



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

# UIBM

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>101996900528114</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>27/06/1996</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>27/12/1997</b>

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	02	F		

Titolo

PROCEDIMENTO PER LA RAPIDA RILEVAZIONE IN UN CAMPIONE DELLA PRESENZA DI CELLULE BATTERICHE ANCHE SE IN NUMERO LIMITATISSIMO.

## DESCRIZIONE

del Brevetto per Invenzione Industriale avente per titolo:

"Procedimento per la rapida rilevazione in un campione della presenza di cellule batteriche anche se in numero limitatissimo"

a nome ISRIM S. C. a r.l.

Inventori: Dr. Roberto Pistoiesi, Dr. Lucilla Di Marco, Dr. Martino Vecchio

oooOooo

La presente invenzione ha per oggetto un procedimento per la rapida rilevazione in un campione della presenza di cellule batteriche anche se in numero limitatissimo.

Il procedimento è particolarmente destinato alle acque per uso umano e alle acque che devono essere scaricate in corpi idrici superficiali e in pubbliche fognature ed è relativamente a tale compito che esso sarà meglio descritto anche a mezzo di esempi.

E' noto che relativamente alle acque l'inquinamento batterico potenzialmente più pericoloso per la salute dell'uomo, è quello causato da batteri di origine animale quali Salmonelle, Streptococ-



chi ecc., i quali possono essere determinati rilevando altri batteri solitamente a essi associati in caso di contaminazione fecale della quale tali altri batteri sono sicura indicazione. Tali batteri sono prevalentemente costituiti dai generi Escherichia coli, Klebsiella, Citrobacter e Enterobacter appartenenti al gruppo dei coliformi che viene arbitrariamente distinto in Coliformi Totali e Coliformi Fecali, riconoscendo nei Totali i Coliformi diffusi sugli strati superficiali del suolo e delle acque e nei Fecali la Specie Escherichia coli caratterizzata da una minore resistenza e possibilità di sopravvivenza nell'ambiente esterno rispetto ai Totali.

#### **Stato dell'arte delle metodologie analitiche note**

Le metodologie analitiche per l'analisi dei coliformi fino ad oggi sviluppate possono dividersi in metodologie tradizionali e in metodologie innovative.

#### **Metodologie tradizionali:**

Tra le metodologie tradizionali si evidenziano principalmente due test ampiamente utilizzati e diffusi che si basano essenzialmente su due elementi:

- l'uso di terreni contenenti sostanze nutritive



ed agenti selettivi che permettono la crescita numerica esclusivamente dei batteri coliformi, valutabile come torbidità o sviluppo di colonie;

- l'uso di lattosio per indurre, durante la crescita dei batteri coliformi, la sintesi di  $\beta$ -Galattosidasi, rilevabile come sviluppo di gas.

1) Metodo del calcolo del numero più probabile  
(MPN)

Il test analitico si basa sull'uso di un primo terreno colturale nutritivo, non selettivo contenente lattosio (brodo lattosato). Il campione da analizzare viene seminato tal quale su provette e beute contenenti brodo lattosato a doppia concentrazione ed incubato a 37°C per 24-48 ore; dopo tale periodo la positività viene evidenziata da presenza di torbidità dovuta a crescita batterica accompagnata da produzione di gas quale indicazione di attività fermentativa del lattosio. Le provette e la beuta risultanti positivi vanno confermati per la presenza di coliformi: un'aliquota del brodo risultato positivo viene seminata su due serie di provette (contenenti un terreno nutritivo, selettivo per la presenza di verde brillante ed acidi biliari e lattosio) ed incubato per altre 24-48 ore a 36±1°C e 44,5±0,2°C; le due temperature



utilizzate permettono la discriminazione tra coliformi totali e fecali.

La positività al test di conferma si evidenzia tramite osservazione di torbidità e presenza di gas. In base al numero delle positività ottenute e all'uso di tabelle predefinite, il risultato viene espresso come numero più probabile di cellule presenti nel campione (MPN).

