

**EDITORIALE**

L'eventuale riutilizzo in agricoltura dei fanghi derivanti da trattamenti di depurazione delle acque reflue domestiche, urbane o industriali è disciplinato a tutt'oggi dal D.Lgs. n. 99 del 1992, recepimento della Direttiva Europea 86/278/CEE. Per quanto concerne i parametri microbiologici, il decreto consente il riutilizzo purchè i fanghi non contengano più di  $10^3$  Salmonelle MPN/gSS. Tuttavia, esiste una proposta di nuova direttiva che prevede la determinazione, oltre che del parametro Salmonella, anche del *Clostridium perfringens*, in virtù delle caratteristiche di questo microorganismo di fungere da indicatore di contaminazione e di sopravvivere a lungo nell'ambiente. In considerazione della complessità associata all'analisi microbiologica di matrici ambientali solide, allo scopo di fornire alcune possibili procedure di riferimento per gli operatori addetti al controllo anche alla luce di possibili modifiche del quadro normativo, in questo numero sono riportati tre metodi per il rilevamento delle spore di *C. perfringens* in fanghi di risulta. I metodi possono rappresentare anche uno strumento applicativo utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per la ricerca di questo microorganismo in altre matrici solide come suoli e sedimenti.

Il secondo contributo riguarda la determinazione di tossine algali (microcistine e nodularina) nelle acque superficiali. Questi contaminanti, prodotti del metabolismo secondario di molte specie di cianofite, caratterizzati da un'elevata tossicità per l'uomo e per gli organismi acquatici, hanno assunto negli ultimi anni una notevole rilevanza ambientale a seguito delle sempre più abbondanti fioriture di dette specie algali nei laghi di tutto il mondo ed anche in bacini artificiali d'acqua dolce utilizzati per scopo potabile. Il metodo proposto prevede la determinazione dei principali congeneri delle microcistine (MCs) e della nodularina presenti in campioni di acqua sia in fase disciolta (extracellulare) che all'interno delle cellule algali (endocellulare). Le due frazioni, extra ed endocellulare, vengono separate mediante filtrazione del campione acquoso. Le microcistine citoplasmatiche vengono estratte, previa procedura di congelamento-scongelo della componente cellulare, con solvente organico in bagno ad ultrasuoni. Le tossine algali presenti nel campione in forma disciolta vengono invece concentrate mediante SPE (Solid-Phase Extraction) su fase C<sub>18</sub>.

Entrambi gli estratti sono analizzati mediante HPLC-DAD o LC-MS o con un saggio immunoenzimatico (ELISA). Il limite di quantificazione dei singoli congeneri è risultato pari a 0,1 µg/L per l'analisi in HPLC-DAD; limiti notevolmente inferiori, compresi tra 0,1 e 1 ng/L, sono stati ottenuti mediante analisi in LC-MS.

Infine, si segnala l'iniziativa di un corso in **Biorisanamento di aree contaminate**, organizzato dall'Istituto di Ricerca sulle Acque, in collaborazione con la divisione italiana della SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry). Il corso, diretto a ricercatori, studenti di dottorato, operatori nel settore ambientale (ARPA, Regioni ecc.) e a tutti coloro che si vogliono formare ed aggiornare nel settore del biorisanamento di aree contaminate, prende in esame le metodologie avanzate di identificazione e monitoraggio dei microrganismi che rimuovono i contaminanti organici in diverse matrici ambientali (suolo, sedimento, acqua).

Dr. Maurizio Pettine  
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, dicembre 2010

**INDICE**

**SPORE DI CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN FANGHI DI RISULTA E MATRICI AMBIENTALI ANALOGHE: METODOLOGIE DI ANALISI** 1-16

**DETERMINAZIONE DI TOSSINE ALGALI (MICROCISTINE E NODULARINA) NELLE ACQUE SUPERFICIALI** 17-31

**ANNUNCIO**

**CORSO "BIORISANAMENTO DI AREE CONTAMINATE: METODOLOGIE, RUOLO DEI MICRORGANISMI E TECNICHE DI INDAGINE** 31-32

## SPORE DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN FANGHI DI RISULTA E MATRICI AMBIENTALI ANALOGHE: METODOLOGIE DI ANALISI

a cura di Bonadonna L., Nusca A.

Istituto Superiore di Sanità, Roma

### RIASSUNTO

In considerazione della complessità associata all'analisi microbiologica di matrici ambientali solide e alla capacità di *Clostridium perfringens* sia di fungere da indicatore di contaminazione sia di sopravvivere a lungo nell'ambiente, sono descritti tre metodi analitici che permettono di enumerare la concentrazione di spore del batterio in fanghi, suoli e matrici ambientali con caratteristiche analoghe. I metodi possono essere considerati come riferimento analitico per la ricerca di questo microrganismo e possono rappresentare uno strumento applicativo utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per la sua ricerca in matrici ambientali caratterizzate da una forte tendenza ad aggregare microrganismi.

### INTRODUZIONE

I microrganismi, e in special modo i batteri, sono in grado di insediarsi e svilupparsi in habitat caratterizzati da condizioni fisico-chimiche ampiamente diverse che conducono alla formazione di microambienti variamente popolati e diversificati. In particolare, gli ambienti anaerobi e microaerofili si caratterizzano per la colonizzazione da parte di microrganismi che non tollerano l'ossigeno o che si adattano a basse sue concentrazioni. Tra questi microrganismi, *Clostridium perfringens*, batterio anaerobio in grado di metabolizzare il 4-metilumbelliferone fosfato (Adcock & Saint, 2001), ha assunto, negli anni più recenti, un'importanza crescente, ed è considerato un indicatore di contaminazione, in grado di segnalare la presenza di microrganismi con analoghe caratteristiche (elevata resistenza nell'ambiente, a variabili condizioni di temperatura e ai biocidi) (Bonadonna *et al.*, 2002). *Clostridium perfringens*, presente nel materiale fecale dell'uomo in concentrazioni variabili tra  $10^2$  e  $10^7$  UFC/g, è considerato utile indicatore di contaminazione in quanto specie di sicura origine fecale. Esso è presente anche nelle feci canine e suine ed è meno comune o addirittura assente nelle feci degli altri animali a sangue caldo. Nei reflui le concentrazioni del microrganismo possono raggiungere valori intorno a  $10^5$  UFC/100 mL.

L'elemento distintivo che contraddistingue i batteri appartenenti al genere *Clostridium*, rispetto ad altri gruppi batterici, è la produzione di spore, forme conservative del microrganismo che rimangono quiescenti per lungo tempo e non si riproducono nell'ambiente (Davies *et al.*, 1995). Le spore, termoresistenti a localizzazione terminale o subterminale, sono strutture differenziate resistenti al calore, alla disidratazione, ai raggi ultravioletti, al congelamento, e sono difficilmente distrutte anche con i disinfettanti se si considera che la loro resistenza al cloro, rispetto a quella dell'*Escherichia coli*, è maggiore di circa 30-90 volte. La longevità e la resistenza delle spore sono da attribuire alla particolarità della struttura interna che si presenta più complessa delle cellule vegetative da cui esse originano: sono costituite da diversi strati di rivestimento, esterni alla parete cellulare non presenti nella cellula matura. Il complesso calcio-acido dipicolinico, presente all'interno della spora, è assente nelle cellule vegetative. Il grado di disidratazione della zona centrale (10% rispetto all'80-90% della cellula vegetativa) causa una parziale inattività enzimatica, aumenta la resistenza al calore e ad alcune sostanze chimiche come il perossido di ossigeno ( $H_2O_2$ ). Durante il processo di sporulazione si formano nel citoplasma proteine core-specifiche che legano fortemente il DNA alla parte più interna della spora proteggendolo dai potenziali danni associati ai fattori ambientali. Queste proteine funzionano come fonte di carbonio e di energia per la nuova cellula vegetativa al momento della germinazione. Per accelerare l'attività di germinazione, le spore generalmente vengono sottoposte a trattamento termico a temperatura subletale (80-85°C). Esistono comunque fattori che impediscono la germinazione delle spore e che sono rappresentati da presenza di condizioni acide, di acqua libera e di un ambiente non strettamente anaerobio. Tuttavia è stato anche dimostrato che la germinazione può avere luogo senza trattamento termico in un intervallo di temperatura variabile tra 3÷37°C (Koneman *et al.*, 1995).

In ambito sanitario risulta particolarmente rilevante l'analisi microbiologica dei fanghi di depurazione se si considera che essi, come prodotti di risulta derivati dai processi di trattamento dei liquami, costituiscono il concentrato di gran parte degli inquinanti presenti nei reflui. In particolare, se si tiene conto che il numero dei microrganismi concentrati nei fanghi supera quello presente nelle acque reflue grezze, la determinazione delle caratteristiche microbiologiche dei fanghi, soprattutto se utilizzati a scopo agricolo, assume un ruolo ed un'importanza significativa per i potenziali effetti sanitari.

Il problema di rendere igienicamente innocui i fanghi si pone soprattutto, e in modo prioritario, qualora essi vengano sparsi sui suoli dove, esaltando i processi biologici, possono favorire la crescita della vegetazione. Tuttavia la presenza di batteri, virus e parassiti (protozoi e metazoi), inglobati nei fanghi, può rappresentare un rischio sanitario e una limitazione per questa pratica di recupero. Il rischio è legato sia alla contaminazione di colture vegetali che possono, attraverso la catena alimentare, essere veicolo di trasmissione di malattie sia alla contaminazione dei corpi idrici per effetto dei processi di dilavamento.

L'eventuale riutilizzo in agricoltura dei fanghi derivanti da trattamenti di depurazione delle acque reflue domestiche, urbane o industriali è disciplinato a tutt'oggi dal D.Lgs. n. 99 del 1992, normativa di recepimento della Direttiva Europea 86/278/CEE. La normativa ammette l'utilizzazione dei fanghi in agricoltura a condizione che essi siano privi di sostanze tossiche e nocive persistenti e/o bioaccumulabili in concentrazioni dannose per il terreno, le colture, gli animali, l'uomo e l'ambiente e che inoltre non contengano più di  $10^3$  Salmonelle MPN/gSS (max). Attualmente esiste una nuova proposta di direttiva che, tra i parametri microbiologici da ricercare, prevede anche la determinazione di *Clostridium perfringens*.

Così come nei fanghi, la ricerca di *Clostridium perfringens* può essere significativa se rivolta a sedimenti e suoli dove coesistono le condizioni necessarie per lo sviluppo di questi microrganismi (assenza di ossigeno e alto tenore di sostanza organica).

Nei sedimenti le sue concentrazioni possono oscillare ampiamente tra  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g (Bonadonna, 2001). Valori più elevati ( $10^3$ - $10^5$  UFC/g) possono comunque essere registrati in sedimenti fluviali in corrispondenza di apporti di tipo organico. È importante notare che il microrganismo può essere considerato un valido indicatore di contaminazione e un supporto per la valutazione della qualità di diverse matrici ambientali, anche quando si debba stimare la qualità di acque superficiali e reflue che contengono scarichi industriali letali per i microrganismi non sporigeni, e di sedimenti e prodotti di compostaggio in cui possono essere presenti virus e protozoi.

I tre metodi qui riportati sono utili per il rilevamento delle spore di *C. perfringens* in composti solidi, quali fanghi di risulta, suoli, compost, sedimenti e matrici ambientali analoghe. I metodi possono quindi rappresentare uno strumento applicativo utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per le strutture che operano nel settore di controllo della qualità igienico-sanitaria ed ambientale.

Ciascuno dei metodi proposti si basa su principi diversi, in modo tale che l'operatore possa scegliere quello più adeguato alle necessità e alle condizioni specifiche, al tipo di campione e alle presunte concentrazioni del batterio. Mentre i primi due metodi rappresentano procedure già consolidate e più tradizionali, il terzo è un metodo cosiddetto rapido, selettivo, che non richiede conferme dei risultati dell'analisi, vantaggio indubbio per i tempi di risposta e per la riduzione dei costi.

## DEFINIZIONI

### ***Clostridium perfringens***

Il batterio è a forma di bastoncino, Gram-positivo, forma spore e produce colonie nere, grigie e giallo-bruno alla temperatura di 44°C su terreno contenente solfito. Non è motile, riduce i nitrati a nitriti, fermenta lattosio, liquefa la gelatina e metabolizza il 4-metilumbelliferil fosfato (MUP).

### **Unità Formanti Colonia (UFC)**

È un valore che rappresenta il numero di colonie visibili formate da singole cellule batteriche in crescita su appropriati terreni colturali agarizzati.

### **Rivitalizzazione**

Consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati e per questo non in grado di crescere direttamente su terreno agarizzato.

### **Forma vegetativa batterica**

Forma cellulare batterica capace di crescere in brodo e terreno agarizzato senza rivitalizzazione.

### **Spora**

Cellula differenziata, matura di alcune specie batteriche Gram-positive, in grado di rimanere inattiva per anni. Può riconvertirsi in cellula vegetativa attraverso i tre stadi di sporulazione: attivazione, germinazione ed esocrescita.

## PROCEDURE ANALITICHE

### METODO 1

#### Filtrazione su membrana

##### 1.1 - CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura analitica descritta può essere utilizzata per il rilevamento delle spore di *C. perfringens* in campioni di fanghi di risulta, suoli, anche concimati, compost, sedimenti e matrici ambientali analoghe.

##### 1.2 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consente di determinare, in campioni ambientali solidi, la concentrazione di spore di *C. perfringens* che formano colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato.

Dopo incubazione in condizioni anaerobiche a  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  ore, si contano le colonie tipiche (*C. perfringens* presuntivo) e si sottopongono a conferma.

La procedura consiste in una serie di fasi successive così suddivise:

- preparazione della sospensione del campione;
- pre-trattamento del campione;
- filtrazione del campione;
- conteggio delle colonie presunte ed identificazione (la tabella 1.1 riporta alcune proprietà utili per l'identificazione di *Clostridium perfringens*);
- eventuale conferma biochimica dell'identità delle colonie.

### 1.3 - REAGENTI, DILUENTI E TERRENI COLTURALI

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

#### 1.3.1 - Terreno di base Triptosiso Solfito Cicloserina Agar

##### Composizione

Triptosiso	15	g
Soia peptone	5	g
Estratto di lievito	5	g
Sodio metabisolfito anidro	1	g
Ferro (III) ammonio citrato	1	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Preparare il terreno preferibilmente al momento dell'uso. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata, sterilizzare a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per 15 minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere una soluzione di D-cicloserina.

#### 1.3.2 - Soluzione di D-cicloserina

##### Composizione

D-cicloserina	200	mg
Acqua distillata	5	mL

La D-Cicloserina si trova in commercio già pronta. Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi il contenuto di una fiala di D-Cicloserina con 5 mL di acqua distillata sterile ed addizionarlo al terreno di base.

#### 1.3.3 - Terreno completo al Triptosiso Solfito Cicloserina Agar

##### Composizione

Terreno di base (1.3.1)	1000	mL
Soluzione di cicloserina (1.3.2)	10	mL
pH $7,6 \pm 0,2$		

Sciogliere il terreno di base e far raffreddare a  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ . Rispettando le comuni regole di asepsi, utilizzando le fiale di D-cicloserina disponibili in commercio, procedere secondo le istruzioni della ditta produttrice.

