

LINEAMENTI DI TECNICHE ANALITICHE NELLA MICROBIOLOGIA AMBIENTALE

0. Generalità e definizioni

La definizione di metodo adottata dai chimici è generale a tal punto che si può applicare anche alla microbiologia. Il documento CEN TC 230/WG 1/TG 4 “Guida per il controllo di qualità analitico dell’analisi dell’acqua” riporta la seguente definizione: “Il metodo analitico è la serie di procedure scritte seguite dal tecnico di laboratorio”.

Tutte le determinazioni da eseguire nell’analisi microbiologica delle acque sono legate a un metodo e, generalmente, i metodi standardizzati riportano la descrizione delle norme da seguire in dettaglio. In alcuni casi, i metodi sono specificati in norme tecniche di applicazione della legislazione nazionale; in quei casi si considerano metodi ufficiali nazionali. Metodi standardizzati sono anche disponibili presso diverse organizzazioni internazionali quali:

ISO International Standards Organization

CEN Comité Européen de Normalisation

IDF International Dairy Federation

AOAC Association of Official Analytical Chemists

o presso singoli enti di standardizzazione nazionali.

Negli anni più recenti, inoltre, c’è la tendenza, da parte delle normative internazionali ed europee in particolare, all’unificazione delle procedure analitiche per ogni diversa tipologia di acqua. L’obbligo è quello di utilizzare metodi uguali o almeno equivalenti a quelli proposti, per ottenere risultati confrontabili e determinare, in maniera uniforme, la qualità delle acque.

Inoltre, non tutti i metodi microbiologici sono idonei all’analisi di tutti i tipi di matrici ambientali. La stessa analisi di acque con caratteristiche di qualità diverse (acque superficiali dolci e marine, acque sotterranee, acque reflue e ad uso irriguo, acque sottoposte a trattamenti di potabilizzazione e acque disinfettate) comporta l’uso di metodi diversi che tengano conto delle marcate differenze di natura chimica, chimico-fisica e biologica.

In generale, due procedure analitiche che differiscono per singoli dettagli dovrebbero essere considerate come metodi differenti. Tuttavia, in microbiologia, differenze, per esempio, nelle diluizioni usate non sono solitamente considerate motivi sufficienti per definire che si tratta di metodi differenti. Invece, differenze nella formulazione del terreno di coltura, nel principio del metodo e le differenze nei tempi/temperature di incubazione vanno sicuramente a definire metodi di analisi diversi.

I risultati di un controllo microbiologico sono sempre definiti dal metodo usato. Quando, ad esempio, si esamina lo stesso campione con metodi diversi, si ottengono risultati diversi. Questo è particolarmente vero per l’isolamento di organismi bersaglio che non sono inequivocabilmente definiti dal metodo, ma anche per organismi bersaglio definiti in base all’ordinamento tassonomico. Anche la vitalità di un microrganismo può influire sul rilevamento; microrganismi danneggiati o stressati dalle condizioni ambientali possono rispondere in modo diverso alle condizioni standard di laboratorio. Metodi diversi inoltre copriranno porzioni differenti della popolazione microbica. Ne è esempio il confronto tra conteggi di microscopia e conteggi su terreni di coltura estremamente selettivi, ovvero anche da risultati ottenuti con terreni di coltura particolarmente ricchi o poveri in nutrienti organici.

Non esiste nessun criterio obiettivo che permetta di stabilire quale metodo dia risultati migliori, in quanto il risultato dipende anche dagli scopi dell’analisi. Tuttavia, esistono norme specifiche che mettono in grado di valutare l’equivalenza tra metodi analitici microbiologici. Le procedure analitiche e le successive valutazioni statistiche, necessarie per addivenire al risultato, sono impegnative e necessitano della collaborazione di statistici esperti nel campo specifico.

1. Metodi di analisi

1.1. Metodi tradizionali

1.1.1. Tecnica dei tubi multipli o del numero più probabile (MPN)

Il metodo dei tubi multipli fornisce una stima statistica della densità batterica del campione analizzato. Si basa infatti sulla combinazione dei tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido.