## 2) Metodo delle membrane filtranti (MF)

Il metodo prevede la filtrazione del campione acquoso e la successiva incubazione del filtro su terreno nutritivo e selettivo agarizzato, contenente: lattosio, alcuni agenti selettivi come sali biliari, Sodio Dodecil Solfato, Tergitol 7, Teepol, acido rosolico e coloranti come fucsina basica o blu di anilina; questi ultimi risultano in grado di evidenziare le colonie capaci di svilupparsi su tali terreni.

Anche in questo caso le temperature di incubazione a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $44,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  vengono utilizzate per discriminare i coliformi totali dai fecali.

Il tempo necessario all'analisi è, per questa metodologia, di 24 ore e non occorre procedere al test di conferma. La positività al test si evidenzia tramite osservazione e conteggio delle



colonie sviluppatesi.

Pertanto sembra possibile individuare il limite dei metodi tradizionali nei lunghi tempi di incubazione che vanno da un minimo di 24 ad un massimo di 96 ore i quali tempi sono necessari per rendere visibile la crescita cellulare e l'induzione di  $\beta$ -Galattosidasi, con lo sviluppo di torbidità, la formazione di colonie o la produzione di gas.

A causa dei lunghi tempi necessari all'esecuzione del test i sistemi tradizionali non risultano compatibili con le esigenze igienico-sanitarie di rapidità di risposta. Pertanto risulta molto forte la richiesta di nuovi metodi rapidi capaci di valutare la qualità sia di un refluo che di un'acqua potabile.

Le nuove metodologie, riportate nello "Standard methods" (American Public Health Association), tentano prevalentemente di soddisfare l'esigenza di rapidità di risposta e rientrano in due diverse categorie: quelle che apportano modifiche ai metodi tradizionali e quelle che richiedono strumentazione e materiali speciali.

In breve è sentita l'esigenza di poter disporre di metodi e sostanze innovativi che risolvono soddisfacentemente il problema.



I nuovi test realizzati ottimizzando metodi tradizionali sono ottenuti correggendo la composizione dei terreni di coltura agarizzati; in questi casi comunque i tempi di risposta rimangono eccessivamente lunghi o perlomeno non adatti alle richieste di rapidità di cui si è accennato.

Sono allora state ideate e messe in pratica delle metodologie innovative che si servono di strumentazione e materiali speciali che vengono di seguito elencate:

- Metodo radiometrico;
- Misura dell'attività della glutammico decarbossilasi;
- Metodi elettrochimici;
- Metodi spettrofluorimetrici;
- Misura dell'impedenza;
- Saggi Gas-cromatografici;
- Metodi colorimetrici
- Metodi potenziometrici.

La maggior parte di questi non sono sufficientemente sensibili per la loro adozione su acque potabili o non sono specifici; possono essere usati per reflui o acque superficiali ma richiedono reagenti costosi e personale specializzato a causa della loro complessità. Eccetto che per il metodo



colorimetrico tutti gli altri risultano incompatibili per analisi di routine e vengono pertanto utilizzati solo come strumenti di ricerca; comunque anche il test colorimetrico necessita di un tempo di risposta che va da un minimo di 8 a un massimo di 20 ore, tempo che risulta ancora incompatibile con le esigenze di rapidità del controllo igienico-sanitario.

L'attività di ricerca scientifica impegnata nello sviluppo di nuove metodologie vede il contributo di Berg e Fiksdal (1988) con la pubblicazione di un metodo basato, come nei sistemi tradizionali, sull'uso di un terreno nutritivo di crescita, selettivo per i coliformi, contenente lattosio ma in più arricchito con metilumbelliferil- $\beta$ -D-Galattoside (MUG), substrato fluoroforo per la  $\beta$ -Galattosidasi.

Campioni di acqua di fiume venivano filtrati per prelevare le cellule batteriche ed il filtro posto ad incubare a 35°C o 41,5°C nel terreno nutritivo; la positività al test poteva essere evidenziata dopo 15 minuti di incubazione misurando la fluorescenza liberata nel terreno dall'idrolisi del MUG, operata dalla  $\beta$ -Galattosidasi indotta. Il limite di sensibilità dichiarato era di 500 cellule



per filtro utilizzato nell'incubazione; pertanto la quantità minima di enzima misurabile veniva rapportata ad un numero minimo di 500 cellule incubate per 15 minuti.

