

DETERMINAZIONE DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

0. Generalità e definizioni

I microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* sono batteri a forma di bastoncino diritto o leggermente ricurvo, con lunghezza di $1,5\pm 3$ μm e larghezza compresa tra 0,5 e 0,7 μm , motili tramite uno o più flagelli polari, Gram negativi, aerobi, citocromossidasi e catalasi positivi, capaci di produrre ammonio da acetamide, con metabolismo respiratorio ma in grado anche di utilizzare i nitrati come accettori di elettroni alternativi all'ossigeno. La maggioranza dei ceppi cresce a 42°C ma non a 4°C. *Ps. aeruginosa* si caratterizza per la produzione di pigmenti: piocianina, prodotta solo da *Ps. aeruginosa*, solubile in acqua, di colore verde-blu, piorubina, insolubile in acqua, di colore rossastro-marrone e fluoresceina o pioverdina, solubile in acqua, di colore dal giallo-verde al giallo-bruno e fluorescente all'ultravioletto. Più del 90% dei ceppi produce piocianina e un rapporto inversamente proporzionale sembra esistere tra i tassi di crescita e la produzione di piocianina; infatti, a decrementi del tasso di crescita corrisponderebbero incrementi nella produzione di questo pigmento. *Pseudomonas aeruginosa* è un microrganismo caratterizzato da una elevata capacità di adattamento. Si rileva in acque superficiali, reflue e marine, suoli, vegetazione e in generale, in tutti gli ambienti umidi. Inoltre, è in grado di crescere in acqua distillata e di sopravvivere nei disinfettanti. Si moltiplica facilmente, raggiungendo concentrazioni elevate, anche nelle acque oligotrofe dove la sua presenza è comunque difficilmente correlabile a quella degli indicatori di contaminazione fecale. Rappresenta uno dei microrganismi tipici dei biofilm. Infatti, è in grado di aderire a superfici umide o in contatto con liquidi grazie alla produzione, da parte di ceppi mucoidi o non mucoidi, di lipopolisaccaridi e glicoproteine extracellulari. È un microrganismo prettamente ambientale e per questo rilevabile anche in acque sotterranee e in acque potabili dove può essere riscontrato in concentrazioni ampiamente variabili. In particolare, è facilmente rilevabile in condizioni di stagnamento di acqua ed è in grado di installarsi nei serbatoi, nei rompigitto dei rubinetti e nelle apparecchiature ad uso domestico per il trattamento di acque potabili, raggiungendo cariche batteriche elevate. Generalmente, nelle acque clorate *Ps. aeruginosa* viene evidenziato quando la concentrazione di cloro residuo è inferiore a 1 mg/L. La sua presenza è di norma considerata indice di cattiva procedura di confezionamento delle acque messe in vendita in bottiglia o in contenitori dove, se presente, è in grado di moltiplicarsi. In acque minerali imbottigliate il gruppo delle pseudomonadacee, incluso *Ps. aeruginosa*, risulta essere il gruppo microbico dominante. *Pseudomonas aeruginosa* si caratterizza anche per essere multi-resistente agli antibiotici, rappresentando quindi un rischio per la salute in ambienti ospedalieri dove può provocare infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite, ulcere corneali e cheratiti, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, broncopolmoniti e meningiti. La sua attività patogena è dovuta alla sua capacità invasiva e alla produzione di sostanze extracellulari, quali alcune proteasi, tossine emolitiche, enterotossine e la tossina letale, esotossina A. In aree ad elevata frequenza di infezioni nosocomiali (es., cardiocirurgia), può essere responsabile del 14,5% del totale delle infezioni. Risulta quindi essere un tipico patogeno opportunisto. Gli studi più recenti hanno comunque messo in evidenza che non esistono evidenze epidemiologiche che permettano di correlare la presenza di *Ps. aeruginosa* nelle acque potabili con malattie di natura gastroenterica nella popolazione sana, anche per l'alta dose infettante richiesta per produrre la malattia, 10^9 organismi nei soggetti immunocompetenti. Spesso quindi le infezioni causate da *Ps. aeruginosa* vengono correlate prevalentemente a contatto con acqua contaminata, e sono quindi segnalate in associazione a frequentazione di piscine e uso di soluzioni per lenti a contatto. In questi casi, il microrganismo è quindi considerato responsabile di infezioni cutanee, otiti e infezioni oculari. Negli ultimi anni sono stati formulati metodi rapidi per la ricerca della specie *Pseudomonas aeruginosa* basati sulla presenza dell'enzima amino-peptidasi che non necessitano dello svolgimento di prove di conferma. I metodi più classici hanno alcuni limiti legati soprattutto dalla necessità di

svolgere elaborate e lunghe prove addizionali per l'accertamento dell'appartenenza al genere, con conseguente allungamento dei tempi di risposta delle analisi.