Nei metodi in terreno liquido, l'aliquota da saggiare viene inoculata in un terreno di crescita formulato per stimolare lo sviluppo degli organismi bersaglio e per sopprimere lo sviluppo di tutti gli altri organismi (flora interferente). La natura selettiva del terreno è rafforzata dalla scelta di una temperatura e di un tempo di incubazione idonei. Se l'organismo bersaglio è presente nell'aliquota di campione, si produrrà normalmente un segnale positivo, indipendentemente dalla quantità/concentrazione iniziale.

Nella forma più semplice, un metodo di crescita in terreno liquido dà un'informazione del tipo presenza/assenza. Per ottenere un'informazione semi-quantitativa, si esamina invece, con la tecnica del Numero Più Probabile (MPN), una serie di volumi generalmente scalari in replica. La precisione di questo metodo è bassa (ad es., l'intervallo di confidenza del 95% di un'analisi con l'MPN a cinque repliche si trova approssimativamente tra un terzo del risultato analitico e tre volte il medesimo). Tuttavia l'imprecisione del metodo può essere evitata aumentando il numero di inoculi in parallelo con conseguente aumento della precisione che è inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero di inoculi in parallelo.

I volumi di acqua che possono essere esaminati con questa tecnica sono ridotti in considerazione delle difficoltà tecniche di preparazione e distribuzione di aliquote elevate del campione di acqua da esaminare. Comunque la tecnica dell'MPN è ancora particolarmente consigliabile per l'analisi di acque con particolato in sospensione, di fanghi, sedimenti e sabbie.

1.1.2. Conteggio delle colonie

Nella forma più semplice, il metodo di conta diretta si esegue inoculando un'aliquota nota di campione sulla superficie di un terreno di coltura agarizzato selettivo o non selettivo (metodo della semina in superficie). Ogni singola cellula dell'organismo bersaglio si moltiplicherà formando una colonia visibile ad occhio nudo. I risultati di questo tipo di analisi sono espressi pertanto come la concentrazione (numero) di unità che formano una colonia (UFC) per unità di volume. Si accetta che ogni UFC rappresenti una o più cellule dell'organismo bersaglio nel campione originario e che, pertanto, la conta riporti direttamente il numero di batteri presenti. L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, quindi, che il numero delle colonie cresciute sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie compreso generalmente tra 20 e 80 e non superiore a 200 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato.

Un'elaborazione del metodo è rappresentata dal metodo della semina per inclusione, in cui un'aliquota nota di campione viene miscelata al terreno di coltura agarizzato liquefatto e incubato dopo solidificazione. L'ulteriore evoluzione del metodo ha condotto all'uso del metodo di filtrazione su membrana (MF), in cui l'aliquota viene filtrata attraverso una membrana (generalmente con porosità nominale di 0,45 µm) successivamente posta sul terreno di coltura agarizzato in capsula di Petri. In particolare, la metodica della filtrazione si adatta a tutti i tipi di acqua, tranne che a quelle particolarmente torbide. Consente di ottenere risultati in tempi più brevi (24÷48 ore) rispetto a quelli richiesti con il metodo del numero più probabile (24÷96 ore); inoltre permette di esaminare anche grandi volumi di acqua di buona qualità.

A volte non basta inoculare semplicemente un'aliquota di campione nel terreno di coltura o sulla sua superficie, per ottenere risultati precisi. Le cellule degli organismi bersaglio possono

essere danneggiate e può essere necessario rivitalizzarle prima di metterle a contatto col terreno di coltura selettivo. Tale procedura, indicata come rivitalizzazione, può essere parte integrante del metodo di controllo e implica generalmente l'incubazione in un terreno di coltura meno selettivo e/o a una temperatura meno stressante.

Spesso può risultare necessario confermare i risultati presuntivi positivi tramite uno o più prove di conferma o perfino procedere all'identificazione del genere, della specie o del sierotipo.

A determinare il livello necessario di conferma e di identificazione degli isolati sono comunque gli obiettivi dell'analisi.