È opportuno preparare il terreno al momento dell'uso. Eventualmente, conservare a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ , preferibilmente in condizioni anaerobiche, per non più di una settimana in condizioni ottimali. Prove di laboratorio hanno messo in evidenza che la resa del terreno è ampiamente influenzata dal tempo e dalle condizioni di conservazione; pertanto il tempo di conservazione del terreno completo, in condizioni refrigerate, non dovrebbe superare le 48 ore.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *C. perfringens* NCTC 8237 e come controllo negativo *E. coli* NCTC 9001; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

#### 1.3.4 - Terreno al nitrato e per la motilità

##### Composizione

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Potassio nitrato	1	g
D-galattosio	5	g
Glicerolo	5	g
Disodio idrogeno fosfato	2,5	g
Agar	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH $7,3 \pm 0,1$		

Dissolvere tutti gli ingredienti, tranne il glicerolo, in 950 mL di acqua distillata portando a ebollizione. Sciogliere, separatamente, in una beuta il glicerolo in 50 mL di acqua distillata e aggiungere la soluzione al terreno mescolando accuratamente. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per 15 minuti. Conservare a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per non più di un mese in condizioni ottimali.

Tab. 1.1 - Caratteristiche biochimiche e morfologiche per il riconoscimento di *C. perfringens*; sono state inserite anche le caratteristiche di *E. coli* che, come controllo negativo, non deve crescere sul terreno di isolamento per *C. perfringens*.

Caratteristiche per l'identificazione	Microrganismo	
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>
Forma	bastoncello	bastoncello
Dimensioni	2-3 µm x 0,4 - 1,2 µm	2-3 µm x 0,6-0,7 µm
Colorazione Gram	+	-
Motilità	-	+
Aspetto delle colonie	Colonie nere o grigio/giallo-marrone su terreno contenente sodio metabisolfito e ferro ammonio citrato	-
Produzione spore	+	-
Metabolismo	Anaerobio obbligato	Aerobio e anaerobio facoltativo
Fermentazione del lattosio	+	+
Liquefazione della gelatina	+	
Catalasi	-	+
Riduzione NO <sub>3</sub> a NO <sub>2</sub>	+	+
Riduzione NO <sub>3</sub> a N <sub>2</sub>	-	-
Metabolizzazione di MUP	+	-

+ = positivo; - = negativo

### 1.3.5 - Reagente A per nitrato

#### Composizione

Acido sulfanilico	0,8	g
Acido acetico (15% in volume)	100	mL

Dissolvere l'acido sulfanilico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione. Conservare il reagente, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a 5 ± 3°C.

### 1.3.6 - Reagente B per nitrato

#### Composizione

5-amino-2-naftalene-acido sulfonico	0,6	g
Acido acetico (15% in volume)	100	mL

Dissolvere il 5-amino-2-naftalene-acido sulfonico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro.

Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione. Conservare il reagente, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a 5 ± 3°C.

### 1.3.7 - Terreno di base al lattosio-gelatina

#### Composizione

Digerito enzimatico di caseina	15	g
Estratto di lievito	10	g
Gelatina	120	g
Acqua distillata	1000	mL

Dissolvere gli ingredienti in 1 L di acqua distillata ed aggiungere lattosio e la soluzione di rosso fenolo secondo le indicazioni.

### 1.3.8 - Lattosio

Aggiungere 10 g di lattosio al Terreno di base al lattosio-gelatina e miscelare con cura.

### 1.3.9 - Soluzione di rosso fenolo

#### Composizione

Rosso fenolo	4	g
Acqua distillata	100	mL

Dissolvere il rosso fenolo in acqua distillata e aggiungere 12,5 mL della soluzione al terreno di base.

### 1.3.10 - Terreno completo al lattosio-gelatina

#### Composizione

Terreno di base al lattosio-gelatina	1000	g
Lattosio	10	g
Soluzione di rosso fenolo	12,5	mL
pH 7,5 ± 0,1		

Sciogliere 1 L di terreno di base al lattosio-gelatina e aggiungere 10 g di lattosio e 12,5 g della soluzione di rosso fenolo. Miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a 121 ± 3°C per 15 minuti. Conservare a 5 ± 3°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

### 1.3.11 - Agar al sangue di cavallo

È possibile utilizzare Columbia agar o qualsiasi altro analogo idoneo terreno di base (agar: 1,5%; sangue di cavallo: 5%).

### 1.3.12 - Brodo Indolo-Nitrato e per la motilità (alternativo)

#### Composizione

Triptone	20	g
Glucosio	1	g
Disodio idrogeno fosfato	2	g
Potassio nitrato	1	g
Agar	1	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2 ± 0,2		

Il terreno può essere usato in alternativa al Terreno al nitrato e per la motilità per la verifica della riduzione dei nitrati a nitriti e della motilità.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Per l'eventuale verifica della motilità aggiungere 2 g di agar ogni litro di terreno.

Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata, distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a 121 ± 3°C per 15 minuti. Conservare a 5 ± 3°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

### 1.3.13 - α-Naftolo allo 0,2%

Il prodotto si trova disponibile in commercio. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione.

### 1.3.14 - Polvere di zinco

### 1.3.15 - Acqua fisiologica tamponata

#### Composizione

Sodio cloruro	8,5	g
Potassio di-idrogeno fosfato	1	g
Dipotassio fosfato	3	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2 ± 0,2		

La soluzione si prepara a partire dai singoli ingredienti. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa soluzione.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a 121 ± 3°C per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a 5 ± 3°C per non più di un mese.

### 1.3.16 - Soluzione di Ringer al 25%

#### Composizione

Triptosio	2,25	g
Potassio cloruro	0,11	g
Calcio cloruro anidro	0,12	g
Sodio bicarbonato	0,05	g
Acqua distillata	1000	mL

La soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti, ma sono anche disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa soluzione.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a 121 ± 3°C per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a 5 ± 3°C per non più di due settimane.

## 1.4 - STRUMENTAZIONI ED APPARECCHIATURE

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione:

- Incubatore termostatico
- Omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" oppure Sonicatore oppure Stomacher
- Agitatore magnetico
- Vortex
- Misuratore di pH con accuratezza di ± 0,1
- Becco Bunsen

- Pipettatrici automatiche in grado di dispensare da 100  $\mu$ L a 1 mL
- Pipette graduate capaci di dispensare da 2 a 10 mL
- Contenitori e buste per omogeneizzatore sterili da 100 mL
- Puntali sterili
- Giare per anaerobiosi provviste di buste oppure incubatore per anaerobiosi

### 1.5 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

Durante il campionamento, operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza. Prelevare campioni di non meno di 100 g di peso umido; portarli in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo in condizioni refrigerate.

Durante il trasporto e lo stoccaggio mantenere refrigerati i campioni a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per un massimo di 96 ore.

Mantenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

### 1.6 - PROCEDURA

#### 1.6.1 - Preparazione del campione

Pesare un sub-campione rappresentativo di 25 g di peso umido (e comunque non meno di 10 g) del campione in un contenitore da 250 mL.

Lo scopo della preparazione del campione è quello di omogeneizzare il prodotto mediante l'utilizzo di un diluente senza danneggiare le forme microbiche presenti e che si vogliono determinare.

Operare in sterilità per evitare contaminazioni esterne che potrebbero invalidare l'analisi.

##### 1.6.1.1 - Preparazione della sospensione primaria

Aggiungere al campione, a temperatura ambiente, una quantità di diluente-acqua fisiologica tamponata o preferibilmente soluzione di Ringer al 25%- pari a 9 volte il peso del diluito per ottenere una sospensione 1 a 10 ( $10^{-1}$ ). Se la quantità di campione disponibile è inferiore a 25 g mantenere comunque il rapporto di diluizione 1:10 (1 parte di campione e 9 di diluente). Solo per prodotti che potrebbero generare un omogeneizzato a viscosità eccessiva per essere manipolato può essere ammessa la preparazione di diluizioni 1 a 20, 1 a 50 o 1 a 100.

##### 1.6.1.2 - Pretrattamento del campione

La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse associati e separazione degli aggregati microbici. Successivamente la sospensione di campione è trattata al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, attivando contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Sottoporre la sospensione primaria del campione, per circa 15 secondi, a omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" con velocità regolabile tra 1000 e 10000 g/min, mantenendo la sospensione in un bagno di ghiaccio. In alternativa, sottoporre a sonicazione per circa 10 secondi oppure agitare, in condizioni di asepsi, per 30 minuti la sospensione su agitatore magnetico o tramite Stomacher.

Prima dell'omogeneizzazione è possibile eventualmente anche aggiungere Tween 80 ad una concentrazione di 0,1% (v/v) od ottimizzare la velocità con prove specifiche per ottenere una idonea omogeneizzazione del campione. Successivamente mantenere il campione per 15 minuti a  $75 \pm 5^\circ\text{C}$  a partire da acqua inizialmente fredda che, con il progressivo riscaldamento, innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

Il tempo intercorrente fra la preparazione dell'omogenato e la semina per il conteggio non deve superare i 45 minuti.

##### 1.6.1.3 - Preparazione delle diluizioni

Utilizzare acqua fisiologica tamponata come diluente a temperature ambiente per tutte le diluizioni.

Per preparare diluizioni decimali trasferire 1 mL di omogenato  $10^{-1}$  in 9 mL di acqua fisiologica tamponata. Miscelare in modo accurato utilizzando un vortex per 5-10 secondi. Questa diluizione rappresenta quella a  $10^{-2}$ .

Con omogenati concentrati 1 a 20, utilizzare due volumi di omogenato ed 8 volumi di diluente per allestire una diluizione  $10^{-2}$ .

Ripetere questa procedura per le successive diluizioni decimali utilizzando nuove pipette/puntali delle pipette per ogni diluizione successiva.

#### 1.6.2 - Filtrazione su membrana

Filtrare un'aliquota della sospensione primaria o di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45  $\mu\text{m}$  (pori simmetrici da 0,45  $\mu\text{m}$  oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2  $\mu\text{m}$ ). Porre la membrana sulla superficie del terreno Triptoso Solfito Cicloserina Agar evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  ore in condizioni anaerobiche.

In alternativa, e preferibilmente, dopo il trasferimento della membrana sul terreno, ricoprire interamente la membrana versando 5-6 mL dello stesso terreno ancora liquido e mantenuto alla temperatura di  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ . Lasciare solidificare ed incubare alla temperatura di  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  ore in condizioni anaerobiche.

Ridurre al minimo il tempo tra l'analisi e l'incubazione in anaerobiosi.

### 1.6.3 - Lettura dei risultati

I microrganismi appartenenti alla specie *C. perfringens*, sul terreno Triptosis Solfito Cicloserina Agar, formano colonie nere o grigio/giallo-marrone che danno colorazione anche debolmente scura sopra o sotto la membrana filtrante. Contare le colonie tipiche e considerarle come *C. perfringens* presuntivo.

### 1.6.4 - Isolamento

Confermare tutte le colonie di *C. perfringens* presuntivo, o un loro numero comunque rappresentativo. Isolare le colonie da confermare in parallelo su due capsule di Agar sangue di cavallo, incubando una capsula contenente il terreno in anaerobiosi e l'altra in aerobiosi, entrambe a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  ore.

Dopo incubazione esaminare il terreno nutritivo per la presenza o assenza di crescita. Le colonie di *C. perfringens* producono tipiche aree di emolisi chiarificate sulla superficie del terreno. Procedere allo svolgimento delle prove di conferma solo per le colonie che, su Agar al sangue di cavallo, crescono in anaerobiosi.

### 1.6.5 - Conferma

In alternativa alle prove biochimiche di seguito descritte, per la conferma dell'appartenenza alla specie *C. perfringens*, le colonie presunte possono essere sottoposte direttamente a saggi di identificazione con i sistemi miniaturizzati disponibili in commercio.

Altrimenti procedere allo svolgimento delle prove per la riduzione dei nitrati a nitriti/motilità e della produzione di acido da lattosio/fluidificazione della gelatina.

Prima di procedere allo svolgimento delle prove di conferma, trasferire la colonia da saggiare, prelevata con un'ansa sterile, sulla superficie di Agar nutritivo al sangue. Incubare a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per 24 ore in anaerobiosi.

Procedere allo svolgimento della prova della catalasi su isolati di non oltre 24 ore.

#### 1.6.5.1 - Prova della riduzione dei nitrati e per la motilità

Immediatamente prima dell'uso, sciogliere, in bagnomaria, il Terreno al nitrato e per la motilità mantenendo l'acqua in ebollizione per circa 10 minuti. Fare raffreddare rapidamente. Inoculare nel terreno, con un ago sterile, la colonia da esaminare ed incubare, in condizioni anaerobiche, a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  ore. Dopo incubazione, verificare la crescita lungo la linea di infissione.

La motilità si evidenzia come crescita diffusa oltre la linea di infissione. *C. perfringens* non è motile.

In volumi uguali miscelare il reagente A e il reagente B per il nitrato immediatamente prima dell'uso e aggiungere 0,2 - 0,5 mL della miscela a ciascun tubo di Terreno al nitrato e per la motilità dopo la crescita della colonia da saggiare. Lo sviluppo di un colore rosso conferma la presenza di nitrito prodotto dalla riduzione del nitrato. Se entro 15 minuti non si rileva la colorazione rossa, aggiungere, con una spatola, una piccola quantità di polvere di zinco ed attendere 10 minuti.

Se si sviluppa un colore rosso, la riduzione del nitrato non ha avuto luogo e la prova è considerata negativa. Se non si sviluppa un colore rosso, dopo l'aggiunta di polvere di zinco, il nitrato è stato completamente convertito ad azoto e la prova è considerata positiva.

#### 1.6.5.2 - Prova della riduzione dei nitrati e per la motilità (alternativo)

Inoculare nel Brodo Indolo-Nitrato e per la motilità (alternativo), con un ago sterile, la colonia da esaminare ed incubare, in condizioni anaerobiche, a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 24$  ore. Dopo incubazione, verificare la crescita lungo la linea di infissione. La motilità si evidenzia come crescita diffusa oltre la linea di infissione. *C. perfringens* non è motile.

Per la verifica della riduzione del nitrato a nitrito aggiungere poche gocce di  $\alpha$ -naftolo a ciascun tubo che presenta crescita. Lo sviluppo di un colore rosa/rosso conferma la presenza di nitrito prodotto dalla riduzione del nitrato. Se entro 15 minuti non si rileva la colorazione rosa/rossa, aggiungere, con una spatola, una piccola quantità di polvere di zinco ed attendere 10 minuti.

Se si sviluppa un colore rosso, la riduzione del nitrato non ha avuto luogo e la prova è considerata negativa. Se non si sviluppa un colore rosso, dopo l'aggiunta di polvere di zinco, il nitrato è stato completamente convertito ad azoto e la prova è considerata positiva.

#### 1.6.5.3 - Prova della produzione di acido da lattosio e fluidificazione della gelatina

Immediatamente prima dell'uso, sciogliere, in bagnomaria, il Terreno al lattosio-gelatina mantenendo l'acqua in ebollizione per circa 10 minuti. Fare raffreddare rapidamente. Inoculare nel terreno, con un ago sterile, la colonia da esaminare ed incubare, in condizioni anaerobiche, a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  ore. Dopo incubazione, verificare lo sviluppo di una colorazione gialla per la produzione di acido dal lattosio. Raffreddare i tubi per  $1 \div 2$  ore a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  e verificare la fluidificazione della gelatina. Dopo un'ora, verificare se il terreno ha solidificato; in caso negativo, mantenere i tubi a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per un'altra ora.