In questa metodologia il sistema di rilevazione fluorimetrico si sostituisce ai parametri di rilevazione "torbidità" e "produzione di gas" permettendo, grazie alla alta sensibilità della fluorescenza, di evidenziare la presenza di cellule coliformi in tempi brevi. In ogni caso, come nei metodi tradizionali, le cellule sono poste in un ambiente nutritivo e selettivo dove solo i coliformi possono agevolmente moltiplicarsi; allo stesso modo la sintesi di  $\beta$ -Galattosidasi viene promossa nell'ambito del processo di duplicazione cellulare.

Più di recente, Apte e Batley (1994) hanno adottato la rilevazione fluorimetrica dei coliformi esclusivamente su campioni di acqua di mare; il saggio proposto veniva condotto aggiungendo al campione di acqua il sistema tamponante PIPES e il substrato fluoroforo MUG; il campione veniva incubato a 44,5°C per non meno di 60 minuti e ne veniva poi misurata la fluorescenza. Il limite di sensibilità dichiarato era di 100 cellule/100



ml di campione; in questo caso la quantità minima di enzima misurabile veniva rapportato ad un numero minimo di 100 cellule incubate per 60 minuti.

Gli Autori evidenziano come la presenza di nutrienti presenti naturalmente nell'acqua di mare siano da un lato indispensabili per raggiungere una buona sensibilità del sistema, dall'altro giustificativi del mancato utilizzo dei terreni nutritivi. Anche in questo caso pertanto, come nei metodi tradizionali, la sintesi di  $\beta$ -Galattosidasi viene promossa nell'ambito del processo di duplicazione cellulare.

Le metodologie proposte da Berg e Fiksdal e da Apte e Batley non hanno trovato alcuna applicazione tecnologica, sicuramente a causa della ancora bassa sensibilità e della applicabilità su una sola tipologia di campione. In ogni caso la sperimentazione di tali processi presso i laboratori della richiedente ha evidenziato una loro bassa riproducibilità accanto ad una sensibilità di molto lontana da quella dichiarata. Inoltre i risultati hanno evidenziato che entrambe le metodologie si basano sulla crescita numerica delle cellule batteriche poste in un ambiente altamente nutritivo; infatti il problema della impossibilità



di rilevare l'attività della  $\beta$ -Galattosidasi in campioni con pochi Coliformi verrebbe superato consentendo alle cellule di svilupparsi e di raggiungere quel numero minimo contenente la quantità minima di enzima rilevabile.

#### Il nuovo procedimento analitico

Nei laboratori della richiedente è stata inaspettatamente individuata una sostanza non nota in letteratura, in grado di incrementare sensibilmente l'attività  $\beta$ -Galattosidasica espressa dalla singola cellula coliforme, in un processo che non implica la duplicazione cellulare; questo fenomeno permette di ottenere una quantità minima di enzima rilevabile in presenza di un più basso numero di cellule.

La sostanza in questione in questa descrizione non sarà definita e descritta più dettagliatamente essendo oggetto di una precedente domanda di Brevetto della stessa richiedente.

Nel presente trovato la quantità di promotore dell'induzione viene definita in "unità arbitraria di attività" intendendo per unità quella quantità di promotore dell'induzione capace di promuovere in 1000 cellule la sintesi di quella quantità di  $\beta$ -Galattosidasi in grado di idrolizzare almeno



50 picomoli di MUG in 60 minuti con il procedimento sotto descritto.

Il sistema analitico proposto si basa sull'uso di tale sostanza e può rilevare un minimo di 10 cellule, in un tempo di 10 minuti e in assenza di moltiplicazione cellulare. L'attività enzimatica viene determinata per via spettrofluorimetrica usando le soluzioni B e C, (vedere nel seguito) dopo una elevata induzione nelle cellule coliformi dell'enzima -galattosidasi in tempi brevi e in assenza di moltiplicazione cellulare.