1.2. Metodi rapidi

Requisito essenziale per un metodo rapido è quello di fornire risultati nel più breve tempo possibile. Una maggiore rapidità nella risposta rispetto ai metodi analitici più tradizionali dà l'indubbio vantaggio di ottenere in tempi più brevi il segnale dell'eventuale presenza di una contaminazione, requisito prioritario in un contesto di prevenzione e tutela della salute pubblica.

Per i patogeni e per i batteri indicatori di contaminazione fecale, l'ideale sarebbe avere i risultati dell'analisi almeno nello stesso giorno del prelievo del campione.

Al momento attuale, numerosi sono i metodi cosiddetti rapidi disponibili in commercio ed alcuni, ancora più rapidi, sono considerati metodi di *early warning*, avviso preventivo.

Gran parte dei metodi con questa caratteristica, attualmente disponibili, sono stati elaborati per la determinazione degli indicatori di contaminazione fecale e spesso sono basati sullo stesso principio. Nella maggior parte dei casi sono in grado di fornire il risultato dell'analisi entro 18-24 ore, alcuni perfino entro 10-12 ore e, rispetto ai metodi tradizionali, che necessitano della conferma degli isolati - con conseguente allungamento dei tempi della risposta (48÷72 ore o oltre) - hanno generalmente maggiore specificità, precisione e sensibilità e non richiedono lo svolgimento di prove di conferma.

Negli ultimi venti anni sono stati sviluppati diversi nuovi metodi che si basano sulla tecnica della filtrazione per membrana, del numero più probabile o di Presenza/Assenza e che sfruttano, in genere, l'attività metabolica di specifici enzimi cellulari dei batteri. Enzimi come β -D-galattosidasi, β -D-glucuronidasi, β -D-glucosidasi e amino-peptidasi sono quasi esclusivi dei batteri coliformi, di *Escherichia coli*, degli enterococchi e di *Pseudomonas aeruginosa*, rispettivamente. L'uso di specifici substrati, tramite l'idrolisi enzimatica di sostanze cromofore o fluorofore, permette di selezionare i microrganismi ricercati senza necessità di svolgere ulteriori prove per la conferma dell'appartenenza al genere o alla specie.

Sebbene negli anni più recenti si siano moltiplicati i metodi enzimatici che usano la tecnica della filtrazione su membrana, quelli che hanno avuto riconoscimenti ed approvazioni ufficiali da enti di normalizzazione (ISO, AOAC) o che sono stati standardizzati a livello nazionale sono stati i metodi ad inoculo multiplo (MPN). Rispetto alla tecnica MPN più classica, le nuove tecniche prevedono l'aumento del numero di inoculi del campione in parallelo, con conseguente aumento della precisione che diventa equiparabile o anche superiore a quella della tecnica di conta diretta. La caratteristica di queste tecniche è la miniaturizzazione a pozzetti e la facilità di esecuzione e di lettura dei risultati che sono comunque meno soggetti ad un'interpretazione arbitraria da parte degli operatori.

Tra questi metodi, il DST® a multi-pozzetto è, al momento attuale, il metodo riconosciuto per l'analisi delle acque potabili in Danimarca, Germania, Gran Bretagna, Islanda, Italia, Norvegia, Repubblica Ceca, Svizzera e in altri 19 paesi nel mondo. Inoltre è stato approvato da organizzazioni quali l'USEPA e l'AOAC. Il metodo consente di determinare contemporaneamente, alla stessa temperatura di incubazione, coliformi ed *E. coli* entro 18-22 ore. La tecnica è estremamente facile da applicare e richiede l'aggiunta del campione alla polvere disidratata che contiene orto-nitrofenil- β -D-galattosidasi (ONPG) e 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronidasi (MUG). Lo sviluppo di un colore giallo è considerato come reazione positiva per i coliformi, mentre un colore blu fluorescente sotto la lampada di Wood (ultravioletto) conferma la presenza di *E. coli*. Lo stesso principio viene applicato per la

determinazione degli enterococchi in 24 ore con l'uso di un substrato che contiene il 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside (MUD). Un metodo analogo, ma miniaturizzato a 96 pozzetti, utile alla determinazione in acque superficiali di *E. coli* e degli enterococchi separatamente, è stato approvato dall'ISO nel 1998 ed è attualmente utilizzato in Francia.