La ricerca di *Ps. aeruginosa* nelle acque destinate al consumo umano in distribuzione ha una rilevanza legata prevalentemente alla verifica dell'efficacia del trattamento a cui sono soggette le acque. Il parametro è inserito tra quelli indicati nell'Avvertenza dell'Allegato I del Decreto Legislativo n. 31 del 2001 e successive modifiche ed integrazioni (Avvertenza) e va interpretato quindi come indicatore di qualità delle acque potabili in rete. Diversamente, il suo inserimento nella Parte A dell'Allegato I dello stesso decreto impone lo svolgimento di controlli del grado di protezione dell'acqua dall'ambiente esterno durante il confezionamento di acque imbottigliate anche per la verifica del mantenimento di condizioni di buona qualità dell'acqua durante la conservazione. In questo caso, come patogeno opportunisto in grado di moltiplicarsi in condizioni statiche dell'acqua, *Ps. aeruginosa* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano messe in vendita in bottiglia o in contenitori.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento di *Pseudomonas aeruginosa* nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano e nelle acque ad uso ricreativo (piscine).

2. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno culturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 40-48 ore, contare le colonie tipiche e sottoporle a conferma: colonie che producono piocianina sono considerate confermate; colonie fluorescenti o marrone-rossastro richiedono conferma.

Il metodo fa riferimento alla norma UNI EN 12780:2002.

La stessa procedura analitica è applicabile per la ricerca di *Ps. aeruginosa* nelle acque di piscina.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1) è necessario avere a disposizione una lampada di Wood con lunghezza d'onda di 360 ± 20 nm.

4. Terreni di coltura e reagenti

4.1. Terreno di isolamento

4.1.1. Terreno di base *Pseudomonas* agar/CN

Composizione		
Peptone gelatina	16	g
Caseina idrolisata	10	g
Solfato di potassio anidro	10	g
Cloruro di magnesio anidro	1,4	g
Glicerolo	10	mL

Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 min. Raffreddare a $50\pm 5^{\circ}\text{C}$. Aggiungere il supplemento (4.1.2.).

4.1.2. Supplemento CN

Composizione		
Cetrimide (cetiltrimetilammonio bromuro)	0,2	g
Acido nalidixico	15	mg

Il supplemento è disponibile in commercio. Ricostituire in 2 mL di acqua distillata sterile. Aggiungere il supplemento asepticamente a 1 L di terreno di base (4.1.1.) raffreddato e mescolare. Il prodotto è classificato come T - Tossico per la presenza di acido nalidixico. È pericoloso per contatto, inalazione e ingestione. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che il prodotto potrebbe avere effetti cancerogeni (R45) e causare danni genetici (R46). Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

4.1.3. Terreno completo *Pseudomonas* agar/CN

Composizione		
Terreno di base	1000	mL
<i>Pseudomonas</i> agar/CN		
Supplemento CN	2	mL
pH $7,1\pm 0,2$		

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (4.1.1.) 2 mL di supplemento (4.1.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e, rispettando le comuni regole di asepsi, distribuire in capsule di Petri. Non mantenere fuso il terreno per più di 4 ore.

Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ a riparo dalla luce per non più di un mese in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 o NCTC 10332 e come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922 o NCTC 9001; in ogni caso, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2. Terreni di conferma

4.2.1. Terreno B di base di King

Composizione		
Peptone	20	g
Dipotassio idrogeno fosfato	1,5	g
Magnesio solfato eptaidrato	1,5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Aggiungere glicerolo (4.2.2.).

4.2.2. Glicerolo

4.2.3. Terreno B completo di King

Composizione		
Terreno B di base di King (4.2.1.)	1000	mL
Glicerolo (4.2.2.)	10	mL
pH 7,2±0,2		

Aggiungere a 1 L di terreno di base (4.2.1.) 10 mL di glicerolo (4.2.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e, rispettando le comuni regole di asepsi, distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15 min. Conservare a 5±3°C a riparo dalla luce per non più di tre mesi in condizioni ottimali.

Per controlli di produttività è consigliabile utilizzare *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207; in ogni caso, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2.4. Brodo all'acetamide – Soluzione A

Composizione		
Potassio diidrogeno fosfato	1	g
Magnesio solfato anidro	0,2	g
Acetamide	2	g
Sodio cloruro	0,2	g
Acqua distillata	900	mL
pH 7,0±0,5		

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata.