Il procedimento secondo l'invenzione è costituito dai seguenti stati:

- a) Preparazione del campione: la separazione delle cellule batteriche dal campione viene effettuata mediante trattamento fisico come ad esempio la filtrazione; pertanto, nel caso di campioni liquidi o gassosi, un opportuno volume di campione viene fatto passare attraverso un filtro avente cut-off non superiore a 0,45 micron; in caso di campioni solidi il campione viene estratto con opportuno mezzo liquido ed il liquido filtrato come precedentemente indicato. Il materiale trattenuto dal filtro viene poi utilizzato per l'analisi.
- b) Induzione dell'enzima: il materiale trattenuto



dal filtro può essere trattato in uno dei seguenti modi:

- immergendo l'intero filtro nel minimo volume di soluzione A sufficiente per ricoprirlo;
- mettendo a contatto la superficie del filtro dove è stato trattenuto il materiale con un volume di soluzione A;
- recuperando il materiale trattenuto sul filtro attraverso estrazione con un volume di soluzione A;

In tutte le varianti il sistema "materiale trattenuto-soluzione A" viene trattato ad una temperatura compresa tra 10 e 40°C per i coliformi totali e tra 40 e 50°C per i coliformi fecali per un tempo di almeno 5 minuti, come già accennato.

c) Espressione dell'attività dell'enzima indotto:

allo scadere del tempo d'induzione, al sistema soluzione A più filtro vengono aggiunti almeno 5 microlitri di soluzione B per ogni ml di soluzione A utilizzato; dopo breve agitazione, il campione viene trattato ad una temperatura non superiore a 50°C per un tempo minimo di 5 minuti. Allo scadere del tempo si interrompe la reazione aggiungendo la soluzione C per portare il pH finale a oltre 9.0.



d) Misura: la soluzione derivante dall'ultimo trattamento viene versata su cuvetta al quarzo e posta nel fluorimetro; la misura si esegue con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente comprese tra 330 e 370 nm e tra 420 e 460 nm; entrambe le finestre essendo fissate preferibilmente a circa 5-10 nm. Il valore va sottratto del bianco realizzato con filtro sterile.

e) Valutazione del risultato: la risposta al test analitico viene considerata positiva quando la misura in fluorescenza, espressa in unità arbitrarie proprie dello strumento, risulta in un incremento statisticamente significativo rispetto al valore del bianco. La positività al test può essere valutata sia qualitativamente sia quantitativamente; per qualitativamente si intende la possibilità di discriminare i coliformi totali dai coliformi fecali a seconda di quale delle due temperature di incubazione è stata utilizzata nella fase di induzione dell'enzima; la valutazione quantitativa necessita di una prima curva di calibrazione dello strumento eseguita utilizzando concentrazioni note di coliformi totali o fecali. Attraverso questa è possibile definire il numero di cellule di batteri coliformi presenti nel campione origina-



rio.

Il sistema secondo l'invenzione presenta i seguenti elementi di originalità:

- 1) la drastica riduzione dei tempi di analisi rispetto alle metodiche tradizionali grazie all'uso di un nuovo mezzo di induzione capace di stimolare, in assenza di crescita numerica delle cellule, la sintesi di quantità rilevabili di  $\beta$ -galattosidasi anche in campioni contenenti una bassa concentrazione di cellule;
- 2) l'uso originale di una nuova sostanza (promotore di induzione) come principale generatore delle suddette proprietà del mezzo di induzione;
- 3) l'assenza di sostanze nutritive, e quindi nessun indebito incremento all'esame fluorimetrico;
- 4) la presenza dello ione magnesio  $Mg^{++}$  quale elemento assolutamente indispensabile alla induzione delle cellule in tale sistema;
- 5) l'ulteriore incremento dell'attività  $\beta$ -Galattosidasica come conseguenza dell'uso di una concentrazione più elevata di substrato raggiunta grazie alla sua solubilizzazione in Dimetilsolfossido (DMSO).



