloruro.

Le ossidoriduzioni che avvengono in soluzione sono le seguenti:

per la prima reazione:



per la seconda reazione:



Con il metodo del metavanadato d'ammonio si sono ottenuti più vantaggi rispetto al metodo della polvere di rame e farina fossile. Innanzi tutto si è visto che mettendo un eccesso di reagente l'analisi può considerarsi terminata dopo circa 3 minuti e quindi in tempi compatibili per le esigenze di questo tipo di controllo. Considerando tutte le misure eseguite, si è rilevato che, per concentrazioni comprese tra 0,1 e  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L, la deviazione standard percentuale massima ottenuta risulta essere del 3,5%. Quando invece si raggiungono concentrazioni di  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L, concentrazioni sicuramente più vicine a quelle di un campione reale, la deviazione standard massima è dell'1,1%, ottenuta ripetendo su ciascun campione la determinazione almeno sette volte.

Il reagente utilizzato è facile da prepararsi e poco costoso; la riduzione nell'intervallo di concentrazioni di interesse ( $1,0 \times 10^{-2}$  -  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L), può considerarsi quantitativa sia per la candeggina che per la clorammina e per l'ipoclorito standard.

#### Metodo del Cadmio

**Reattivi usati:** cadmio metallico granulato, granulometria 0,3 - 1,5 mm, per analisi, per il riempimento dei riduttori, fornito da: Riedel-de Haen; solfato di rame depurato, Schiapparelli; cloruro d'ammonio, Carlo Erba Reagenti; soluzione concentrata di cloruro d'ammonio 25%; soluzione diluita di cloruro d'ammonio, 0,625%; acetone, Carlo Erba Reagenti; HCl 37%, Carlo Erba Reagenti; soluzione di HCl 2 mol/L.

**Procedimento:** il cadmio granulare impiegato è la frazione che passa attraverso un setaccio con maglie da 2 mm ed è trattenuta da un setaccio con maglie da 0,5 mm; 55 g di cadmio setacciato vengono preliminarmente sgrassati più volte con porzioni fresche di acetone e poi lavati con HCl 2 mol/L e con acqua fino a che il pH dei lavaggi è maggiore di 5. Successivamente i granuli vengono trattati, sotto agitazione, con 250 mL di soluzione al 2% di solfato di rame fino a scomparsa del precipitato colloidale bruno. Si decanta la soluzione e si lavano infine i granuli ramati con acqua (almeno dieci volte) per asportare tutto il precipitato di rame colloidale.

Si possono così preparare più colonne, dopo aver inserito sul loro fondo un batuffolo di lana di vetro, riempendole con la soluzione di cloruro di ammonio diluito e versandovi il cadmio ramato, un poco alla volta in modo che sedimenti bene.

Le colonne non in uso vanno mantenute piene di soluzione di cloruro d'ammonio e riposte al buio o ricoperte con foglio d'alluminio, per evitare l'esposizione del cadmio ramato alla luce.

Prima dell'uso si lava abbondantemente la colonna facendo defluire acqua distillata fino a scomparsa dei cloruri. Le colonne preparate hanno le dimensioni di una pasteur. Ogni colonna viene riempita con circa 3,2 g di cadmio ramato.

Dalle diverse analisi condotte sono emersi risultati in molti casi simili a quelli ottenuti con i metodi precedentemente illustrati anche se, in parte meno soddisfacenti dal punto di vista della completezza della reazione di riduzione. Infatti, in questo caso, quasi mai la riduzione può considerarsi quantitativa e, quando si ha a che fare con il cloro sotto forma di soluzione standard di ipoclorito, la riduzione stessa praticamente non avviene. D'altra parte i tempi di analisi sono piuttosto brevi, tenendo conto che il flusso della colonna è di 1 mL al minuto e considerando che si lavora con volumi di 5 mL di campione.

L'utilizzo di questo metodo non ha portato particolari vantaggi rispetto ai precedenti. Sicuramente i tempi di analisi sono piuttosto brevi ma la riduzione non è praticamente mai quantitativa. La deviazione standard percentuale massima ottenuta è del 4,5%. Complessivamente si può affermare che dei tre metodi sperimentati il migliore è quello che utilizza il metavanadato d'ammonio.

#### Determinazione della concentrazione di Cl<sup>-</sup>

Per la determinazione della concentrazione degli ioni cloruro, è stato impiegato uno spettrofotometro modello PERKIN-ELMER LC UV/VIS a doppio raggio.