La soluzione è tossica per la presenza di acetamide. Il prodotto potrebbe avere effetti cancerogeni (R45) e mutageni. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

Evitare il contatto con sostanze infiammabili, acidi e basi forti.

4.2.5. Brodo all'acetamide – Soluzione B

Composizione		
Sodio molibdato	0,5	g
Ferro solfato	0,05	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata.

4.2.6. Brodo all'acetamide – Soluzione completa

Composizione		
Soluzione A (4.2.4.)	900	mL
Soluzione B (4.2.5.)	1	mL
Acqua distillata		

Aggiungere a 900 mL di soluzione A (4.2.4.) 1 mL di soluzione B (4.2.5.) e portare a volume di 1 L con acqua distillata mescolando continuamente. Distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15 min. Conservare a 5±3°C a riparo dalla luce per non più di tre mesi in condizioni ottimali.

4.2.7. Agar Nutritivo

Composizione		
--------------	--	--

Estratto di carne	1	g
Peptone	5	g
Estratto di lievito	2	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15 min.

Conservare a riparo dalla luce a 5±3°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

4.3. Reagenti

4.3.1. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

4.3.2. Reattivo di Nessler

Composizione		
Cloruro di mercurio	10	g
Potassio ioduro	7	g
Idrossido di sodio	16	g
Acqua distillata		

La soluzione è anche disponibile in commercio; in alternativa sciogliere il cloruro di mercurio e lo ioduro di potassio in un volume ridotto di acqua distillata. Mescolando, aggiungere lentamente la soluzione all'idrossido di sodio disciolto in 50 mL di acqua distillata. Portare a volume di 100 mL. Conservare in bottiglie di vetro borosilicato con tappo di gomma a riparo dalla luce per non più di un anno.

La soluzione è tossica per la presenza di cloruro di mercurio. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 250 mL o 100 mL, è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

5.2. Filtrazione ed incubazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume 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 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno di isolamento (4.1.3.) e procedere all'incubazione a 36±1°C per 40-48 ore.

5.3. Identificazione delle colonie

Verificare dopo 22±2 ore e dopo 44±4 ore la crescita di colonie tipiche sul terreno di isolamento (4.1.3.). *Ps. aeruginosa* può sviluppare colonie di colore verde-blu che producono piocianina, fluorescenti e marrone-rossastro.

Contare tutte le colonie di colore verde-blu e considerarle come colonie confermate di *Ps. aeruginosa*. Sottoporre a conferma le colonie risultate fluorescenti (*Ps. aeruginosa* presuntivo) alla lampada di Wood, procedendo alla verifica della produzione di ammonio da acetamide, e quelle che hanno prodotto un pigmento di colore marrone-rossastro (*Ps. aeruginosa* presuntivo), procedendo all'esecuzione delle prove relative alla produzione di ammonio da acetamide, alla verifica della presenza della citocromossidasi, alla produzione di fluorescenza. Circa il 10% dei biotipi di *Ps. aeruginosa* non produce pigmento.

Non esporre troppo a lungo le colonie alla luce ultravioletta onde evitare danni ai microrganismi che potrebbero essere resi non vitali, inficiando quindi le prove successive.

6. Conferma

Per la verifica dell'appartenenza alla specie *Pseudomonas aeruginosa* è necessario procedere allo svolgimento delle seguenti prove di conferma per le colonie risultate fluorescenti alla lampada di Wood: verifica della produzione di ammonio da acetamide e, come prove aggiuntive opzionali, verifica della presenza della citocromossidasi e verifica della crescita a 42°C.

Per le colonie di colore marrone-rossastro è necessario procedere allo svolgimento delle seguenti prove di conferma: verifica della produzione di ammonio da acetamide, verifica della presenza della citocromossidasi, crescita sul terreno B di King con produzione di fluorescenza alla lampada di Wood; come prova aggiuntiva opzionale, è consigliabile la verifica della crescita a 42°C.

È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare ciascuna prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare, preferibilmente, tutte o comunque un numero rappresentativo di colonie sospette su Agar Nutritivo (4.2.7.) incubando a 36±1°C per 22±2 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

6.1. Verifica della produzione di ammonio

Sottoporre alla verifica della produzione di ammonio le colonie fluorescenti e quelle che hanno prodotto un pigmento marrone-rossastro.