Nel procedimento sono stati utilizzati i seguenti reagenti con le metodiche a fianco descritte:

1) **Soluzione A:** è una soluzione acquosa contenente: un sistema tampone, come ad esempio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; ioni bivalenti e più particolarmente il Magnesio  $\text{Mg}^{++}$ , (i quali ioni sono essenziali); il promotore dell'induzione; un agente selettivo come ad esempio Sodiiododecilsolfato; un induttore della sintesi della  $\beta$ -Galattosidasi come ad esempio Isopropil- $\beta$ -D-tiogalattopiranoside;  $\beta$ -mercaptoetanololo; la soluzione è stata portata a pH compreso tra 2 e 10 con gocce di KOH o altre basi e sterilizzata per filtrazione su filtro avente porosità non superiore a 0,45 micron.

2) **Soluzione B:** è una soluzione di Metilumbelliferil- $\beta$ -D-Galattoside (MUG) sciolta in Dimetilsolfosido e cloroformio. Il rapporto  $\text{DMSO}/\text{CHCl}_3$  non deve essere inferiore a 3:1 v/v.

3) **Soluzione C:** è una soluzione acquosa di NaOH o altra base.

Con il procedimento ora illustrato sono state effettuate le analisi descritte nei seguenti esempi:

**Esempio 1:**

Filtrazione: un campione di 10 ml di acqua contenenti 500 cellule di Escherichia coli è stato filtrato su filtro di acetato di cellulosa dal



diametro di 13 mm e cut off di 0,45 micron; l'acqua è stata scartata e il filtro utilizzato per l'analisi;

Induzione dell'enzima: il filtro contenente le cellule è stato immerso in un ml di soluzione A contenente:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  47,6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM, una unità di promotore dell'induzione, Sodiodecilsolfato 0,01%, Isopropil- $\beta$ -D-tiogalattoside 0,25 mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 0,27% v/v; la soluzione A era stata portata a pH 7,5 con gocce di soda e sterilizzata per filtrazione su filtro idrofilo avente porosità di 0,45 micron. Il campione veniva poi trattato a 44,5°C per 90 minuti.

Espressione dell'attività dell'enzima indotto: allo scadere del tempo d'induzione, al campione venivano aggiunti 60 microlitri di soluzione B contenente: MUG 16,66 mM sciolto in Dimetilsolfosido/Cloroformio 5/1 v/v; dopo breve agitazione il campione veniva trattato per altri 60 minuti a 37°C. Allo scadere del tempo, l'incubazione veniva interrotta aggiungendo 20 microlitri di soluzione C contenente: NaOH 2N in acqua.

Misura: la soluzione veniva versata in cuvetta al quarzo e posta al fluorimetro; la misura era eseguita con lunghezza d'onda di eccitazione e



di emissione rispettivamente di 364 nm e 448 nm, e le finestre fissate a 5 nm. La lettura andava sottratta del bianco realizzato senza cellule, con un filtro sterile trattato allo stesso modo. La fluorescenza misurata era pari a 2,28 unità arbitrarie corrispondenti a 42 pmoli di MUG idrolizzato (90 pmoli/1000 cellule).

#### **Esempio 2:**

Filtrazione: un campione di 10 ml di acqua contenente almeno una cellula di Escherichia coli (conferma con metodo MF) è stato filtrato su filtro di acetato di cellulosa dal diametro di 13 mm e cut off di 0,45 micron; l'acqua è stata scartata e il filtro utilizzato per l'analisi.

Induzione dell'enzima: il filtro contenente le cellule è stato immerso in un ml di soluzione A contenente:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  47,6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM, 500 unità di promotore dell'induzione, Sodiodecilsolfato 0,01%, Isopropil- $\beta$ -D-tiogalattoside 0,25 mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 0,27% v/v; la soluzione A era stata portata a pH 7,5 con gocce di soda e sterilizzata per filtrazione su filtro idrofilo avente porosità di 0,45 micron. Il campione veniva poi trattato a 44,5°C per 60 minuti.

Espressione dell'attività dell'enzima indotto:



allo scadere del tempo d'induzione, al campione venivano aggiunti 60 microlitri di soluzione B contenente: MUG 16,66 mM sciolto in Dimetilsolfossido/Cloroformio 5/1 v/v; dopo breve agitazione il campione veniva trattato per altri 60 minuti a 37°C.