Dopo solidificazione, l'evidenza di terreno semiliquido fornisce una reazione positiva per l'idrolisi della gelatina. Se il terreno rimane solidificato re-incubare a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per altre  $21 \pm 3$  ore e ripetere la verifica.

### 1.6.6 - Determinazione del contenuto di peso secco

Il numero di spore di *C. perfringens* può essere calcolato in relazione al peso umido o al peso secco. Per determinare quest'ultimo, preferibilmente fare riferimento al metodo riportato in UNI EN 12880:2002 (2002) ed eseguire la determinazione in parallelo con le analisi microbiologiche.

### 1.7 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le colonie cresciute entro le 24 ore sul terreno Triptosio Solfito Cicloserina Agar, di colore nero o grigio/giallo-marrone che danno colorazione scura sia sopra sia sotto la membrana, non motili, che riducono i nitrati a nitriti, producono acido da lattosio e liquefano la gelatina in 48 ore, o che l'identificazione biochimica ha dimostrato appartenere alla specie, sono da considerare *C. perfringens* confermati.

### 1.8 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Riportare il numero di spore di *C. perfringens* come UFC/g di campione (peso umido), calcolando il numero di microrganismi sulla base della seguente formula:

$$C = \frac{A \cdot N}{B \cdot P \cdot F}$$

dove:

C (UFC/g) = numero di colonie confermate per g;  
 A = numero di colonie confermate;  
 B = numero di colonie sottoposte a conferma;  
 N = numero di colonie caratteristiche contate;  
 P = peso di campione analizzato (g);  
 F = eventuale fattore di diluizione ( $V_f/V_i$ ).

Qualora la concentrazione sia da esprimere in riferimento al peso secco, calcolare sulla base di quanto indicato in UNI EN 12880:2002 (2002).

#### Esempio di calcolo

30 = numero di colonie confermate;  
 40 = numero di colonie sottoposte a conferma;  
 60 = numero di colonie caratteristiche contate;  
 25 g = peso di campione analizzato;  
 $10^{-1}$  = fattore di diluizione.

$$\text{UFC/g} = \frac{30 \cdot 60}{40 \cdot 25 \cdot 10^{-1}} = 18$$

## METODO 2

### Determinazione per inclusione in terreno agarizzato

#### 2.1 - CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura analitica descritta può essere utilizzata per il rilevamento delle spore di *C. perfringens* in campioni di fanghi di risulta, suoli, anche concimati, compost, sedimenti e matrici ambientali analoghe.

#### 2.2 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa sul conteggio diretto delle colonie utilizzando la tecnica dell'inclusione in agar e consente di calcolare la concentrazione di spore di *C. perfringens* presenti in un volume noto di campione.

La procedura consiste in una serie di fasi successive così suddivise:

- preparazione della sospensione del campione;
- pre-trattamento del campione;
- insemminazione del campione con la tecnica dell'inclusione in terreno colturale agarizzato ed incubazione;
- conteggio delle colonie presunte ed identificazione;
- eventuale conferma biochimica dell'identità delle colonie.

#### 2.3 - REAGENTI, DILUENTI E TERRENI CULTURALI

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni culturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

##### 2.3.1. – Agar al Solfito Polimixina Sulfodiazina (SPS)

**Composizione**

Sodio solfito	0,5	g
Polimixina Solfato	0,01	g
Sulfodiazina	0,12	g
Triptone o peptone	15	g
Estratto di lievito	10	g
Ferro citrato	0,5	g
Sodio tioglicollato	0,1	g
Sorbitano monooleato	0,05	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0 ± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni. Sterilizzare a  $118 \pm 3^\circ\text{C}$  per  $15 \pm 1$  minuti. Conservare a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per non più di un mese in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *C. perfringens* NCTC 8237 e come controllo negativo *E. coli* NCTC 9001; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

**2.3.2 - Olio di vaselina sterile**

Sterilizzare in autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per  $15 \pm 1$  minuti. Conservare a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per non più di un mese in condizioni ottimali.

**2.3.3 - Sangue defibrinato di coniglio**

Il sangue defibrinato di coniglio è reperibile in commercio e si può conservare per circa una settimana a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  in condizioni ottimali.

**2.3.4 - Agar nutritivo al sangue di coniglio**
**Composizione**

Peptone	5	g
Estratto di carne	3	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8 ± 0,2		

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni e sterilizzare a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per  $15 \pm 1$  minuti.

Dopo sterilizzazione, preparare, con le comuni regole di asepsi, alcune piastre di terreno senza aggiunta di sangue; in altre piastre, in condizioni di asepsi, trasferire 0,5 mL di sangue defibrinato di coniglio e aggiungere circa 12-13 mL di agar nutritivo preventivamente sciolto e portato a  $50-60^\circ\text{C}$  in bagno termostato. Miscelare e lasciar solidificare a temperatura ambiente.

Il terreno colturale al sangue ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di conservarlo a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per non oltre una settimana, o meglio prepararlo al momento dell'uso. Scartare eventuali piastre che presentino contaminazione.

In alternativa all'Agar nutritivo al sangue di coniglio, può essere utilizzato Agar Columbia con 5% di sangue di montone.

**2.3.5 - Agar Columbia con 5% di sangue di montone (alternativo)**
**Composizione**

Bio-polyptone	10	g
Idrolizzato di proteine animali e vegetali	10	g
Biomiotone	3	g
Amido di mais	1	g
Sodio cloruro	5	g
Sangue di montone	50	mL
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3 ± 0,2		

Il terreno si trova in commercio già pronto per l'uso e preparato in piastre Petri. Ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di comprarne piccoli lotti.

In alternativa all'Agar Columbia con 5% di sangue di montone, può essere utilizzato Agar nutritivo al sangue di coniglio.

È necessario tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di selettività, produttività, ecc.

**2.3.6 — Acqua fisiologica tamponata**
**Composizione**

Sodio cloruro	8,5	g
Potassio di-idrogeno fosfato	1	g
Dipotassio fosfato	3	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2 ± 0,2		

La soluzione si prepara a partire dai singoli ingredienti. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa soluzione.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per  $15 \pm 1$  minuti. Conservare la soluzione a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per non più di un mese.

### 2.3.7 - Soluzione di Ringer al 25%

#### Composizione

Triptosio	2,25	g
Potassio cloruro	0,11	g
Calcio cloruro anidro	0,12	g
Sodio bicarbonato	0,05	g
Acqua distillata	1000	mL

La soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti, ma sono anche disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa soluzione.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per  $15 \pm 1$  minuti. Conservare la soluzione a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per non più di due settimane.

### 2.4 - STRUMENTAZIONI ED APPARECCHIATURE

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi è necessario avere a disposizione:

- Incubatore termostatico
- Omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" oppure Sonicatore oppure Stomacher
- Agitatore magnetico
- Vortex
- Misuratore di pH con accuratezza di  $\pm 0,1$
- Becco Bunsen
- Pipettrici automatiche in grado di dispensare da 100  $\mu\text{L}$  a 1 mL
- Pipette graduate capaci di dispensare da 2 a 10 mL
- Contenitori e buste per omogeneizzatore sterili da 100 mL
- Puntali sterili
- Giare per anaerobiosi provviste di buste oppure incubatore per anaerobiosi

### 2.5 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

Durante il campionamento, operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza. Prelevare campioni di non meno di 100 g di peso umido; portarli in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo in condizioni refrigerate.

Durante il trasporto e lo stoccaggio mantenere refrigerati i campioni a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per un massimo di 96 ore.

Mantenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

### 2.6 - PROCEDURA

#### 2.6.1 - Preparazione del campione

Pesare un sub-campione rappresentativo di 25 g in peso umido (e comunque non meno di 10 g) del campione in un contenitore da 250 mL.

Lo scopo della preparazione del campione è quello di omogeneizzare il prodotto mediante l'utilizzo di un diluente senza danneggiare le forme microbiche presenti e che si vogliono determinare. Operare in sterilità per evitare contaminazioni esterne che potrebbero invalidare l'analisi.

##### 2.6.1.1 - Preparazione della sospensione primaria

Aggiungere al campione, a temperatura ambiente, una quantità di diluente-acqua fisiologica tamponata o preferibilmente la soluzione di Ringer al 25%- pari a 9 volte il peso del diluito per ottenere una sospensione 1 a 10 ( $10^{-1}$ ). Se la quantità di campione disponibile è inferiore a 25 g mantenere comunque il rapporto di diluizione 1:10 (1 parte di campione e 9 di diluente). Solo per prodotti che potrebbero generare un omogeneizzato a viscosità eccessiva per essere manipolato, può essere ammessa la preparazione di diluizioni 1 a 20, 1 a 50 o 1 a 100.

##### 2.6.1.2 - Pretrattamento del campione

La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse associati e separazione degli aggregati microbici. Successivamente la sospensione di campione è trattata al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, attivando contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Sottoporre la sospensione primaria del campione, per circa 15 secondi, a omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" con velocità regolabile tra 1000 e 10000 g/min, mantenendo la sospensione in un bagno di ghiaccio. In alternativa, sottoporre a sonicazione per circa 10 secondi oppure agitare, in condizioni di asepsi, per 30 minuti la sospensione su agitatore magnetico o tramite Stomacher.

Prima dell'omogeneizzazione è possibile eventualmente anche aggiungere Tween 80 ad una concentrazione di 0,1% (v/v) od ottimizzare la velocità con prove specifiche per ottenere una idonea omogeneizzazione del campione.

Successivamente mantenere il campione per 15 minuti a  $75 \pm 5^\circ\text{C}$  a partire da acqua inizialmente fredda che, con il progressivo riscaldamento, innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

Il tempo intercorrente fra la preparazione dell'omogenato e la semina per il conteggio non deve superare i 45 minuti.

### 2.6.1.3 – Preparazione delle diluizioni

Utilizzare acqua fisiologica tamponata come diluente a temperatura ambiente per tutte le diluizioni.

Per preparare diluizioni decimali trasferire 1 mL di omogenato  $10^{-1}$  in 9 mL di acqua fisiologica tamponata. Miscelare in modo accurato utilizzando un vortex per 5-10 secondi. Questa diluizione rappresenta quella a  $10^{-2}$ .

Con omogenati concentrati 1 a 20, utilizzare due volumi di omogenato ed 8 volumi di diluente per allestire una diluizione  $10^{-2}$ .

Ripetere questa procedura per le successive diluizioni decimali utilizzando nuove pipette/puntali delle pipette per ogni diluizione successiva.

### 2.6.2 - Inseminazione per inclusione ed incubazione

In funzione della qualità del campione da esaminare, inoculare almeno due aliquote del campione, diluito o tal quale, in doppio per ciascuna aliquota, in tubi contenenti il terreno di isolamento Agar al Solfito Polimixina Sulfadiazina (SPS).

Effettuare l'inoculo nei tubi con il terreno disciolto e mantenuto tale alla temperatura di circa  $45^\circ\text{C}$ , avendo cura di distribuire bene il campione nel terreno ed evitando la formazione di bolle d'aria. Lasciare raffreddare ed aggiungere in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina per assicurare condizioni di anaerobiosi. In alternativa, porre i tubi in giara o in incubatore per anaerobiosi. Incubare a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 24$  ore.

### 2.6.3 - Identificazione e conteggio delle colonie

Escludere i tubi che presentano colonie invasive o patine batteriche che schermano la crescita nella massa del terreno. Prendere in considerazione i tubi in cui le colonie sono ben leggibili e separate. Annotare i conteggi relativi a due diluizioni successive contando le colonie nere, circondate da un alone nerastro, di dimensioni 0,3-0,5 mm di diametro, cresciute nello spessore dell'agar.

### 2.6.4 – Conferma

In alternativa alle prove biochimiche descritte nel Metodo 1, per la conferma dell'appartenenza alla specie *C. perfringens*, le colonie sospette possono essere sottoposte direttamente a saggi di identificazione con i sistemi miniaturizzati disponibili in commercio.

Altrimenti, procedere allo svolgimento delle prove per la riduzione dei nitrati a nitriti/motilità e della produzione di acido da lattosio/fluidificazione della gelatina, secondo quanto descritto nel Metodo 1.

Prima di procedere allo svolgimento delle prove di conferma, trasferire la colonia da saggiare, prelevata con un'ansa sterile, sulla superficie di due piastre contenenti Agar nutritivo al sangue.

Incubare una piastra a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per 24 ore, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi.

I microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* cresceranno unicamente sul terreno incubato in condizioni anaerobiche. Procedere allo svolgimento della prova della catalasi.

### 2.6.5 - Determinazione del contenuto di peso secco

Il numero di spore di *C. perfringens* può essere calcolato in relazione al peso umido o al peso secco.

Per determinare quest'ultimo, preferibilmente fare riferimento al metodo riportato in UNI EN 12880:2002 (2002) ed eseguire la determinazione in parallelo con le analisi microbiologiche.

## 2.7 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Riportare il numero di spore di *C. perfringens* come UFC/g di sedimento (peso umido) o mL di campione esaminato, calcolando il numero di microrganismi sulla base della seguente formula:

$$N = \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{V(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

dove:

$\sum C_i$  = somma delle colonie nei tubi considerati;

V = volume in mL dell'inoculo seminato in ogni tubo (in genere 1 mL);

$n_1$  = numero dei tubi considerati per la prima diluizione;

$n_2$  = numero dei tubi considerati per la seconda diluizione;

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione.

Arrotondare il risultato per eccesso o per difetto alle prime due cifre significative e, se uguale o superiore a 100, riportare il risultato come:

$$1,0 \div 9,9 \times 10^n \text{ UFC/g o mL}$$

dove:

UFC = Unità Formanti Colonia;

$10^n$  = inverso del fattore di diluizione.

Qualora la concentrazione sia da esprimere in riferimento al peso secco, calcolare sulla base di quanto indicato in UNI EN 12880:2002 (2002).

### Esempio di calcolo

n° colonie totali  
 colonie 1° tubo = 20  
 colonie 2° tubo = 50  
 colonie 3° tubo = 3  
 colonie 4° tubo = 2  
 Volume (mL) = 1  
 n<sub>1</sub> tubi = 2  
 n<sub>2</sub> tubi = 2  
 10<sup>-1</sup> = fattore di diluizione

$$\text{UFC/g} = \frac{75}{1 \cdot (2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 0,1} = 3,4 \cdot 10^2$$

## METODO 3

### Determinazione semiquantitativa con tecnica della conta del numero più probabile (MPN) in presenza di MUP

#### 3.1 - CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura analitica descritta può essere utilizzata per il rilevamento delle spore di *C. perfringens* in campioni di fanghi di risulta, suoli, anche concimati, compost, sedimenti e matrici ambientali analoghe.

#### 3.2 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa sulla capacità di *C. perfringens* di metabolizzare il 4-metilumbelliferilfosfato (MUP) usando l'enzima acido fosfatasi per produrre 4-metilumbelliferone, che fluoresce, se posto sotto alla luce ultravioletta, alla lunghezza d'onda di 366-nm. Campioni omogeneizzati e diluiti sono inoculati in un brodo selettivo e incubati a 43 ± 1°C per 22 ± 2 ore. La presenza del batterio è evidenziata da fluorescenza sotto la luce ultravioletta.