Inoculare ciascuna colonia sospetta cresciuta su Agar Nutritivo (4.2.7.) in un tubo contenente il Brodo all'acetamide (4.2.6.) e incubare a 36±1°C per 22±2 ore. Dopo incubazione aggiungere 1-2 gocce di Reattivo di Nessler (4.3.2.) e verificare la produzione di ammonio che si manifesta con una colorazione compresa tra il giallo e il rosso-mattone.

Le colonie risultate sia fluorescenti sul terreno di isolamento (4.1.3.) sia positive per la produzione di ammonio sono confermate come *Ps. aeruginosa*.

Procedere alle successive prove di conferma per le colonie con pigmento marrone-rossastro e positive per la produzione di ammonio.

6.2. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti alla specie *Ps. aeruginosa* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. Prelevare dall'Agar Nutritivo (4.2.7.), seguendo le usuali

regole di asepsi, con un'ansa sterile le colonie che, in primo isolamento, avevano prodotto un pigmento marrone-rossastro e strisciarle su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.3.1.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. I microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi. Una reazione negativa si manifesta con il mancato sviluppo di colore. *Ps. aeruginosa* è citocromossidasi-positivo come anche le altre specie di *Pseudomonas*.

6.3. Verifica della produzione di fluorescenza

Seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, prelevare dall'Agar Nutritivo (4.2.7.) le colonie che, in primo isolamento, avevano prodotto un pigmento marrone-rossastro e che sono risultate citocromossidasi-positive e isolarle sul terreno B di King.

Incubare fino a 5 giorni a $36\pm 1^\circ\text{C}$, sebbene l'eventuale positività della prova sia, generalmente, già evidenziabile dopo 24 ore di incubazione.

Dopo incubazione, osservare, con la lampada di Wood, la produzione di fluorescenza e registrare come positive per *Ps. aeruginosa* tutte le colonie fluorescenti.

Le colonie con pigmento marrone-rossastro in primo isolamento, citocromossidasi-positive e fluorescenti sul terreno B di King sono da considerarsi confermate come *Ps. aeruginosa*.

6.4. Prova della crescita a 42°C

Prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta, strisciarla su Agar Nutritivo (4.2.7.) e incubare a $43\pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore. I microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* sono in grado di crescere a questa temperatura di incubazione; pertanto, il risultato è positivo quando si ha lo sviluppo della colonia.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332 o ATCC 9027 e come controllo negativo *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525; in ogni caso, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

7. Espressione dei risultati

Dal numero di colonie tipiche contate sulla membrana, e tenendo conto delle colonie confermate, calcolare il numero di *Pseudomonas aeruginosa* presenti in uno specifico volume di campione.

Per le acque destinate al consumo umano messe in vendita in bottiglie o contenitori e per quelle in distribuzione, riportare il numero di *Pseudomonas aeruginosa* come UFC/250 mL (Unità Formanti Colonia). Per le acque destinate al consumo umano in distribuzione è, in alternativa, possibile esprimere il risultato come *Pseudomonas aeruginosa* Presente o Assente/250 mL; per le acque di piscina il valore deve essere riferito a 100 mL.

Calcolare il numero di microrganismi presenti secondo la seguente formula:

$$C = [P + F (cF/nF) + R (cR/nR)] \times \frac{V_t \times F}{V_s}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie confermate in 100 mL o 250 mL
<i>P</i>	numero di colonie verde-blu
<i>F</i>	numero di colonie fluorescenti
<i>R</i>	numero di colonie marrone-rossastro
<i>cF</i>	numero di colonie fluorescenti risultate positive per la produzione di ammonio
<i>nF</i>	numero di colonie fluorescenti saggiate per la produzione di ammonio
<i>cR</i>	numero di colonie marrone-rossastro risultate positive per la produzione di ammonio, la citocromossidasi e la fluorescenza sul terreno B di King

nR	numero di colonie marrone-rossastro saggate per la produzione di ammonio, la citocromossidasi e la fluorescenza sul terreno B di King
V_t	volume di campione analizzato (in mL)
V_s	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 o 250 mL)
F	fattore di diluizione

Bibliografia

Allen M, Edberg S, and Reasoner D. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria – What is their significance in drinking water? In: Proceedings of the NFS International/WHO Symposium on Bacteria in drinking water. Public health implications? Geneve, 2002.

Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B., McCarty M. Trattato di Microbiologia, Piccin Editore, Padova, 1981: 900 - 902.

UNI EN 12780: 2002. Qualità dell'acqua - Ricerca e conteggio di *Pseudomonas aeruginosa* attraverso la filtrazione su membrana.