Allo scadere del tempo, il trattamento veniva interrotto aggiungendo 20 microlitri di soluzione C contenente: NaOH 2N in acqua.

Misura: la soluzione veniva versata in cuvetta al quarzo e posta al fluorimetro; la misura era eseguita con lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 364 nm e 448 nm, e le finestre fissate a 10 nm. La lettura andava sottratta del bianco realizzato senza cellule, con un filtro sterile trattato allo stesso modo. La fluorescenza misurata era pari a 2,5 unità arbitrarie corrispondenti a 22 pmoli di MUG idrolizzato (22.000 pmoli/1000 cellule).

**Esempio 3:**

Filtrazione: 10 ml di acqua contenenti 2250 cellule di Citrobacter è stato filtrato su filtro di acetato di cellulosa dal diametro di 13 mm e cut off di 0,45 micron; l'acqua è stata scartata e il filtro utilizzato per l'analisi;



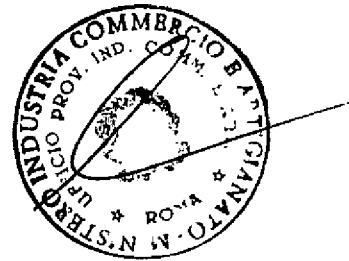
Induzione dell'enzima: il filtro contenente le cellule è stato immerso in 0,5 ml di soluzione A contenente:  $K_2HPO_4$  50 mM,  $NaH_2PO_4$  10 mM,  $MgSO_4$  0,5 mM, una unità di promotore dell'induzione, Sodiiododecilsolfato 0,01%, Isopropil- $\beta$ -D-tiogalattoside 0,25 mM,  $\gamma$ -mercaptoetanololo 0,27% V/v; la soluzione A era stata portata a pH 7,5 con gocce di potassa e sterilizzata per filtrazione su filtro idrofilo avente porosità di 0,45 micron. Il campione veniva poi trattato a 37°C per 60 minuti.

Espressione dell'attività dell'enzima indotto: allo scadere del tempo d'induzione, al campione venivano aggiunti 30 microlitri di soluzione B contenente: MUG 16,66 mM sciolto in Dimetilsolfosido/Cloroformio 5/1 v/v; dopo breve agitazione il campione veniva trattato per altri 60 minuti a 37°C. Allo scadere del tempo, si procedeva immediatamente alla misura fluorimetrica.

Misura: la soluzione veniva iniettata in un sistema di analisi a flusso di acqua distillata collegato ad un fluorimetro per HPLC; un loop da 70 microlitri collegato all'iniettore provvedeva ad inserire il campione nel flusso; la misura era eseguita con lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 364 nm e 448 nm, e le finestre



fissate a 5 nm. La lettura, espressa come massimo valore raggiunto dal campione iniettato, andava sottratta del bianco realizzato senza cellule, con un filtro sterile trattato allo stesso modo. La fluorescenza misurata era pari a 3,21 unità arbitrarie corrispondenti a 141 pmoli di MUG idrolizzato (63 pmoli/1000 cellule).



## RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la rapida rilevazione, in un campione, della presenza di cellule batteriche anche se in numero limitatissimo, mediante misure fluorimetriche, con l'impiego di una sostanza che stimola l'attività enzimatica (promotore dell'induzione), comprendente i seguenti stadi:

- a) preparazione di una soluzione A, contenente il promotore dell'induzione;
- b) preparazione di una soluzione B, contenente il substrato per l'enzima;
- c) preparazione di una soluzione basica C, avente ph compreso fra 10 e 14;
- d) separazione delle cellule batteriche dal campione o da suoi estratti mediante trattamento fisico;
- e) trattamento delle cellule batteriche con la soluzione A;
- f) trattamento termico del complesso cellule batteriche-soluzione A ad una temperatura determinata e non inferiore a 20°C e per un certo intervallo di tempo;
- g) addizione della soluzione B al complesso cellule batteriche-soluzione A e proseguimento del trattamento termico per un certo intervallo



di tempo;

h) aggiunta della soluzione C;

i) misura fluorimetrica del complesso finale ottenuto.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 secondo il quale ogni analisi viene effettuata senza aggiungere al campione alcuna sostanza nutritiva.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta soluzione A è una soluzione acquosa contenente: un sistema tampone, ioni bivalenti, il promotore dell'induzione, un agente selettivo, un induttore della sintesi della  $\beta$ -Galattosidasi.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui detta soluzione tampone è costituita da  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

5. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui detto ione bivalente è il  $\text{Mg}^{++}$ .

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui detto  $\text{Mg}^{++}$  è fornito sotto forma di  $\text{MgSO}_4$ .

7. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui detto agente selettivo è sodiododecilsolfato.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui detto induttore della sintesi della  $\beta$ -Galattosidasi è Isopropil- $\beta$ -D-tiogalattopiranoside.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in



cui detta soluzione A è stata portata a pH compreso tra 2 e 10 con gocce di KOH o altre basi e sterilizzata per filtrazione su filtro avente porosità non superiore a 0,45 micron.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui il pH della soluzione A è pari a 7,5.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta soluzione B è una soluzione di Metilumbelliferil-<sup>o</sup>-D-Galattoside (MUG) in dimetilsolfossido e cloroformio. Il rapporto DMSO/CHCl<sub>3</sub> non deve essere inferiore a 3/1 v/v.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta soluzione C è una soluzione acquosa di NaOH.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui le cellule batteriche sono coliformi totali o fecali.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta temperatura di trattamento del complesso cellule batteriche-soluzione A per il riconoscimento dei coliformi totali è compresa tra 35° e 38°C e più precisamente è 36°±1°C.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta temperatura di trattamento del complesso cellule batteriche-soluzione A per il rico-



noscimento dei coliformi fecali è compresa tra 42° e 46°C e più precisamente è 44,5° $\pm$ 0,2°C.

16. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui l'enzima è la  $\beta$ -galattosidasi.

17. Procedimento secondo le rivendicazioni precedenti, quale impiegato per la seguente determinazione della presenza di almeno una cellula batterica: un campione di 10 ml di acqua contenente almeno una cellula di Escherichia coli (conferma con metodo MF) è stato filtrato su filtro di acetato di cellulosa dal diametro di 13 mm e cut off di 0,45 micron; l'acqua è stata scartata e il filtro utilizzato per l'analisi; il filtro contenente la/e cellula/e è stato immerso in un ml di soluzione A contenente: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 47,6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5 mM, 500 unità di promotore dell'induzione, Sodiodecilsolfato 0,01%, Isopropil- $\beta$ -D--tiogalattoside 0,25 mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 0,27% v/v; la soluzione A era stata portata a pH 7,5 con gocce di soda e sterilizzata per filtrazione su filtro idrofilo avente porosità di 0,45 micron. Il campione veniva poi trattato a 44,5°C per 60 minuti; allo scadere del tempo d'induzione, al campione venivano aggiunti 60 microlitri di soluzione B contenente: MUG 16,66 mM sciolto in Dime-



tilsolfossido/Cloroformio 5/1 v/v; dopo breve agitazione il campione veniva trattato per altri 60 minuti a 37°C; allo scadere del tempo, il trattamento veniva interrotto aggiungendo 20 microlitri di soluzione C contenente: NaOH2N in acqua; la soluzione veniva quindi versata in cuvetta al quarzo e posta al fluorimetro; la misura era eseguita con lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 364 nm e 448 nm, e le finestre fissate a 5-10 nm; la lettura andava sottratta del bianco realizzato senza cellule, con un filtro sterile trattato allo stesso modo; la fluorescenza misurata era pari a 2,5 unità arbitrarie corrispondenti a 22 pmoli di MUG idrolizzato (22.000 pmoli/1000 cellule).

Roma, **27 GIU. 1996**

p. ISRIM S. C. a r.l.

Il Mandatario  
**MARCELLO MASSARI**