### 3.3 - REAGENTI, DILUENTI E TERRENI COLTURALI

#### 3.3.1 - Acqua fisiologica tamponata

##### Composizione

Sodio cloruro	8,5	g
Potassio di-idrogeno fosfato	1	g
Dipotassio fosfato	3	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2 ± 0,2		

La soluzione si prepara a partire dai singoli ingredienti. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa soluzione.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a 121 ± 3°C per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a 5 ± 3°C per non più di un mese.

#### 3.3.2 - Soluzione di Ringer al 25%

##### Composizione

Triptoso	2,25	g
Potassio cloruro	0,11	g
Calcio cloruro anidro	0,12	g
Sodio bicarbonato	0,05	g
Acqua distillata	1000	mL

La soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti, ma sono anche disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa soluzione.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a 121 ± 3°C per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a 5 ± 3°C per non più di due settimane.

#### 3.3.3 - Soluzione di metilumbelliferilfosfato (MUP)

##### Composizione

Sale bisodico del 100	100	mg
4-metilumbelliferilfosfato (MUP C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P)		
Acqua distillata	5	mL

Il supplemento si trova in commercio in fiale. Nella preparazione, seguire le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere il MUP all'acqua distillata e sterilizzare filtrando con una membrana di porosità nominale 0,2 µm.

#### 3.3.4 - D-cicloserina

##### Composizione

D-cicloserina	200	mg
Acqua distillata	5	mL

La D-Cicloserina si trova in commercio già pronta. Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi il contenuto di una fiala di D-Cicloserina con 5 mL di acqua distillata sterile ed addizionarlo al terreno di base.

### 3.3.5 - Brodo cicloserina triptosio solfato modificato (mTSCB)

#### Composizione

Triptosio	15	g
Estratto di carne	5	g
Peptone di soia	10	g
Estratto di lievito	5	g
Sodio acetato	5	g
L-cisteina idrocloridrato	2	g
Acqua distillata	1000	mL
pH $7,2 \pm 0,2$		

Aggiungere i reagenti ad 1 L di acqua e scaldare fino ad ebollizione. Sterilizzare in autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per  $15 \pm 1$  minuti. Raffreddare alla temperatura di  $50^\circ\text{C}$  e aggiungere 200 mg di D-cicloserina. Miscelare con il vortex ed aggiungere 50 mg di MUP. Distribuire sterilmente in tubi 9 mL di brodo con supplementi.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *C. perfringens* NCTC 10240 e come controllo negativo *E. coli* NCTC 9001; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

### 3.4 - STRUMENTAZIONI ED APPARECCHIATURE

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione:

- Incubatore termostatico
- Omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" oppure sonicatore oppure stomacher
- Agitatore magnetico
- Vortex
- Misuratore di pH con accuratezza di  $\pm 0,1$
- Becco Bunsen
- Pipettatrici automatiche in grado di dispensare da 100  $\mu\text{L}$  a 1 mL
- Pipette graduate capaci di dispensare da 2 a 10 mL
- Contenitori e buste per omogeneizzatore sterili da 100 mL
- Puntali sterili
- Giare per anaerobiosi provviste di buste oppure incubatore per anaerobiosi
- Lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm. Nell'utilizzo, seguire le norme di sicurezza.

### 3.5 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

Durante il campionamento, operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza.

Prelevare campioni di non meno di 100 g di peso umido; portarli in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo in condizioni refrigerate.

Durante il trasporto e lo stoccaggio mantenere refrigerati i campioni a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  per un massimo di 96 ore.

Mantenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

### 3.6 - PROCEDURA

#### 3.6.1 - Preparazione del campione

Pesare un sub-campione rappresentativo di 25 g di peso umido (e comunque non meno di 10 g) del campione in un contenitore da 250 mL.

Lo scopo della preparazione del campione è quello di omogeneizzare il prodotto mediante l'utilizzo di un diluente senza danneggiare le forme microbiche presenti e che si vogliono determinare. Operare in sterilità per evitare contaminazioni esterne che potrebbero invalidare l'analisi.

##### 3.6.1.1 - Preparazione della sospensione primaria

Aggiungere al campione, a temperatura ambiente, una quantità di diluente-acqua fisiologica tamponata o preferibilmente la soluzione di Ringer al 25%- pari a 9 volte il peso del diluito per ottenere una sospensione 1 a 10 ( $10^{-1}$ ). Se la quantità di campione disponibile è inferiore a 25 g mantenere comunque il rapporto di diluizione 1:10 (1 parte di campione e 9 di diluente). Solo per prodotti che potrebbero generare un omogeneizzato a viscosità eccessiva per essere manipolato, può essere ammessa la preparazione di diluizioni 1 a 20, 1 a 50 o 1 a 100.

##### 3.6.1.2 - Pretrattamento del campione

La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse associati e separazione degli aggregati microbici. Successivamente la sospensione di campione è trattata al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, attivando contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Sottoporre la sospensione primaria del campione, per circa 15 secondi, a omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" con velocità regolabile tra 1000 e 10000 g/min, mantenendo la sospensione in un bagno di ghiaccio. In alternativa, sottoporre a sonicazione per circa 10 secondi oppure agitare, in condizioni di asepsi, per 30 minuti la sospensione su agitatore magnetico o tramite Stomacher.

Prima dell'omogeneizzazione è possibile eventualmente anche aggiungere Tween 80 ad una concentrazione di 0,1% (v/v) od ottimizzare la velocità con prove specifiche per ottenere una idonea omogeneizzazione del campione. Successivamente mantenere il campione per 15 minuti a  $75 \pm 5^\circ\text{C}$  a partire da acqua inizialmente fredda che, con il progressivo riscaldamento, innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

Il tempo intercorrente fra la preparazione dell'omogenato e la semina per il conteggio non deve superare i 45 minuti.

### 3.6.1.3 - Preparazione delle diluizioni

Utilizzare acqua fisiologica tamponata come diluente a temperature ambiente per tutte le diluizioni.

Per preparare diluizioni decimali trasferire 1 mL di omogenato  $10^{-1}$  in 9 mL di acqua fisiologica tamponata. Miscelare in modo accurato utilizzando un vortex per 5-10 secondi. Questa diluizione rappresenta quella a  $10^{-2}$ .

Con omogenati concentrati 1 a 20, utilizzare due volumi di omogenato ed 8 volumi di diluente per allistire una diluizione  $10^{-2}$ .

Ripetere questa procedura per le successive diluizioni decimali utilizzando nuove pipette/puntali delle pipette per ogni diluizione successiva.

### 3.6.2 - Inoculo in brodo nei tubi

Pipettare 1 mL di campione in 9 mL del brodo alla cicloserina triptosio solfato modificato (mTSCB). Per ogni diluizione eseguire tre repliche. Per scopi di riproducibilità eseguire ogni analisi in doppio. Per ogni analisi eseguire controlli colturali.

### 3.6.3 - Rivitalizzazione e conta delle colonie su un terreno selettivo agarizzato

Porre i tubi in giara per anaerobiosi o in un incubatore per anaerobiosi o coprire con uno strato sterile di olio minerale. Incubare alla temperatura di  $43 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $22 \pm 2$  ore. Se i tubi si presentano negativi dopo l'incubazione iniziale, reincubare per  $44 \pm 2$  ore. Una fluorescenza blu alla luce ultravioletta nel brodo indica una reazione positiva.

### 3.6.4 - Conferma

Il brodo alla cicloserina triptosio solfato modificato fornisce risultati confermati per la presenza del MUP.

Qualora fosse necessario ottenere risultati con l'esplicita identificazione della specie, sottoporre i ceppi direttamente a saggi di identificazione con i sistemi miniaturizzati disponibili in commercio.

### 3.6.5 - Determinazione del contenuto di peso secco

Il numero di spore di *C. perfringens* può essere calcolato in relazione al peso umido o al peso secco. Per determinare quest'ultimo, preferibilmente fare riferimento al metodo riportato in UNI EN 12880:2002 (2002) ed eseguire la determinazione in parallelo con le analisi microbiologiche.

## 3.7 - ESPRESSIONI E RISULTATI

*C. perfringens* è presente nel campione esaminato se i tubi di brodo alla cicloserina triptosio solfato modificato sottoposti a luce ultravioletta risultano fluorescenti. Per ogni diluizione annotare il numero di tubi positivi (fluorescenti).

Identificare il numero caratteristico (NC) corrispondente al numero di tubi positivi delle tre ultime diluizioni, che danno un numero  $> 0$ .

Sulla base della tabella di De Man (Tab. 3.1), calcolare il valore MPN che corrisponde al numero caratteristico ottenuto. Il risultato equivale al numero MPN per mL della sospensione primaria preparata.

Per calcolare il numero di spore nel campione originale (peso umido) è necessario tenere in considerazione il fattore di diluizione.

### Esempio di calcolo

**NC = 3/1/0**

Valore corrispondente MPN/mL = 4,3

Diluizione corrispondente utilizzata =  $10^{-3}$

$\text{MPN/g} = (4,3/10^{-3}) \cdot 250\text{mL}/25\text{g} = 43000/\text{g}$  di peso umido

Per calcolare il valore relativo al peso secco, utilizzare la formula:

$$N_d = N_w \cdot \frac{100}{e}$$

dove:

$N_d$  = conteggio in MPN per grammo di peso secco;  
 $N_w$  = conteggio in MPN di *Clostridium perfringens*/g di peso umido;  
 $e$  = % di massa secca del campione originale umido.

Tab. 3.1 - Indice MPN e limite di confidenza al 95% per varie combinazioni di risultati positivi quando serie di 3 tubi vengono inoculati con diluizioni scalari di campione

Numero caratteristico (NC)	INDICE MPN/100mL	LIMITI DICONFIDENZA AL 95%	
		inferiore	superiore
000	< 0,30	0,00	0,94
001	0,30	0,01	0,95
010	0,30	0,01	1,00
011	0,61	0,12	1,70
020	0,62	0,12	1,70
030	0,94	0,35	3,5
100	0,36	0,02	1,70
101	0,72	0,12	1,70
102	1,1	0,4	3,5
110	0,71	0,13	2,0
111	1,1	0,4	3,5
120	1,1	0,4	3,5
121	1,5	0,5	3,8
130	1,6	0,5	3,8
200	0,93	0,15	3,5
201	1,4	0,4	3,5
202	2,0	0,5	3,8
210	1,5	0,4	3,8
211	2,0	0,5	3,8
212	2,7	0,9	9,4
220	2,1	0,5	4,0
221	2,8	0,9	9,4
222	3,5	0,9	9,4
230	2,9	0,9	9,4
231	3,6	0,9	9,4
300	2,3	0,5	9,4
301	3,9	0,9	10,4
302	6,4	1,6	18,1
310	4,3	0,9	18,1
311	7,5	1,7	19,9
312	12,0	3,0	36,0
313	16,0	3,0	38,0
320	9,3	1,8	36,0
321	15,0	3,0	39,0
322	21,0	3,0	40,0
323	29,0	9,0	99,0
330	24,0	4,0	99,0
331	46,0	9,0	198
332	110	20	400
333	>110		

## BIBLIOGRAFIA

ADCOCK A.W., SAINT C.P. (2001): "Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using Chromogenic and Fluorogenic substrates", *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(9), 4382-4384.

BONADONNA L. (2001): "Analisi di spore di clostridi solfito-riduttori". In: Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – Servizio Difesa Mare. Lo Studio Editoriale srl (ed.), Roma.

BONADONNA L., BRIANCESCO R., MARINI R. (2002): "*Clostridium perfringens* come indicatore di contaminazione ambientale e suo significato

sanitario." Rapporti ISTISAN 02/8, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 39 pp.

DAVIES C.M., LONG J.A., DONALD M., ASHBOLT N.J. (1995): "Survival of fecal microorganisms in aquatic sediments of Sydney, Australia", *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1888-1896.

KONEMAN E.W., ALLEN S.D., DOWELL V.R. JR., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER P.C., WINN W.C. JR. (1995): Testo atlante di microbiologia diagnostica. II. Ed. Delfino Editore, Roma.

UNI EN 12880:2002. Caratterizzazione dei fanghi - Determinazione del residuo secco e dell'umidità.

## DETERMINAZIONE DI TOSSINE ALGALI (MICROCISTINE E NODULARINA) NELLE ACQUE SUPERFICIALI

a cura di Guzzella L.\*, Ghislanzoni L.\*, Pozzoni F.\*, Cerasino L.\*\* e Salmaso N.\*\*

\*CNR-IRSA, Brughiero (MB)

\*\*Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario di San Michele all'Adige, S. Michele all'Adige (TN)

### RIASSUNTO

Viene proposto un metodo analitico per la determinazione dei principali congeneri delle microcistine (MCs) e della nodularina (NOD) presenti in campioni di acqua sia in fase disciolta (extracellulare) che all'interno delle cellule algali (endocellulare). Le due frazioni, extra ed endocellulare, vengono separate mediante filtrazione del campione acquoso. Le microcistine citoplasmatiche vengono estratte, previa procedura di congelamento-scongelo della componente cellulare, con solvente organico in bagno ad ultrasuoni. Le tossine algali presenti nel campione in forma disciolta vengono invece concentrate mediante SPE (Solid-Phase Extraction) su fase C<sub>18</sub>. Entrambi gli estratti possono essere analizzati in HPLC-DAD, LC-MS o con il saggio ELISA.

### INTRODUZIONE

Nei laghi di tutto il mondo ed anche in bacini artificiali d'acqua dolce utilizzati per scopo potabile negli ultimi anni sono aumentati i casi di fioriture algali; queste fioriture sono spesso dovute alle cianofite. Lo sviluppo sempre più abbondante delle fioriture di cianofite è diventato negli ultimi decenni un problema ambientale molto serio, in quanto molte specie sono in grado di produrre come metaboliti secondari una grande varietà di cianotossine, molto tossiche per l'uomo e per gli organismi acquatici. In genere, la tossicità delle fioriture di cianobatteri è dovuta alla presenza contemporanea di diverse tossine, la cui percentuale relativa e distribuzione spaziale può subire variazioni, determinando differenze di tossicità della fioritura (An & Carmichael, 1994). Il numero di tossine finora identificate è in continuo aumento, come anche la consapevolezza che la loro produzione è una caratteristica comune a molte fioriture di cianofite (Tomaselli, 2000).

Le cianotossine vengono classificate in base alla loro struttura chimica.

Al gruppo degli eptapeptidi ciclici appartengono le più diffuse e comuni tossine, le microcistine (MC), mentre la nodularina (NOD) è un pentapeptide ciclico. Entrambe hanno azione epatotossica. Le principali specie di cianobatteri produttori di tossine epatotossiche appartengono ai generi *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* e *Nostoc* (Tab. 1).

Le microcistine (Fig. 1) sono eptapeptidi monociclici con peso molecolare (PM) che può variare da 500 a 4000 Da, anche se la maggior parte delle MC ha peso molecolare compreso tra 900 e 1100 Da.