**Principio del metodo:** gli ioni cloruro ottenuti in seguito alla riduzione con metavanadato d'ammonio, vengono determinati dopo la reazione con una soluzione contenente mercurio e difenilcarbazono, mediante dosaggio spettrofotometrico alla lunghezza d'onda di 550 nm. La determinazione spettrofotometrica indiretta dei cloruri in un campione di acqua in concentrazione minore o uguale a 0,005 mg/mL, è una procedura indicata in un brevetto che risale al febbraio 1991. Tale determinazione può essere effettuata sfruttando la formazione del complesso tra Cl<sup>-</sup> e Hg<sup>2+</sup> e quella del complesso colorato Hg(II)-difenilcarbazono. Infatti il difenilcarbazono, di colore giallo forma, in presenza di Hg<sup>2+</sup>, il complesso Hg(II)-difenilcarbazono che ha un

caratteristico colore violetto. Nota questa reazione, facendo una misura di assorbanza, si rileva che, all'aumentare della concentrazione del cloruro, l'assorbanza medesima diminuisce, poiché in soluzione è presente meno mercurio libero disponibile a legarsi con il difenilcarbazono e dare così il complesso violetto. Quindi si misura l'assorbanza nel visibile e, per la legge di Lambert-Beer, si correla alla concentrazione del complesso, successivamente a quella del mercurio ed in ultimo a quella degli ioni cloruro presenti.

Reattivi usati: acido nitrico, 65% fornito dalla Carlo Erba Reagenti; etanolo 95%, Carlo Erba Reagenti; difenilcarbazono ( $C_6H_5N=NCONHNHC_6H_5$ ), Aldrich; nitrato di mercurio monoidrato, Fluka; acido acetico, acetato d'ammonio, Carlo Erba Reagenti; metavanadato d'ammonio.

Standard usati: NaClO; clorammina B; clorammina T; candeggina; NaCl 99,5% Carlo Erba Reagenti

Procedimento: il campione viene diviso in due aliquote: nella prima vengono determinati i cloruri prima della riduzione, nella seconda dopo aggiunta del reattivo riducente. 10 mL di soluzione sono stati preparati aggiungendo a 0,6 mL di soluzione di nitrato di mercurio 0,01 mol/L, 2 mL di acido nitrico 0,1 mol/L, 2 mL di tampone acetico, in modo da rendere il pH della soluzione pari a  $4,0 \pm 0,3$  ed infine 2 mL di campione. A questo punto si introducono 2 mL di una soluzione contenente lo 0,01% in peso di difenilcarbazono in etanolo e si porta il tutto a volume con etanolo al 95%. La misura di assorbanza viene effettuata solo dopo aver lasciato reagire la miscela per circa 4-5 minuti. Questo è il procedimento da seguire prima della riduzione del cloro residuo. Nella seconda aliquota di campione (2 mL) si procede alla riduzione aggiungendo 1 mL di soluzione di reattivo riducente (metavanadato d'ammonio), si agita per 3 minuti e si ripete la misurazione come sopra. Tenuto conto che il metodo è brevettato e che quindi non è possibile reperire su di esso tutte le informazioni possibili si è sperimentalmente evidenziato come l'assorbanza diminuisca all'aumentare della concentrazione di ioni cloruro presenti nel campione e, per questo, sia lecito correlare l'assorbanza del complesso Hg(II)-difenilcarbazono alla concentrazione degli ioni cloruro.

Sono state inoltre eseguite misure per ottimizzare le condizioni sperimentali di lunghezza d'onda, pervenendo alle seguenti conclusioni:  $\lambda=550$  nm; pH=tampone acetico 0,1 mol/L; mercurio in soluzione= $2 \times 10^{-4}$  mol/L.

Dai risultati ottenuti si deduce che è possibile la determinazione di concentrazioni di cloruro fino a  $10^{-7}$  mol/L: la reazione è molto sensibile come la repentina scomparsa del colore. La concentrazione di nitrato di mercurio che deve essere presente in soluzione non deve produrre un'immediata decolorazione della soluzione stessa, anche per piccolissime variazioni di concentrazione di ioni cloruro perché ciò renderebbe inapplicabile il metodo.

Valutazione della presenza di sostanze con possibile attività interferente: per perfezionare il metodo in esame, è stata verificata l'eventualità di interferenze nella determinazione dell'assorbanza, da parte di alcune sostanze presenti nella matrice reale.

Nota la composizione di un'acqua potabile, è stata scelta come concentrazione di lavoro, per la prova degli interferenti, quella massima ammissibile in base alle leggi in vigore. Le sostanze con possibile attività interferente sono tutti quei metalli che possono formare con il difenilcarbazono un complesso colorato.

Preparando una soluzione contenente ferro, rame, zinco, piombo e cromo, rispettivamente alle concentrazioni di 0,3 mg/L, 0,2 mg/L, di 0,5 mg/L, 0,05 mg/L e 0,05 mg/L, si è verificato come essi non provochino assolutamente interferenze significative con le misure di assorbanza eseguite su campioni reali. La soluzione risultante, infatti, ha un'assorbanza nulla a 550 nm.

La formazione di complessi colorati tra questi elementi ed il difenilcarbazono in ambiente acido, si ha solo per concentrazioni dei metalli tanto elevate da non essere sicuramente mai raggiunte nelle acque potabili. In particolare anche il rame che, come noto, già a basse concentrazioni forma un complesso blu con il difenilcarbazono, alla concentrazione di 0,2 mg/L (massima ammissibile in un'acqua potabile), non provoca alcuna interferenza significativa nella misura.