Tra i metodi di Presenza/Assenza basati sull'attività enzimatica dei batteri, un metodo semi-automatico di *early warning* permette l'analisi contemporanea di 80 campioni. È idoneo per il rilevamento di coliformi, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Comparato, con risultati promettenti, con i metodi standardizzati attualmente indicati per l'analisi delle acque destinate al consumo umano dà la possibilità di ottenere risultati in meno di 1 ora con concentrazioni di coliformi superiori a 1000 UFC/100 mL, mentre in 10 ore consente di rilevare concentrazioni di *E. coli* variabili tra 1 e 5 UFC/100 mL.

1.3. Metodi molecolari

I passi avanti della biologia molecolare negli ultimi 20 anni hanno portato allo sviluppo di nuovi metodi di ricerca dei microrganismi nelle acque basati sulla individuazione di specifiche sequenze geniche. Ad esempio, è possibile dimostrare la presenza di sequenze significative del genoma o di specifici RNA ribosomiali grazie all'ibridazione con idonee sonde molecolari (sequenze nucleotidiche complementari a tratti specifici del genoma) seguite da reazione di polimerizzazione a catena (PCR, Polymerase Chain Reaction). Con lo sviluppo dell'amplificazione genica (PCR) sono stati raggiunti livelli di sensibilità mai ottenuti con le altre tecniche di rilevazione tradizionali. Tali metodi sono usualmente rapidi e possono essere applicati per la ricerca sia di specifici patogeni che di gruppi di microrganismi.

I metodi molecolari potranno avere nel futuro, un sempre maggiore impiego nel controllo della qualità delle risorse idriche utilizzate a scopo idropotabile, rappresentando una valida alternativa ai metodi di ricerca diretti basati sulla coltivazione in idonei substrati, soprattutto se si pensa a organismi non facilmente coltivabili o a situazioni di verifica di contaminazione da atti di sabotaggio o bioterrorismo.

1.3.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR è una reazione di amplificazione in vitro di un segmento specifico di DNA, ottenuta per mezzo di una DNA polimerasi a partire da una coppia di primer specifici. Con questo metodo piccole quantità di DNA possono essere selettivamente moltiplicate. In breve, una singola copia della sequenza specifica scelta in questo saggio può produrre più di un milione di identiche copie di DNA che possono poi essere individuate impiegando differenti metodi. Questo metodo è stato efficientemente messo a punto per la ricerca di diversi patogeni nelle acque e sono addirittura disponibili kit commerciali come, ad esempio, quello per la ricerca di *Legionella* in campioni di acqua.

La PCR può essere usata come metodo standard oppure venire modificata a semi-nested oppure nested PCR. Entrambi questi protocolli, dove una seconda reazione di PCR è sviluppata usando primer addizionali, migliorano l'efficienza di individuazione delle sequenze geniche attraverso ulteriori amplificazioni del DNA già amplificato. La PCR può inoltre essere impiegata per la ricerca, dopo retrotrascrizione (RT), di RNA messaggeri (mRNA) la cui presenza è indice della vitalità di un microrganismo. Infatti, il DNA è stabile in ambiente anche dopo la morte del microrganismo e quindi la sua presenza non è utilizzabile come indice di vitalità. Protocolli di RT-PCR sono stati messi a punto per la ricerca di protozoi e virus enterici nelle acque.

Uno dei problemi legati all'utilizzo della PCR è rappresentato dal fatto che, poiché questo metodo viene impiegato per ricercare microrganismi normalmente presenti in piccole quantità, i volumi di campione da utilizzare per l'analisi possono variare tra i 100-1000 ml, mentre per la reazione di PCR possono essere impiegati solo pochi microlitri di campione. Per ovviare a questo problema sono stati utilizzati diversi metodi di concentrazione che, però aumentano

anche la quantità di sostanze inibitrici della PCR (esempio, acidi umici e fulvici) presenti nei campioni d'acqua.

I vantaggi della PCR risiedono nella elevata sensibilità, rapidità ed accuratezza del metodo. La PCR è, inoltre, una tecnica altamente specifica e di facile applicazione che permette di analizzare più campioni contemporaneamente; il costo è relativamente contenuto e dà la possibilità di evitare reazioni crociate eliminando i falsi positivi. Tuttavia questo metodo permette di effettuare solo una valutazione di tipo qualitativo.