La struttura generale delle MC è costituita da tre D-amminoacidi (D-alanina, D-eritro- $\beta$ -metilaspargato e D-glutamato), dalla N-metildeidro-alanina, dall'Adda, un amminoacido aromatico caratteristico dei cianobatteri, e da due L-amminoacidi variabili (X e Z in figura 1), la cui natura identifica i diversi congeneri conosciuti, attualmente circa 80 (Sivonen & Jones, 1999; McElhiney & Lawton, 2005) e ne determina la nomenclatura. I più comuni sostituenti X sono leucina (L) e arginina (R), mentre i sostituenti Z sono arginina (R), alanina (A) e metionina (M) (Charmichael *et al.*, 1988). Le diverse microcistine si identificano proprio attraverso un suffisso che indica i due L-amminoacidi presenti: ad esempio MC-LR, MC-RR, MC-YR. Inoltre, piccole alterazioni nella struttura di altri amminoacidi, incluso l'Adda (es. demetilazioni ed esterificazioni o presenza di isomeri geometrici), danno luogo ad un numero elevato di altri congeneri. I vari congeneri possono avere effetti tossici molto diversi tra loro. L'amminoacido Adda è essenziale per la caratteristica attività biologica delle tossine, poiché la tossicità scompare completamente, se si effettua l'ozonolisi di tale gruppo, mentre gli isomeri geometrici dell'Adda non presentano attività biologica: in generale, quasi tutte le modificazioni a carico dell'Adda generano composti non o molto poco tossici (Harada *et al.*, 2004; van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Le microcistine agiscono come agenti inibitori degli enzimi serina-treonina proteinfosfatasi 1, 2A e 3, presenti in tutti gli organismi viventi. I danni istologici acuti sull'uomo riguardano il fegato, organo bersaglio principale, i polmoni e i reni. Per quanto riguarda l'effetto delle microcistine sugli organismi acquatici, uno studio dell'Università di Zurigo sullo zooplancton ha evidenziato come specie non adattate alle tossine dei cianobatteri (*Thamnocephalus*, *Eudiaptomus*, ecc.) siano molto suscettibili in termini di sopravvivenza alla loro presenza (Kurmayer & Juttner, 1999); inoltre, è stato dimostrato che i consumatori primari, in particolare *Daphnia parvula*, se nutriti con cianobatteri tossici, sono in grado di accumulare microcistine ad un livello di 1,78  $\mu\text{g}$  di tossina/25 daphnidi (Mohamed, 1999) e sono quindi in grado di trasferirle ai livelli superiori della catena alimentare.



Inoltre, i cianobatteri tossici determinano un alto rischio di contaminazione anche nei molluschi, qualora si presentino fioriture imponenti: mitili (es. *Mytilus galloprovincialis*) nutriti per 4 giorni con cianobatteri tossici e poi posti in acqua non contaminata, mostrano un livello massimo di microcistine di 10,7 µg/g di peso secco su mitili durante il periodo di accumulo, fino a raggiungere i 16 µg/g il secondo giorno del periodo di depurazione (Vasconcelos & Amorim, 1999), picco probabilmente dovuto alla reingestione di feci contaminate. Evidenze di bioaccumulo nei molluschi d'acqua dolce (*Unio duoglasiae* e *Anodonta woodiana*) sono state riscontrate anche in alcuni laghi giapponesi (Watanabe et al., 1997).

Anche la fauna ittica evidenzia effetti tossici dovuti all'esposizione a microcistine con fenomeni di avvelenamento, similmente ai vertebrati terrestri, in presenza di concentrazioni di microcistine superiori alla DL<sub>50</sub> del topo.

E' stato dimostrato in uno studio americano di Zimba et al. (2001) che queste tossine sono responsabili di numerose morie di pesci gatto (*Ictalurus punctatus*) che si verificano nei laghetti dedicati all'acquacoltura in Mississippi, Alabama, Arkansas e Louisiana: i pesci esposti a fioriture di *Microcystis aeruginosa* morivano entro 24 ore e le loro autopsie rivelavano fegato e milza danneggiati e ricchi di microcistine. La nodularina-R (Fig. 2) differisce dalle microcistine, perché costituita da soli cinque amminoacidi a formare una struttura monociclica. La nodularina possiede le medesime caratteristiche di tossicità delle microcistine, essendo un potente inibitore delle fosfatasi e avendo valori di IC<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub> simili a quelli delle microcistine.

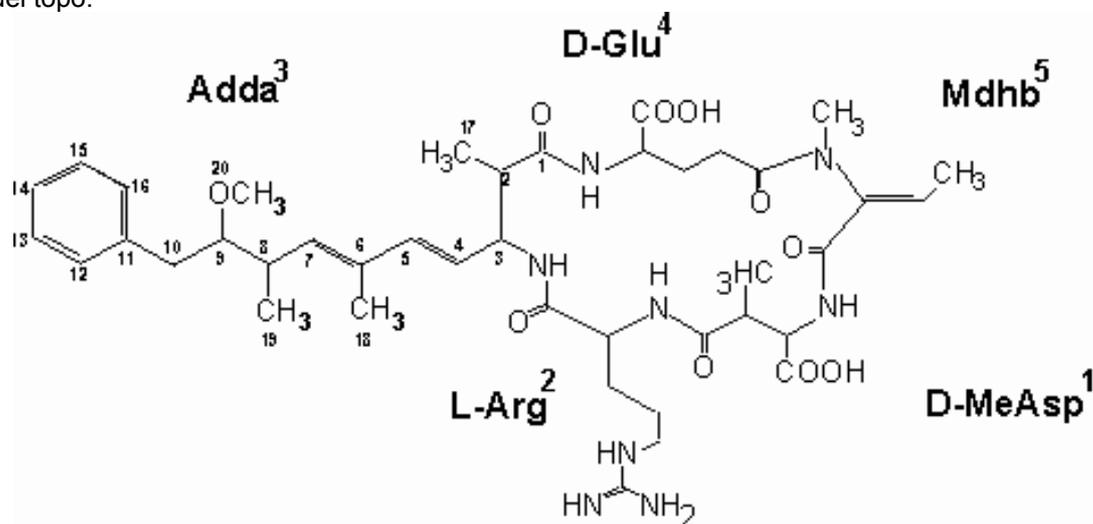


Fig. 2 - Struttura chimica della nodularina-R

## 1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è stato utilizzato per la determinazione qualitativa e quantitativa delle microcistine e della nodularina-R presenti in acque superficiali mediante estrazione, concentrazione e successiva analisi in HPLC-DAD, HPLC-MS e con saggio ELISA. Al fine di determinare separatamente le tossine presenti nella fase disciolta da quelle endocellulari (presenti all'interno della cellula algale), quest'ultima frazione è stata separata per filtrazione ed estratta con solvente in bagno di ultrasuoni, previa procedura di congelamento-scongelo per favorire la lisi cellulare.

La procedura proposta si è rivelata più efficiente nella quantificazione delle tossine endocellulari rispetto a quella di congelamento/scongelo del campione in toto non filtrato.

Il pretrattamento di filtrazione del campione permette, una volta separata la frazione di cellule algali, l'estrazione delle tossine disciolte in acqua con metodica SPE, anche a partire da elevati volumi d'acqua in presenza di fioriture algali.

Per verificare i recuperi del metodo proposto, sono state effettuate prove di recupero mediante aggiunta delle tossine indagate nella fase disciolta ed estrazione in SPE.

Non è stato possibile condurre prove di recupero per l'estrazione della componente endocellulare, per la quale sono state confrontate differenti metodiche di estrazione con verifica di ripetibilità per quella più efficiente.

La tecnica analitica separativa più comunemente utilizzata per la quantificazione delle microcistine e della nodularina è quella in HPLC a fase inversa. Le tossine sono separate tra loro e da eventuali composti interferenti, utilizzando generalmente colonne C-18 o C-8. La rivelazione è condotta con il DAD in assorbimento UV a 238 nm o in alternativa in spettrometria di massa con rivelatore a triplo quadrupolo in modalità MS/MS MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Un altro metodo di analisi è quello immunoenzimatico (ELISA) che utilizza anticorpi policlonali immobilizzati sulle pareti di un sistema test (piastra) che possono legare sia le microcistine libere presenti nel campione sia le microcistine legate con un enzima coniugato. Il saggio è definito "competitivo" in quanto il numero di siti attivi liberi presenti sugli anticorpi è limitato e gli analiti nel campione dovranno competere con il coniugato enzima-microcistina per legarsi all'anticorpo, formando dei complessi che vengono rilevati per via colorimetrica. Ad una bassa concentrazione di microcistine libere nel campione corrisponde una intensità di colore maggiore e viceversa.

## 2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Per l'analisi in HPLC-DAD, il limite di quantificazione (LOQ) dei singoli congeneri MC-LR, -RR, -YR, -LA, -LF, -LW, di due forme demetilate, [D-Asp<sup>3</sup>] MC-LR, [D-Asp<sup>3</sup>] MC-RR, e della nodularina-R (NOD-R) nella fase disciolta, è di 0,1 µg/L, partendo da un volume di campione di 500 mL e raggiungendo un volume finale di estratto di 0,5 mL (1000x). In LC-MS con rivelatori di massa a triplo quadrupolo i LOQ sono notevolmente inferiori, compresi tra 0,1 e 1 ng/L. Nel caso della determinazione con il saggio ELISA la concentrazione mediante SPE della fase disciolta può non essere necessaria, essendo il limite di quantificazione per la microcistina-LR di 0,1 µg/L.

Per quanto riguarda la componente endocellulare, la metodica di estrazione è stata messa a punto su una delle specie algali a larga diffusione in Italia, la *Planktothrix rubescens*, una cianoficea planctonica la cui presenza si può manifestare sotto forma di intense fioriture dal caratteristico colore rosso. In queste condizioni si possono raggiungere densità cellulari dell'ordine dei 10<sup>8</sup> cellule/L. La *P. rubescens* sintetizza principalmente cianotossine appartenenti alla classe delle microcistine e, tra queste, più frequentemente la forma demetilata della MC-RR, denominata [D-Asp<sup>3</sup>] MC-RR (Ernst et al., 2008).

Su questo congenere è stata messa a punto la metodica di estrazione delle microcistine endocellulari che ha permesso di raggiungere un LOQ di 0,3 µg/L in HPLC-DAD a partire da un fattore di concentrazione di 100x. A tale limite di quantificazione è stato sperimentalmente correlato un valore di densità cellulare di *P. rubescens* pari a 1,5 · 10<sup>6</sup> cellule/L (Briand et al., 2005).

## 3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

È bene utilizzare, per il campionamento e la conservazione dei campioni, contenitori in vetro scuro ed evitare quelli in materiale plastico, in quanto alcuni additivi contenuti nei materiali plastici (Ikawa et al., 1999) potrebbero essere rilasciati ed interferire con la determinazione in HPLC-DAD delle cianotossine (ad esempio il resorcinolo monobenzoato e il 2,4-diidrossi-benzofenone per la determinazione della microcistina-LR e il bisfenolo A per la determinazione della microcistina-YR). Tali additivi possono avere tempi di ritenzione simili a quelli dei composti in esame e, poiché esibiscono un assorbimento nella stessa regione dello spettro UV (238 nm), possono interferire con il risultato delle analisi. Tali interferenze non pongono problemi invece nell'analisi in LC-MS.

Per il test ELISA, si deve evitare l'utilizzo di solventi che favoriscono lo sviluppo di soluzioni colorate; inoltre, la concentrazione di metanolo nell'estratto finale da analizzare non deve superare il 10%, altrimenti la reazione immunoenzimatica è parzialmente inibita.

## 4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni devono essere prelevati in contenitori di vetro scuro.

La conservazione del campione è un punto fondamentale del metodo analitico proposto, in quanto uno stoccaggio errato può portare ad una sottostima nella quantificazione delle tossine. In particolare, il rapporto tra tossine extra ed endocellulari può essere modificato dalla morte delle cellule algali durante la conservazione del campione con il conseguente rilascio delle tossine citoplasmatiche. È, quindi, utile procedere con la fase di filtrazione entro 48 ore dal momento del campionamento, al fine di separare la componente cellulare dalla fase acquosa del campione. Il filtro utilizzato per la separazione delle tossine endocellulari deve essere congelato a -20°C e si consiglia di condurre la sua estrazione entro un mese dalla data di congelamento, mentre la fase disciolta deve essere sottoposta a concentrazione in SPE entro le successive 72 ore.

Il pH non sembra avere grande rilevanza per la stabilità delle tossine, mentre tali tossine sono facilmente soggette a degradazione microbica. È necessario quindi mantenere sempre i campioni a +4° C al buio dal momento del campionamento sino a quello dell'analisi.

## 5 - APPARECCHIATURE

- 5.1 - Apparecchiatura per filtrazione
- 5.2 - Vetreria di laboratorio
- 5.3 - Congelatore a -20°C
- 5.4 - Generatore di acqua ultrapura
- 5.5 - Rampa di filtrazione
- 5.6 - Sistema di concentrazione sotto flusso di azoto
- 5.7 - HPLC con rilevatore DAD o MS
- 5.8 - Pompa da vuoto
- 5.9 - Pipetta da 100 µL
- 5.10 - Timer
- 5.11 - Agitatore orbitale (opzionale)
- 5.12 - Lettore di micropiastre in grado di effettuare letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm.
- 5.13 - Software di gestione dati interfacciato con il lettore (opzionale)
- 5.14 - Bagno a ultrasuoni (50-60 Hz)

## 6 - REATTIVI

- 6.1 - Metanolo per "analisi di residui"
- 6.2 - Acido trifluoroacetico (TFA)
- 6.3 - Acetonitrile per "analisi di residui"
- 6.4 - Acqua ultrapura
- 6.5 - Filtri in fibra di vetro da 1,2 µm di porosità nominale
- 6.6 - Filtri da siringa in nitrato di cellulosa 0,45 µm
- 6.7 - Cartucce SPE C<sub>18</sub> da 500 mg e 3 mL
- 6.8 - Soluzioni standard di MC-LR per test ELISA (calibratori) a concentrazioni pari a 0,1, 0,2, 0,4, 0,56, 0,8 e 1,6 µg/L
- 6.9 - Soluzioni di riferimento concentrate in metanolo delle differenti tossine con concentrazioni ciascuna comprese tra 5 e 15 µg/mL. Per la preparazione delle soluzioni di riferimento si devono utilizzare standard di cianotossine al maggior grado di purezza disponibile in commercio. Per ogni principio attivo, deve essere preparata mediante solubilizzazione o diluizione in metanolo, una soluzione primaria avente, ad esempio, una concentrazione di 10 µg/mL. Dopo la preparazione, le soluzioni di riferimento sono conservate in contenitori di vetro muniti di tappo a vite a una temperatura di -20 °C; in queste condizioni sono stabili per alcuni mesi.

Le soluzioni utilizzate per le prove di recupero e la calibrazione degli strumenti si ottengono per opportuna diluizione delle soluzioni di riferimento.

- 6.10 - Micropiastre da 96 pozzetti (8 strisce da 12 pozzetti) con anticorpo legato
- 6.11 - Controllo negativo
- 6.12 - Coniugato enzima-microcistina
- 6.13 - Substrato
- 6.14 - Stop Solution (es. HCl 1N)
- 6.15 - Pellicola del tipo Parafilm®
- 6.16 - Acido formico

## 7 - PROCEDIMENTO

### 7.1 - Trattamento preliminare

#### 7.1.1 - Separazione delle due frazioni

La filtrazione (5.1) è effettuata per passaggio su filtro in fibra di vetro (6.5) a partire da 1 L di campione. È utilizzata una rampa di filtrazione (5.5) collegata ad una pompa da vuoto (5.8). Il campione filtrato è conservato in bottiglie di vetro scuro in cella frigorifera fino al momento dell'estrazione. I filtri sono posti in capsule di vetro e conservate in congelatore a -20° C (5.3) fino al momento dell'estrazione.