#### *Analisi di campioni reali*

Dopo aver verificato, con l'utilizzo di soluzioni standard, che il metodo permette di determinare concentrazioni di ioni cloruro fino a 0,003 mg/L, si è proceduto all'analisi di campioni reali.

Il metodo consiste nella misura della concentrazione di ioni cloruro già presenti in soluzione, nella riduzione del cloro residuo totale presente con metavanadato d'ammonio, nella valutazione della nuova concentrazione di cloruri e, per differenza, nella determinazione appunto del cloro residuo totale nel campione.

È fondamentale valutare la concentrazione di nitrato di mercurio da porre in soluzione e questo può essere effettuato soltanto dopo avere stimato la concentrazione di ioni cloruro già presenti in soluzione.

Poiché la direttiva CEE 80/778 del 15/7/85 prescrive che la concentrazione di cloruro presente in un'acqua potabile sia minore o uguale a 25 mg/L, si deve presupporre che nel campione reale possa trovarsi una concentrazione di cloruri di circa  $7 \times 10^{-4}$  mol/L. per questo si aggiunge in soluzione una concentrazione di nitrato di mercurio pari a  $2 \times 10^{-4}$  mol/L e quindi si deve valutare se è possibile cogliere variazioni di concentrazione di ione cloruro fino a  $1 \times 10^{-7}$  mol/L. i risultati ottenuti su tre differenti tipi di campione reale sono soddisfacenti:

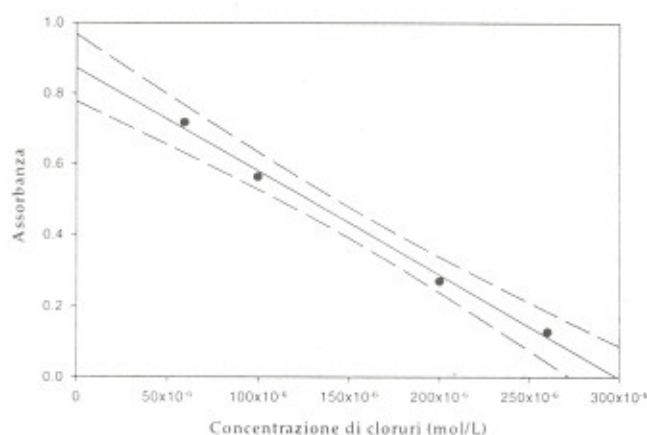
- i. campione di acqua potabile prelevato in laboratorio;
- ii. campione di acqua potabile prelevato in una

località delle Marche (Sassoferrato) di cui è nota la clorazione alla sorgente;

iii. campione di acqua potabile in commercio (Acqua Fabia).

I primi due campioni sono stati prelevati dopo aver fatto scorrere in abbondanza l'acqua dal rubinetto e sono stati conservati a temperatura ambiente in bottiglie di vetro e al buio. Il terzo campione invece, è stato prelevato dalla bottiglia di plastica in commercio.

Curva di calibrazione



L'equazione risultante per la curva di calibrazione è la seguente:

$$y = -3206(\pm 110) x + 0,981(\pm 0,018) r=0,990$$

#### Campione 1: acqua del laboratorio

	Concentrazione cloruri (mmol/L)	Deviazione standard (mmol/L)
Prima della riduzione	0,664	0,078
Dopo la riduzione	0,685	0,080
Variazione (cloro attivo residuo)	0,021	0,002

#### Campione 2: acqua di Sassoferrato

	Concentrazione cloruri (mmol/L)	Deviazione standard (mmol/L)
Prima della riduzione	0,017	0,002
Dopo la riduzione	0,027	0,002
Variazione (cloro attivo residuo)	0,010	0,002

#### Campione 3: acqua commerciale

	Concentrazione cloruri (mmol/L)	Deviazione standard (mmol/L)
Prima della riduzione	$129,19 \times 10^{-3}$	$7,14 \times 10^{-3}$
Dopo la riduzione	$129,88 \times 10^{-3}$	$6,92 \times 10^{-3}$
Variazione (cloro attivo residuo)	$0,69 \times 10^{-3}$	$0,02 \times 10^{-3}$

Nei primi due casi, la concentrazione di cloro attivo residuo totale determinata, risulta compresa nel limite di rilevabilità del metodo ufficiale che è di 0,05 mg/L. Nell'ultimo campione analizzato invece, è stata rilevata una concentrazione minore alla suddetta pari cioè a 0,02 mg/L.

A questo punto si rende necessario analizzare gli stessi campioni con il metodo ufficiale per poter così confrontare i risultati ottenuti; con tale metodo solo l'acqua prelevata in laboratorio ha fornito una risposta positiva ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L di  $\text{Cl}_2$ ), mentre per gli altri due campioni non c'è stata risposta alcuna.

*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

Stampato in proprio

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda

Allattamento e stampa: C. Pastore