Sono stati sviluppati anche metodi per quantificare i prodotti di PCR (Real Time-PCR) che, però, attualmente sono piuttosto costosi, non ancora standardizzati e richiedono personale specializzato. La PCR real-time consente di seguire l'accumulo del prodotto di PCR continuamente durante la reazione di amplificazione stessa. Con questa tecnica si possono impiegare diversi reagenti fluorescenti che, legando in modo specifico o aspecifico il DNA, permettono di seguire l'accumulo del prodotto di PCR mediante la misurazione di un segnale specifico in emissione. Se si utilizzano sonde a DNA il segnale emesso in seguito all'ibridazione della sonda sulla sua sequenza omologa corrisponde in modo specifico all'amplificazione del target: in altre parole, ogni evento di polimerizzazione dell'acido nucleico target (virale o microbico) è testimoniato dal rilascio in soluzione di una determinata quantità di fluorescenza della lunghezza d'onda di emissione tipica della sonda.

1.3.2. Ibridazione con sonde

Le tecniche di ibridazione si basano sul fatto che il DNA è una molecola a doppia elica (duplex) che può essere denaturata reversibilmente con alcali o calore. La reazione di riassociazione è molto specifica e dipende dalla complementarità delle due catene polinucleotidiche. Sequenze di DNA possono quindi essere riconosciute utilizzando una sonda (probe) polinucleotidica complementare a tratti specifici del genoma che si voglia individuare (bersaglio o target). La sonda si legherà in maniera specifica al bersaglio (preventivamente denaturato) e formerà con esso un DNA duplex ibrido, che potrà essere riconosciuto se la sonda è stata marcata con un rivelatore (tracciante) della reazione (esempio, enzimi o isotopi radioattivi). Questo tipo di saggio viene, ad esempio, impiegato per la ricerca degli enterovirus. Uno dei principali limiti delle sonde molecolari è quello di non poter distinguere tra particelle virali infettanti e non, inoltre la sensibilità delle sonde è troppo bassa per la rilevazione di virus in acque scarsamente contaminate. Una tipologia particolare di ibridazione con sonde è rappresentato dalla FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*). Questo metodo implica l'uso di sonde geniche legate a marker fluorescenti, solitamente in grado di appaiarsi all'RNA ribosomale 16S (16S rRNA). I microrganismi concentrati e fissati sono permeabilizzati e miscelati con la sonda. La temperatura di incubazione e l'aggiunta di composti chimici può influenzare il legame tra la sonda e la sequenza target. Poiché il segnale proveniente da una singola molecola di DNA fluorescente all'interno di un microrganismo non ne permette l'individuazione, è necessario selezionare una sequenza target con copie multiple nella cellula. Diversi metodi basati su questo protocollo sono stati sviluppati per la ricerca di coliformi ed enterococchi.

Sebbene vi siano risultati controversi per alcuni patogeni, in condizioni di stress, i microrganismi possono entrare in uno stadio vitale, non replicativo e non coltivabile (VNC). Recenti studi hanno permesso di concludere che i metodi basati sulla PCR e sulla FISH possono meglio evidenziare, rispetto ai metodi tradizionali, la presenza di patogeni e indicatori batterici vitali, anche nello stadio VNC.

Bibliografia

APHA. Standard methods for examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WPCF, 19 ed. Washington DC. 1998.

Bonadonna L. Rapid analysis of microbial contamination of water. In: Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance. I.E. Tothill Ed. Woodhead, 2003, pp. 161-182.

Dalla Valle, J.M. Notes on the Most Probable Number index as used in bacteriology. Publ. Health Rep., 1941, 58: 299.

Dutka, B.D. Membrane filtration applications. Techniques and problems. Marcel Dekker, Inc, New York 1981.

Analisi microbiologica degli alimenti e dell'acqua. Lineeguida per l'assicurazione di qualità. Lightfoot, N. F. and Maier, E. A. (eds.) 2002, La Goliardica Pavese, Pavia.