### 7.2 - Estrazione dalle cellule algali

Le alghe presenti sul filtro sono sottoposte ad una fase di congelamento/scongelamento a -20 °C *over night* per favorire la lisi cellulare. Successivamente è eseguita una prima estrazione con 10 mL di una soluzione metanolo:acqua ultrapura (9:1 v/v) in bagno ad ultrasuoni (5.14) (50-60 Hz) per 15 minuti a temperatura ambiente; l'estratto è recuperato in vial di vetro ed evaporato sotto flusso di azoto (5.6) fino a piccolo volume (1 mL). Lo stesso filtro è sottoposto ad una seconda estrazione con 9 mL di acqua ultrapura in bagno ad ultrasuoni nelle stesse condizioni precedenti. I due estratti sono riuniti e miscelati in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti a temperatura ambiente per una loro migliore dissoluzione. Il campione è quindi filtrato su filtri da siringa in nitrato di cellulosa 0,45 µm (6.6) e recuperato in apposite provette di vetro munite di tappo a vite. La concentrazione finale dell'estratto risulta essere 100 volte quella del campione di partenza. L'estratto può, quindi, essere utilizzato sia per l'analisi in HPLC-DAD e LC-MS sia per i test ELISA, essendo caratterizzato da una concentrazione presunta di metanolo inferiore al 10%.

### 7.3 - Estrazione dalla fase acquosa

Gli analiti di interesse presenti nella fase acquosa sono estratti e concentrati mediante SPE su cartucce C<sub>18</sub> (6.7) contenenti 500 mg di fase adsorbente. La colonna è attivata prima con 3 mL di metanolo, quindi con 6 mL di acqua ultrapura, evitando in ogni passaggio l'essiccamento della fase. Il campione è processato, regolando il vuoto (5.8) in modo da ottenere un flusso compreso tra 5-10 mL/min. Alla fine dell'estrazione, la cartuccia è sottoposta ad una fase di lavaggio, utilizzando 3 mL di acqua ultrapura seguiti da 3 mL di una miscela acqua ultrapura/metanolo (80:20 v/v). La fase di essiccamento è completata mediante aspirazione con pompa da vuoto (5.8) per circa 20 minuti. Le microcistine sono eluite con due aliquote di 2,5 mL di metanolo acidificato con TFA (0,1% v/v) e, successivamente, con due aliquote di 2,5 mL di una miscela metanolo/acqua ultrapura (75:25 v/v) acidificata con TFA (0,1% v/v). I due eluati sono concentrati separatamente sotto moderato flusso di azoto (5.6) fino ad un volume finale di 0,5 mL per il primo estratto e di circa 1 mL per il secondo, in funzione del contenuto di acqua residua. Gli estratti così ottenuti possono essere analizzati in HPLC-DAD e/o LC-MS; per l'analisi mediante il saggio ELISA, è necessario ridurre l'estratto ad un minor volume e riprendere con acqua ultrapura, per allontanare il metanolo residuo.

### 7.4 – Allestimento saggio ELISA

I passaggi da effettuare per lo svolgimento del saggio ELISA sono i seguenti:

1. Aggiungere 100 µL di "Negative Control" (6.11), gli standard (6.8) e 100 µL di ogni campione ognuno nei rispettivi pozzetti seguendo uno schema prestabilito.
2. Coprire i pozzetti con del parafilm (6.15) per prevenire l'evaporazione ed incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
3. Dopo l'incubazione, rimuovere la copertura ed aggiungere 100 µL di "Microcystins-enzyme Coniugate" (6.12) in ogni pozzetto.
4. Mescolare il contenuto dei pozzetti con un rapido movimento circolare della piastra sul banco di lavoro.
5. Coprire i pozzetti con parafilm per prevenire l'evaporazione ed incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
6. Dopo l'incubazione, rimuovere con attenzione la copertura e girare la piastra al rovescio per eliminare il contenuto dei pozzetti.

Inondare vigorosamente i pozzetti fino a straripamento con acqua ultrapura, ripetendo l'operazione di lavaggio per quattro volte. Girare la piastra per eliminare l'acqua eventualmente presente nei pozzetti appoggiandola sempre al rovescio su di un panno di carta per facilitarne la fuoriuscita.

7. Aggiungere 100 µL del Substrato (6.13) in ogni pozzetto, partendo prima dal pozzetto in cui è contenuto il Negative Control (6.11), poi da quelli in cui sono presenti gli standard (6.8) e infine da quelli contenenti i campioni.
8. Mescolare accuratamente il contenuto dei pozzetti, come in precedenza, e, quindi, coprire i pozzetti con parafilm, incubando poi per 30 minuti a temperatura ambiente.
9. Aggiungere 100 µL della "Stop Solution" (6.14) in ogni pozzetto, mescolando alla fine dell'operazione. La soluzione contenuta in ogni pozzetto diviene di colore giallo.
10. Leggere (5.12) la piastra nei 30 minuti successivi all'aggiunta della "Stop Solution".

Regolare la lunghezza d'onda di lettura del lettore di piastre a 450 nm.

Se lo strumento non è in grado di azzerare la piastra contro aria, azzerarlo con 200 µL di acqua ultrapura come bianco in un pozzetto e misurare quindi la densità ottica, registrandola, di ogni pozzetto. In alternativa, misurare e registrare la densità ottica in ogni pozzetto e poi sottrarla dal bianco di ogni lettura.

### 7.5 - Analisi degli estratti mediante HPLC-DAD

Il cromatografo utilizzato è un HPLC-DAD modello HP Agilent serie 1050, munito di sistema di degassaggio, di pompa quaternaria, di auto campionatore (HP 1050S) e di un vano colonna termostata. Il rilevatore a serie di diodi (G1306A Series II, Diode Array Detector) consente di registrare le assorbanze su lunghezze d'onda comprese tra 190 e 600 nm. Il range di acquisizione per questa metodica è compreso tra 200 e 300 nm. Come solvente A per la fase mobile si è utilizzata acqua ultrapura ottenuta da un sistema di generazione Direct-Q 3 (Millipore, France) (5.4) e come solvente B acetonitrile (Sigma-Aldrich, Germania), entrambi acidificati (0,05% v/v) con acido trifluoroacetico (TFA) (Carlo Erba, Italia). La separazione degli analiti è avvenuta su colonna Luna C18 (250 mm x 3,00 mm i.d.; diametro particelle 5 µm) della Phenomenex (CA, U.S.A.); la colonna è protetta da una pre-colonna (C18). Le condizioni cromatografiche utilizzate sono descritte in tabella 2 (Metodo A e B).

Il programma di eluzione impiegato nel metodo B ha consentito, per alcuni campioni, la riduzione delle interferenze da matrice nella quantificazione degli analiti, pur aumentando il tempo di analisi.

La quantificazione (Fig. 3) è stata eseguita per il segnale acquisito a 238 nm. Il volume di iniezione è stato di 100 µL.

Le tossine sono state identificate sia in base al tempo di ritenzione che allo spettro di assorbimento. Le tossine indagate sono state: le microcistine (MC-LR, -RR, -YR, -LA, -LW, -LF, [D-Asp<sup>3</sup>] MC-RR e [D-Asp<sup>3</sup>] MC-LR) e la nodularina-R (NOD-R). Il sistema è stato calibrato attraverso una retta a quattro punti compresa tra 0,1 e 1,6 µg/mL, preparata a partire dalla soluzione madre (6.8).

Tab. 2 - Condizioni cromatografiche utilizzate in HPLC-DAD

METODO A	
Flusso 0,5 mL/min; T colonna 35 °C	
Tempo (min)	% di B
0	10
7	45
20	70
25	10
30	10

METODO B	
Flusso 0,5 mL/min; T colonna 40 °C	
Tempo (min)	% di B
0	30
5	35
30	70
31	100
33	100
35	30
40	30

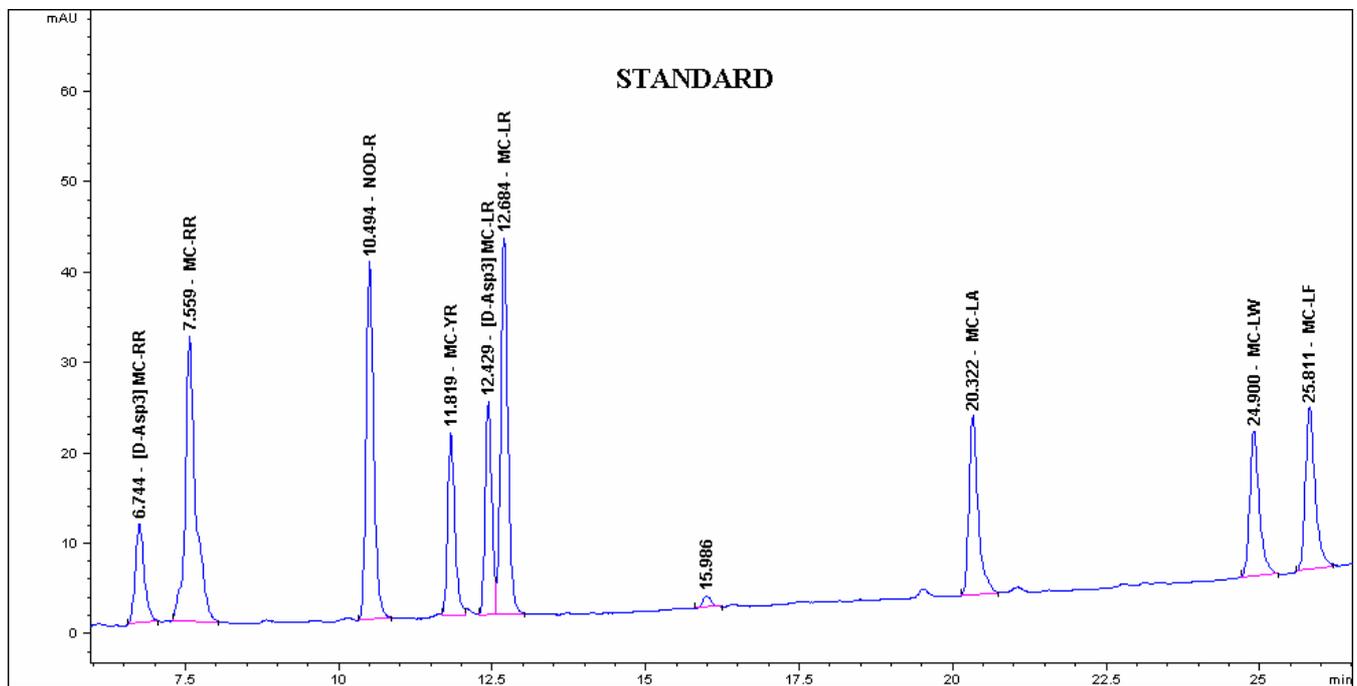


Fig. 3 - Cromatogramma ottenuto con il metodoa B, volume di iniezione 100 µL. Concentrazione di standard di [D-Asp<sup>3</sup>] MC-RR, MC-YR, [D-Asp<sup>3</sup>] MC-LR, MC-LA, MC-LW, MC-LF: 0,42 µg/mL; concentrazione di MC-RR, MC-LR, NOD-R: 0,63 µg/mL.

### 7.6 - Analisi degli estratti mediante LC-MS

Il sistema utilizzato consiste in un cromatografo Waters Acquity UPLC, munito di pompa binaria, autocampionatore, comparto colonna termostata e detector PDA (Photodiode Detector Array), accoppiato a rivelatore di massa ibrido triplo quadrupolo-trappola ionica lineare AB-Sciex 4000QTRAP. La separazione degli analiti è stata effettuata su colonna Acquity BEH C18 (2,1 x 50 mm, diametro particelle 1,7  $\mu\text{m}$ ), usando quale fase mobile (A) acqua ultrapura (6.4) e come fase mobile (B) acetonitrile (6.3), entrambi contenenti acido formico 0,1% v/v. Il volume iniettato è stato di 8  $\mu\text{L}$  di campione e la separazione è stata effettuata in gradiente, come riportato in tabella 3.

Per la rivelazione degli analiti il detector di massa è stato adoperato in modalità MS/MS Multiple Reaction Monitoring (MRM) ed Electro Spray positivo (ESI+). Per ogni analita sono state monitorate due transizioni. I parametri generali di acquisizione sono stati: Ion Spray Voltage 5000 V, Entrance Potential 10 V, Cell Exit Potential 10 V, Interface Heater Temperature 300 °C. I parametri specifici per ogni analita sono riportati in tabella 4, mentre in figura 4 sono riportati i cromatogrammi relativi a ciascun analita.

Tab. 3 - Condizioni cromatografiche utilizzate in UPLC-PDA

METODO UPLC	
Flusso 0,25 mL/min; T colonna 40 °C	
Tempo (min)	% di B
0	30
5	80
6	30
7	30

Tab. 4 - Parametri utilizzati nell'analisi MS/MS di microcistine e nodularina-R

PARAMETRI MRM					
	Peso molecolare (Da)	Transizione 1	Transizione 2	Declustering Potential (V)	Collision Energy (V)
MC-RR	1038	520/135	520/213	100	43
[D-Asp <sup>3</sup> ] MC-RR	1024	513/135	513/213	100	43
MC-YR	1045	523/135	523/213	50	20
MC-LR	995	498/135	498/213	50	20
[D-Asp <sup>3</sup> ] MC-LR	981	491/135	491/213	50	20
MC-LA	910	911/135	911/213	70	80
MC-LW	1025	1026/135	1026/213	90	90
MC-LF	986	987/135	987/213	90	100
NOD-R	825	826/70	826/135	90	100

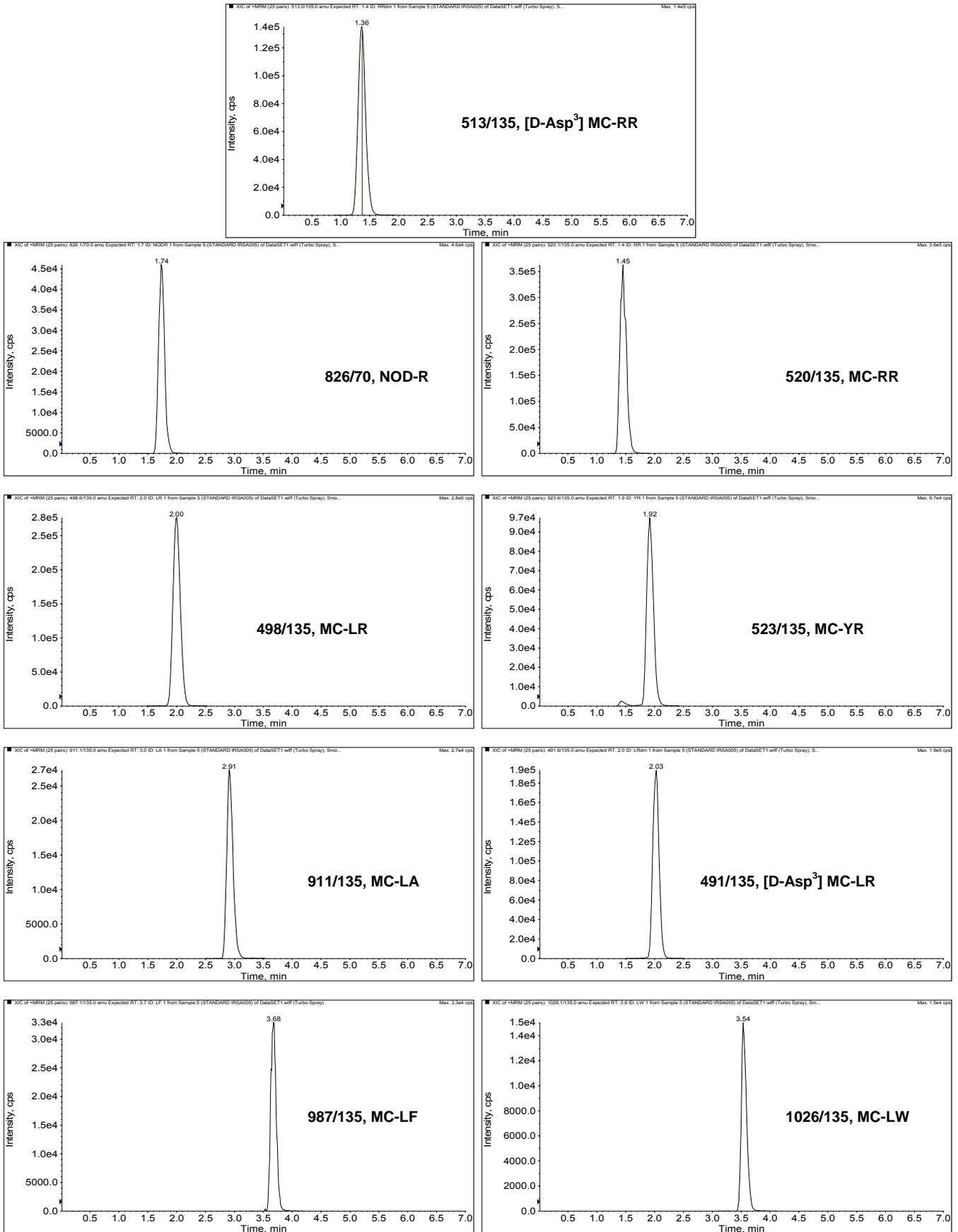


Fig. 4 - Analisi microcistine e nodularina-R in UPLC-MS. Sono riportati i cromatogrammi di standard relativi alle transizioni più intense di ciascun analita monitorate in modalità MRM alle medesime concentrazioni riportate in figura 3.

### 7.7 - Analisi degli estratti mediante saggio ELISA

Il dosaggio quantitativo si basa sulla lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm. Il metodo è calibrato attraverso una retta a 6 punti calcolata a partire da una soluzione nota di MC-LR in concentrazioni, ad esempio, comprese tra 0,1 e 1,6 µg/L. Il limite di quantificazione del metodo ELISA è generalmente pari a 0,1-0,2 µg/L.

Il kit non distingue tra la MC-LR e le altre varianti di microcistine, ma rileva la somma delle loro concentrazioni e il risultato è espresso come valore equivalente di concentrazione della MC-LR. La tabella 5 mostra, ad esempio, la concentrazione che lega il 50% dei siti presenti (50% B<sub>0</sub>) per i diversi composti nel caso si utilizzi il kit ELISA Envirogard® Microcystins 7 Plate Kit (Strategic Diagnostics Inc.); il valore del 50% B<sub>0</sub> è funzione della sensibilità del saggio alle diverse tossine algali.

Tab. 5 - Concentrazione (µg/L) di alcune cianotossine che lega il 50% dei siti presenti (50 %B<sub>0</sub>)

COMPOSTI	50%B <sub>0</sub>
MC-LR	0,31
MC-RR	0,32
MC-YR	0,38
NOD-R	0,47

## 8 – CALCOLI

### 8.1 – Quantificazione in HPLC-DAD/MS

Per la quantificazione in HPLC-DAD sono state utilizzate rette di calibrazione ottenute con standard esterno. Sono state iniettate in doppio soluzioni di riferimento in un intervallo di concentrazione compreso tra 0,1 e 1,6 µg/mL, verificando l'intervallo di linearità del rivelatore. Le concentrazioni negli estratti sono state calcolate tramite il software di acquisizione dati.

La quantificazione in LC-MS è stata eseguita, misurando l'area dei segnali relativi alla transizione più intensa (transizione 1) di ciascun analita col metodo dello standard esterno. La risposta del rivelatore è risultata lineare nel range da 0,1 a 100 ng/L.

Negli esperimenti di aggiunta delle tossine algali alla fase acquosa, la percentuale di recupero di ogni singola microcistina è stata calcolata nel seguente modo:

$$R\% = \frac{C_e \cdot V_f}{C_s \cdot V_a} \cdot 100$$

dove:

C<sub>e</sub>=Concentrazione (µg/mL) della microcistina nell'estratto

V<sub>f</sub>=Volume finale (mL) dell'estratto

C<sub>s</sub>=Concentrazione (µg/mL) della microcistina nello soluzione di riferimento

V<sub>a</sub>=Volume (mL) della soluzione di riferimento aggiunta

Non è stato possibile effettuare prove di recupero per la componente endocellulare delle microcistine in quanto non è disponibile un materiale certificato rispetto al quale testare il metodo proposto.

Per ogni singola microcistina, la concentrazione in µg/L (C<sub>d</sub>) nella fase disciolta è stata calcolata nel seguente modo:

$$C_d = \frac{C_e \cdot V_{fd}}{V_{id}}$$

dove:

C<sub>e</sub>=Concentrazione (µg/mL) della microcistina nell'estratto

V<sub>fd</sub>=Volume finale (mL) dell'estratto

V<sub>id</sub>=Volume (L) di campione acquoso estratto

Per ogni singola microcistina, la concentrazione in µg/L (C<sub>en</sub>) nella frazione endocellulare è stata calcolata nel seguente modo:

$$C_{en} = \frac{C_e \cdot V_{fen}}{V_{ien}}$$

dove:

C<sub>e</sub>=Concentrazione (µg/mL) della microcistina nell'estratto

V<sub>fen</sub>=Volume finale (mL) dell'estratto

V<sub>ien</sub>=Volume (L) di campione filtrato per la componente cellulare

La concentrazione totale (µg/L) delle singole microcistine nel campione di acqua di lago è quindi dato dalla somma delle due componenti (extra ed endocellulare):

$$C_t = C_d + C_{en}$$

### 8.2 – Quantificazione con metodo ELISA

Dopo la lettura, è necessario calcolare la media della densità ottica (OD) degli standard e dei campioni e determinare il valore di %B<sub>0</sub> come segue:

$$\% B_0 = \frac{\overline{OD_s}}{\overline{OD_c}} \times 100$$

dove:

$\overline{OD_c}$  = Media della densità ottica del controllo negativo

$\overline{OD_s}$  = Media della densità ottica degli standard (o dei campioni)

La %B<sub>0</sub> così calcolata è utilizzata per permettere la comparazione di saggi ELISA condotti in tempi diversi. Infatti, mentre le densità ottiche (OD) misurate per il controllo negativo, gli standard e i campioni possono differire da analisi ad analisi, il rapporto %B<sub>0</sub> degli standard e dei campioni sul controllo negativo rimane costante.

Affinché il test ELISA sia valido, il %CV [Coefficiente di variazione = (deviazione standard / media) x 100] delle misure di densità ottica degli standard non deve superare il 15%.

A questo punto deve essere rappresentata in grafico, la miglior retta che interpola i punti delle %B<sub>0</sub> degli standard in funzione della concentrazione di microcistina su scala semi-log (Fig. 5).

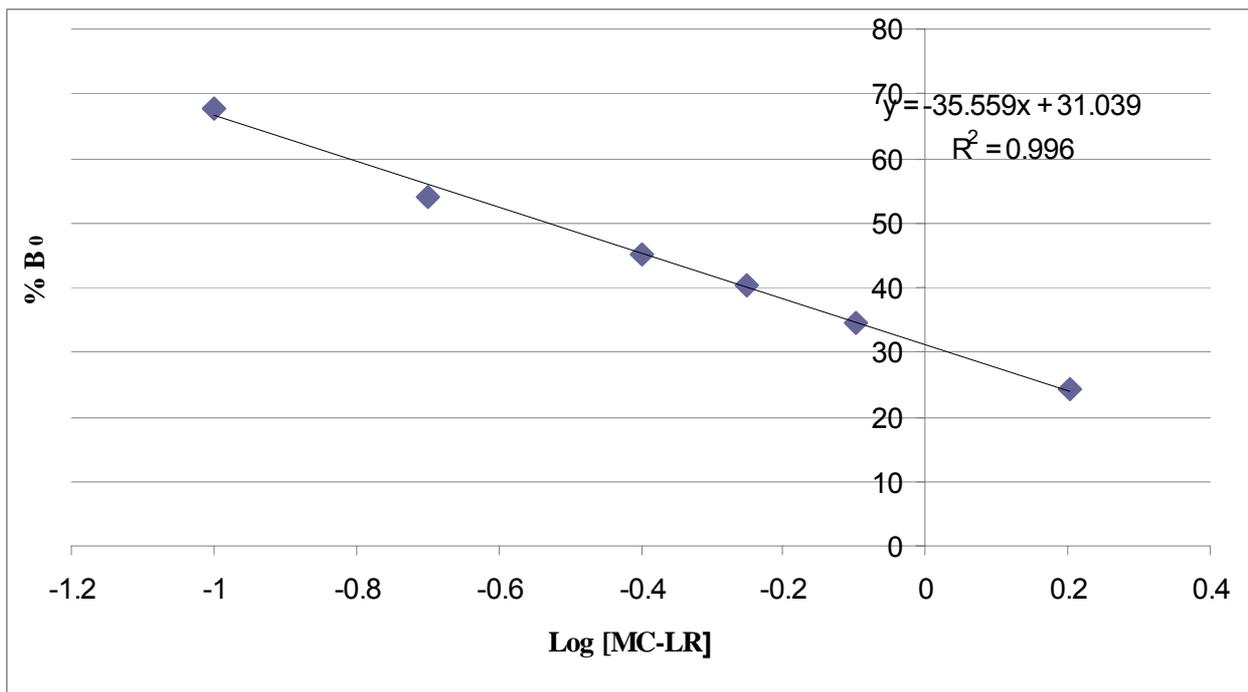


Fig. 5 - Relazione lineare tra il logaritmo della concentrazione di MC-LR e la %B<sub>0</sub>.

Utilizzare la funzione lineare ottenuta per lo standard per determinare la concentrazione di microcistina di ciascun campione, a partire dal valore di %B<sub>0</sub> misurato. Il valore di concentrazione ottenuto è espresso come concentrazione equivalente di MC-LR presente nel campione ed è corretto solo se il valore della %B<sub>0</sub> del campione cade nel range di linearità misurato per gli standard. Se il valore di %B<sub>0</sub> del campione è inferiore rispetto a quello ottenuto con lo standard più concentrato (1,6 µg /L), eseguire nuovamente il test diluendo opportunamente il campione.

## 9 - QUALITÀ DEL DATO

Per l'analisi delle microcistine endocellulari, non essendo disponibile un materiale certificato a titolo noto, si è valutata l'efficacia del metodo proposto,

effettuando prove di estrazione del filtro dei campioni del Lago di Occhito contenenti *Planktothrix rubescens* con differenti soluzioni estraenti; la quantificazione è stata condotta in HPLC-DAD. La soluzione estraente illustrata nel paragrafo 7.2 è risultata essere la più efficiente. Inoltre, è stata confrontata l'efficienza del metodo di estrazione del campione totale congelato (Microcistine: Metodo immunoenzimatico; ISTISAN, 2007) rispetto all'estrazione separata delle due componenti endo e extracellulare (Metodo IRSA).

La loro somma è sempre risultata superiore al valore ottenuto dal campione congelato/scongelato (Tab. 6; Copetti et al., 2009) nel caso dei campioni del Lago di Occhito e della relativa rete irrigua contaminati da *Planktothrix rubescens*.

Tab. 6 - Risultati dell'analisi della [D-Asp<sup>3</sup>]-MC-RR (µg/L) in campioni del Lago di Occhito e della rete irrigua

	<b>Microcistina disciolta Metodo IRSA</b>	<b>Microcistina endocellulare Metodo IRSA</b>	<b>Microcistina disciolta+ endocellulare Metodo IRSA</b>	<b>Microcistina totale Metodo ISS</b>
Controllo (acqua ultrapura)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Torre Piezometrica P1	0,1	< 0,1	0,1	<0,1
Vasca Accumulo Tavoliere	0,5	0,9	1,4	0,9
Rip.Fin. Canna 7	0,8	6,3	7,1	5,2
Rip.Fin. Sfiore di Superficie	< 0,1	4,0	4,0	3,7
Rip. Fin. Sbocco Galleria	0,2-0,3	6,0	6,3	4,6
Lago Occhito S02 2 m	0,5	10,1	10,6	4,1
Lago Occhito S07 2,5 m	0,6-0,7	14,6	15,2	5,4
Lago Occhito E11 7 m	0,5	13,4	13,9	9,2
Fiume Fortore - emissario	0,5-0,7	13,2	13,8	10,0

La ripetibilità del metodo di estrazione della componente endocellulare (Metodo IRSA, paragrafo 7.2) è stata valutata, estraendo e analizzando in HPLC-DAD separatamente quattro filtri, ottenuti dal medesimo campione di acqua di lago (Lago di Pusiano) contenenti *Planktothrix rubescens*.

I risultati ottenuti (Fig. 6) mostrano che il metodo proposto è affidabile per quanto riguarda la ripetibilità delle misure; la medie delle misure è risultata pari a 4,38 µg/L con una deviazione standard di 0,18 µg/L e il coefficiente di variazione percentuale è risultato pari a 4,2%.

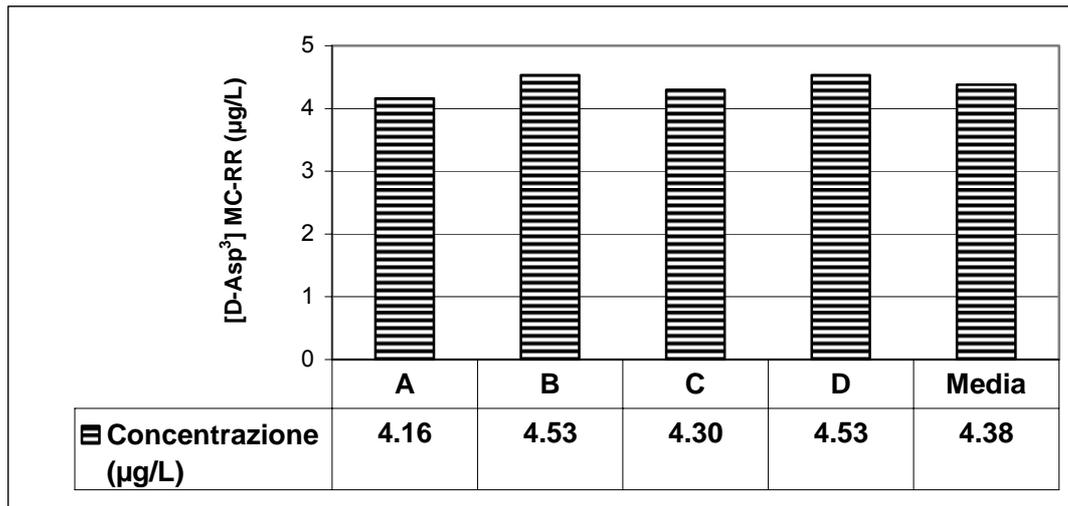


Fig. 6 - Concentrazione della [D-Asp3]-MC-RR endocellulare dopo estrazione di quattro filtri (A, B, C, D) ottenuti da un unico campione di acqua di lago (Lago di Pusiano).

Per quanto concerne l'analisi in HPLC-DAD delle tossine extracellulari, in figura 7 sono riportate le percentuali di recupero dei vari congeneri delle microcistine e della nodularina-R dalla fase acquosa. Le prove sono state condotte, arricchendo 500 mL di campioni di acqua di lago filtrata e non contaminata da tossine con concentrazioni di microcistine e nodularina-R comprese tra 1,65 e 2,5 µg/L, preparate a partire dalla soluzione di

referimento (6.8). Per la frazione extracellulare, i recuperi medi (n=5) sono risultati sempre superiori al 60% con coefficienti di variazione (CV) pari al 10-15% e, nel migliore dei casi (MC-LR), il recupero è stato pari al 103 % con un CV inferiore al 10%. Solo per la MC-LW, la più apolare delle microcistine considerate, il recupero medio è risultato del 41 % con un CV del 40 %.

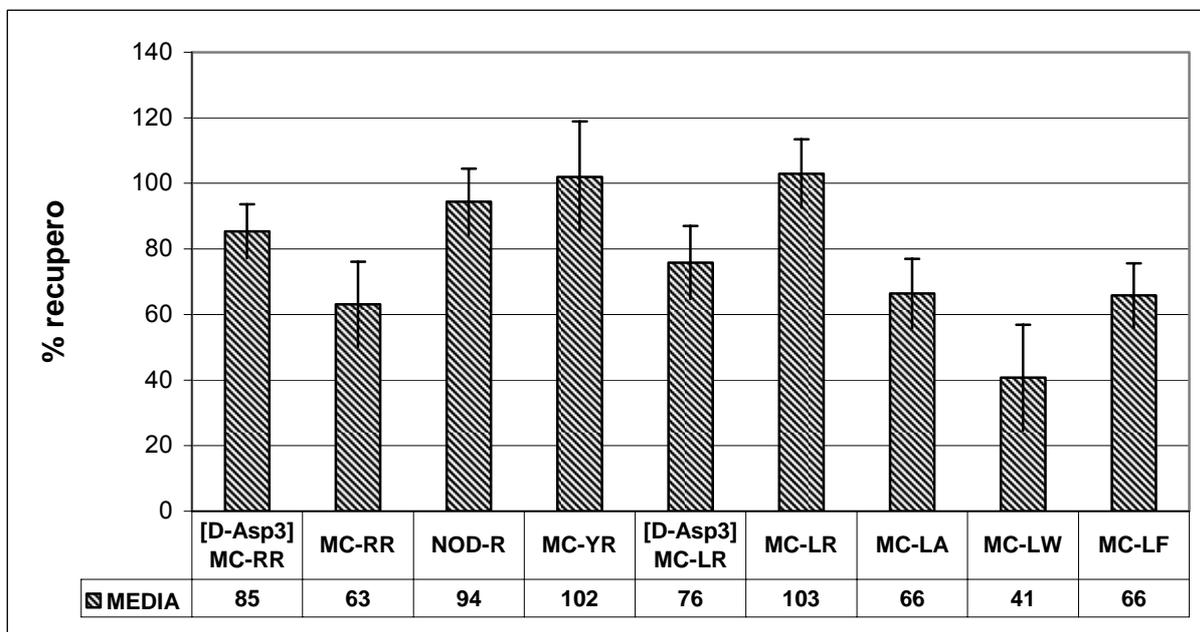


Fig. 7 - Percentuali di recupero medio (n=5) dei congeneri delle microcistine e della nodularina-R in fase disciolta. Barre di errore = SD.

**BIBLIOGRAFIA**

AN J., CARMICHAEL W.W. (1994): "Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immuno sorbent assay for the study of microcystins and nodularins", *Toxicon*, **32**, 1495-1507.

BEATTIE K.A., KAYA K., SANO T., CODD G.A. (1988): "Three dehydrobutyrine-containing microcystins from Nostoc", *Phytochemistry*, **47**, 1289-1292.

BRIAND J.-F., JACQUET S., FLINOIS C., AVOIS-JACQUET C., MAISONNETTE C., LEBERRE B., HUMBERT J.-F. (2005): "Variations in the Microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments", *Microb. Ecol.*, **80**, 418-428.

CARMICHAEL W.W., BEASELY V., BUNNER D.L., ELOFF J.N., FALCONER I., GORHAM P., HARADA K., KRISHNAMURTHY T., YU M.-J., MOORE R.E., REINHART M., RUNNEGAR M., SKULBERG O.M., WATANABE M. (1988): "Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae)", *Toxicon*, **26**, 971-973.

CARMICHAEL W.W., MAHMOOD K.A. (1984): "Toxins from Freshwater Cyanobacteria", *ACS Symposium Series*, **262**, 377-389.

COPETTI D., GUZZELLA L., MINGAZZINI M., PALUMBO M.T., GUYENNON N., GHISLANZONI L., LEGNANI D. (2009): "Risultati sperimentali della campagna intensiva svolta nell'aprile 2009". *RAPPORTO FINALE della Convenzione "Gestione dell'emergenza – fioriture di *Planktothrix rubescens* – in funzione dell'uso irriguo, Aspetti limnologici e tossicologici"*, *FASE I IRSA-CNR*, 43pp.

ERNST B., HOEGER S.J., O'BRIEN E., DIETRICH D.R. (2008): "Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany", *Harmful Algae*, **8**, 329-342.

HARADA K.-I., IMANISHI S., KATO H., MIZUNO M., ITO E., TSUJI K. (2004): "Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation", *Toxicon*, **44**, 107-109.

HENRIKSEN P. (1996): "Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC", *Phycologia*, **35**, 102-110.

IKAWA M., PHILLIPS N., HANEY J.F., SASNER J.J. (1999): "Interference by plastic additives in the HPLC determination of microcystin-LR and -YR", *Toxicon*, **37**, 923-929.

ISS (2007): "Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi chimici", *Rapporti ISTISAN*, n. **07/31**, 101-106.

JUNGBLUT A.-D., NEILAN B.A. (2006): "Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria", *Arch. Microbiol.*, **185**, 107-114.

KURMAYER R., JUTTNER F. (1999): "Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich", *J. Plankton Res.*, **21**, 659-683.

MCELHINEY J., LAWTON L. (2005): "Detection of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **203** (3), 219-30.

MOHAMED Z.A. (1999): "Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in some Egyptian irrigation canals", *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **50**, 4-8.

NOGUEIRA I., VASCONCELOS V. (2001): "Toxicity of two filamentous cyanobacteria species – *Planktothrix planctonica* and *P. perornata*". In: *5th Int. Conf. Toxic Cyanobacteria*, Noosa, Queensland, Australia, 15-20.

SIVONEN K., HIMBERG K., LUUKKAINEN R., NIEMELA S.I., POON G.K., CODD G.A. (1989a): "Preliminary characterization of neurotoxic blooms and strains from Finland", *Tox. Assess. Int.*, **4**, 339-52.

SIVONEN K., JONES G. (1999): "Cyanobacterial toxins". In: CHORUS I., BARTRAM J. (1999): "Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management" *London: E & FN Spon*, 41-111.

SKULBERG O.M., CARMICHAEL W.W., CODD G.A., SKULBERG R. (1993): "Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria)". In: FALCONER I.A. (Ed.). *Algal toxin in seafood and drinking water*. London: Academic Press., 145-163.

TOMASELLI L. (2000): "Ecofisiologia e tassonomia dei cianobatteri". Atti Workshop "Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane". Roma 16-17 dicembre 1999. *Rapporti ISTISAN* n. **00/30**, 1-9.

VAN APELDOORN M.E., VAN EGMOND H.P., SPEIJERS G.J.A., BAKKER G.J.I. (2007): "Toxins of cyanobacteria", *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 7-60.

VASCONCELOS V., AMORIM A. (1999): "Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*", *Toxicon*, **37**, 1041-1052.

WATANABE M.F., OISHI S., HARADA K-L., MATSURA K., KAWAI H., SUZUKI M. (1988): "Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (Blue-green algae)", *Toxicon*, **26**, 1017-1025.

WATANABE M.F., PARK H.D., KONKO F., HARADA K-I., HAYASHI H., OKINO T. (1997): "Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels", *Nat. Toxins*, **5**, 5-31.

YASUNO M., SUGAYA Y., KAYA K., WATANABE M.M. (1995): "Variations in the toxicity of the *Microcystis* species to *Moina* macroscopica". In: *1st Int. Congr. Toxic Cyanobacteria*, 20-24 August 1995, Rønne, Denmark.

ZIMBA P.V., KHOO L., GAUNT P.S., BRITAIN S., CARMICHAEL W.W. (2001): "Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins", *J. Fish Disease*, **24**, 41-47.

Specifiche dimostrazioni di laboratorio, illustrano le tecniche tradizionali e biomolecolari per la caratterizzazione e la quantificazione di popolazioni batteriche. In particolare saranno mostrati il protocollo della tecnica di Ibridazione Fluorescente *in situ* (FISH), le analisi in microscopica ad epifluorescenza, la procedura per l'esecuzione della Real Time-PCR, inclusa la registrazione e l'elaborazione dei risultati.

Il corso è organizzato nell'ambito delle iniziative di formazione della SETAC *Italian Branch*. I docenti del corso, provengono oltre che dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR, anche dalla Sapienza Università di Roma e dall'ISS.

Il corso è diretto a ricercatori, studenti di dottorato, operatori nel settore ambientale (ARPA, Regioni ecc.) e a tutti coloro che si vogliono formare ed aggiornare nel settore del biorisanamento di aree contaminate.

#### DIREZIONE DEL CORSO

Valter Tandoi  
Simona Rossetti  
Anna Barra Caracciolo

#### DOCENTI

Mauro Majone *Sapienza Università di Roma*  
Federico Aulenta *Sapienza Università di Roma*  
Paola Bottoni *Istituto Superiore di Sanità*  
Giuseppe Mininni *IRSA-CNR*  
Paola Grenni *IRSA-CNR*  
Caterina Levantesi *IRSA-CNR*

Per lo svolgimento delle dimostrazioni di laboratorio i Docenti si avvarranno della collaborazione di Bruna Matturro e Francesca Falconi (IRSA-CNR)

## CORSO

### BIORISANAMENTO DI AREE CONTAMINATE: METODOLOGIE, RUOLO DEI MICRORGANISMI E TECNICHE DI INDAGINE

Roma 30 marzo - 1 aprile 2011

L'Istituto di Ricerca sulle Acque, in collaborazione con la divisione italiana della SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), organizza un corso in **Biorisanamento di aree contaminate**, con particolare riferimento all'utilizzo di microrganismi per strategie di recupero.

Il corso, dopo un inquadramento generale sulla normativa e sulle metodologie disponibili per la bonifica dei siti contaminati, prende in esame le metodologie avanzate di identificazione e monitoraggio dei microrganismi che rimuovono i contaminanti organici in diverse matrici ambientali (suolo, sedimento, acqua).

## PROGRAMMA

### Mercoledì 30 Marzo

*Aula Pentagono, CNR sede P.<sup>le</sup> Aldo Moro, 7 - Roma*

**Ore 14.00** Registrazione Partecipanti - **Caffè di benvenuto**

**Ore 15.00** Introduzione generale (Dott. Valter Tandoi, IRSA-CNR).

**Ore 15.30** Il quadro normativo in materia di siti inquinati: dal DM 471/99 al Dlgs 152/2006 (Dott. Ing. Giuseppe Mininni, IRSA-CNR).

**Ore 16.00** Tecnologie di bonifica dei siti contaminati (Prof. Mauro Majone, "Sapienza" Università di Roma).

**Ore 16.30** Contaminanti ambientali prioritari ed emergenti: pesticidi, metaboliti e farmaci (Dott.ssa Paola Bottoni, ISS).

**Giovedì 31 Marzo**

IRSA-CNR Area della Ricerca RM1 - Via Salaria km 29,300 Monterotondo

**Ore 9.00** Biorisanamento in situ di siti contaminati da composti organici: dal test di laboratorio all'applicazione su scala reale (Dott. Federico Aulenta, "Sapienza" Università di Roma).

**Ore 9.30** Metodologie avanzate di caratterizzazione di microrganismi coinvolti nei processi di biodegradazione di solventi clorurati (Dott.ssa Simona Rossetti, IRSACNR)

**Ore 10.00** Caratterizzazione ed isolamento di microrganismi con potenzialità di recupero di suoli ed acque sotterranee contaminate da fitofarmaci (Dott.ssa Anna Barra Caracciolo, IRSA-CNR)

**10.30 Coffee break**

**Ore 11.00 – 12.00** Tavola rotonda sugli argomenti trattati e su specifiche problematiche proposte dai partecipanti al corso.

**Ore 12.00 – 14.00 Pausa Pranzo****Ore 14.00 – 17.00 Dimostrazione in laboratorio 1**

Studio in microcosmo: allestimento, analisi ed elaborazione dati

Tecniche di isolamento in coltura pura e colture di arricchimento

Determinazione quantitativa di popolazioni microbiche ed analisi espressione geni funzionali mediante Real Time PCR

**Venerdì 1 aprile**

IRSA-CNR Area della Ricerca RM1 - Via Salaria km 29,300 Monterotondo

**Ore 9.00 – 10.30 Dimostrazione in laboratorio 2**

Tecniche di ibridazione *in situ* (FISH) per l'identificazione filogenetica dei microrganismi.

**10.30 Caffè break****Ore 11.00 – 12.00 Dimostrazione in laboratorio 3**

Analisi al microscopio in epifluorescenza dei preparati FISH

Tecniche di colorazione con coloranti fluorescenti per determinare vitalità ed abbondanza batterica.

**Ore 12.00 – 13.00** Considerazioni conclusive e consegna **Attestato di partecipazione**

**INFORMAZIONI SUL CORSO**

Anna Barra Caracciolo - barracaracciolo@irsa.cnr.it; tel. 06 90672786

Simona Rossetti - rossetti@irsa.cnr.it; tel. 0690672697

**MODALITÀ DI PARTECIPAZIONE**

Il numero dei partecipanti è limitato a 30; sino a tale numero saranno accettate le **Schede di iscrizione pervenute entro il 31/01/2011** spedite via e-mail a: barracaracciolo@irsa.cnr.it

La quota di iscrizione, pari a **200 euro (150 euro per gli iscritti alla SETAC)** dovrà essere versata entro e non oltre 25/02/2011, mediante bonifico bancario intestato a:

ZEROSEICONGRESSI srl

IBAN: IT 53 Z 02008 05324 000400045669

BIC / SWIFT code :UNCRITM1E46

Causale: **Corso IRSA**

*istituto di ricerca sulle acque - cnr*

## NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a *Quaderni* (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. Area della Ricerca RM1 – Montelibretti  
Via Salaria km 29,300 C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

Tel. 06/90672850 - Fax 06/90672787

Direttore responsabile: Maurizio Pettine

Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta

Segreteria di redazione: S. Ghergo

Distribuito "on-line": [www.irsacnr.it/Notiziario](http://www.irsacnr.it/Notiziario)

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda