

**Università degli Studi di Pavia**  
**Interfacoltà di Scienze MM. FF. NN., Farmacia, Medicina e Chirurgia**  
**Laurea triennale in Biotecnologie**  
**Dipartimento di Genetica e Microbiologia**  
**“A.Buzzati-Traverso”**

***Indicatori microbiologici nell’analisi delle acque  
destinate al consumo umano***

Relatore:

Prof.ssa Edda De Rossi

Correlatore:

Dott.ssa Francesca Borney

Tesi sperimentale di laurea di

Cristina Gyppez

Anno accademico 2007/2008

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>2</b>
1.1 <u>Decreto lgs.31</u> .....	7
1.2 <u>Microrganismi</u> .....	13
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>21</b>
3.1 <u>Modalità di campionamento</u> .....	21
3.2 <u>Trasporto e conservazione dei campioni</u> .....	21
3.3 <u>Attrezzature e materiali necessari</u> .....	22
3.4 <u>Tecniche analitiche</u> .....	22
3.5 <u>Terreni di coltura</u> .....	24
3.6 <u>Schede tecniche</u> .....	25
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>38</b>
4.1 <u>Batteri coliformi ed <i>E.coli</i></u> .....	38
4.2 <u>Enterococchi</u> .....	45
4.3 <u><i>Clostridium perfringens</i></u> .....	46
4.4 <u>Conta delle colonie cresciute a 37° C e 22° C</u> .....	48
4.5 <u>Conclusioni</u> .....	48
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>49</b>



# 1. Introduzione

L'acqua è un bene prezioso ed essenziale per la vita di tutti gli organismi viventi, i quali, seppur in minore o maggiore misura, hanno il loro metabolismo sottoposto a ricambio idrico e, quindi, ad interscambio di acqua con l'ambiente.

L'acqua "destinata al consumo umano" ha lo scopo di sopperire alla necessità vitale di mantenere l'omeostasi biologica, ma serve anche a predisporre alimenti da consumarsi crudi o cotti, a lavare e a lavarsi. Deve, pertanto, rispondere a criteri sanitari più estesi di quelli legati alla possibile ingestione, con essa, di organismi pericolosi o di componenti tossiche. Deve possedere, quindi, anche caratteristiche fisiche, fisico-chimiche e chimiche tali da potere consentire tutti i possibili usi oltre a quello potabile.

A partire dagli anni '70-'80 l'attenzione del mondo scientifico è stata rivolta prevalentemente al controllo delle sostanze chimiche potenzialmente pericolose presenti nelle acque destinate al consumo umano. In questo ambito, sono state effettuate molte indagini, sempre più approfondite, riguardanti il rischio chimico associato alle acque potabilizzate (ad esempio, quelle sui solventi clorurati e gli erbicidi), mentre è stato trascurato il rischio legato alla componente microbiologica (American Water Works Association, 1999a).

Nei Paesi in via di sviluppo, le epidemie causate da ingestione di acqua non potabile sono una delle principali cause di morte, in particolare tra i bambini. Le enteriti da enterobatteri (*Escherichia coli* e Coliformi) fanno parte di una vasta gamma di sindromi morbose, caratterizzate fondamentalmente da sintomi diarroici e/o dissenterici, le quali sono ampiamente diffuse, soprattutto in aree geografiche a basso standard economico-sociale, e presentano sovente un'elevata mortalità, soprattutto nella prima infanzia. In una recente indagine, è stato calcolato che annualmente si verificano circa cinquecento milioni di episodi diarroici tra i soggetti nella prima infanzia in Asia, Africa ed America latina, con un numero di decessi stimato tra i 5 e i 18 milioni di soggetti (La Placa, 2002).

Il riscontro di un aumento del numero di epidemie correlate al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati ha portato, negli ultimi anni, ad una maggiore attenzione verso le problematiche connesse alla presenza di microrganismi patogeni nelle risorse idriche, anche potabilizzate. Il 35% delle epidemie causate da una contaminazione microbiologica è stato attribuito a parassiti (*Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*), il 45% a batteri (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*) e il 20% a virus (Calicivirus) (Lee *et al.*, 2002). In uno studio del 1995, Morris e Levin hanno calcolato un'incidenza annua di patologie idrodifuse negli USA piuttosto elevata, con una stima di 7 100 000 di casi di patologie di bassa gravità, 560 000 casi di media gravità e 1200 decessi.

Complessivamente, è da ritenere che l'incidenza delle patologie idrodifuse nei paesi industrializzati sia sottostimata. In un'indagine pubblicata nel 2002 congiuntamente dall'European Environmental Agency e dal WHO-Regional Office for Europe, nella quale sono stati analizzati i dati relativi alla

sorveglianza per le gastroenteriti in 18 paesi europei nel periodo 1986-1996, solo il 2% su un totale di 2 567 210 casi di gastroenterite riportati è stato attribuito all'acqua (Tabella 1).

In un'indagine del 2002, Poullis e coll. concludono sottolineando che lo schema di sorveglianza per le *waterborne disease* a livello Europeo non è sufficientemente organizzato e che la variabilità nelle modalità di notifica tra gli Stati Membri comporta una condizione generale di sottotifica per queste patologie.

**Tabella 1.** Epidemie idrodifuse associate all'acqua usata a scopo balneare e potabile riportate in 18 paesi Europei nel periodo 1986-1996 (modificata da: Bartram *et al.*, 2002).

Paese	n. di epidemie	n. di casi	Agente eziologico o malattia (n. di epidemie)
Albania	14	59	Dissenteria amebica (5), febbre tifoide (5), colera (4)
Croazia	29	1931	Dissenteria batterica (14), gastroenterite <sup>(a)</sup> (6), epatite A (4), tifo (4), criptosporidiosi (1)
Estonia	12	1010	Dissenteria batterica (7), epatite A (5)
Germania	0	0	Non sono state riportate epidemie
Grecia	2	16	Dissenteria batterica (1), tifo (1)
Islanda	1	10	Dissenteria batterica (1)
Lettonia	1	863	Epatite A (1)
Lituania	0 <sup>(b)</sup>	0	Non sono state riportate epidemie
Malta	162	19	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (152), dissenteria batterica (4), epatite A (4), giardiasi (1), tifo (1)
Norvegia	0	0	Non sono state riportate epidemie
Regno Unito	20	2810	Criptosporidiosi (13), gastroenterite <sup>(a)</sup> (6), giardiasi (1)
Rep. Ceca	18 <sup>(c)</sup>	76	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (15), dissenteria batterica (2), epatite A (1)
Rep. Slovacca	61	5173	Dissenteria batterica (30), gastroenterite <sup>(a)</sup> (21), epatite A (8), tifo (2)
Romania	57	745	Dissenteria batterica (36), gastroenterite <sup>(a)</sup> (8), epatite A (8), colera (3), tifo (1)
Slovenia	45	n.d.	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (33), dissenteria batterica (8), epatite A (2), dissenteria amebica (1), giardiasi (1)
Spagna	208	n.d.	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (97), dissenteria batterica (47), epatite A (28), tifo (27), giardiasi (7), criptosporidiosi (1), non specificato (1)
Svezia	53 <sup>(d)</sup>	27074	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (36), campilobacteriosi (8), Norwalk like virus (4), giardiasi (4), criptosporidiosi (1), dissenteria amebica (1), <i>Aeromonas</i> sp. (1)
Ungheria	27 <sup>(e)</sup>	4884	Dissenteria batterica (17), gastroenterite <sup>(a)</sup> (6), salmonellosi (4)

(a) Da agente eziologico sconosciuto; (b) dati relativi solo a dieci anni; (c) dati relativi solo ad un anno; (d) in una epidemia *Campylobacter* sp., *Cryptosporidium* sp. and *Giardia duodenalis* sono stati identificati come agenti eziologici (tutti e tre sono stati elencati nella colonna); (e) epidemie associate con acqua potabile (n. = 12) e ad attività di balneazione (n. = 15); n.d. = non determinato.

Nei paesi industrializzati il moderno concetto di protezione delle risorse idriche e lo sviluppo di tecniche di potabilizzazione sempre più efficaci (disinfezione, chiariflocculazione e filtrazione) hanno portato alla eradicazione virtuale delle patologie idrodifuse, eliminando quelle causate dai cosiddetti "patogeni classici", come *Salmonella typhi* o *Vibrio cholerae*. L'instaurarsi di alcune tendenze comportamentali e la comparsa di nuove problematiche hanno contribuito a creare un'altra situazione

riguardo al rischio microbiologico associato al consumo di acqua. I fattori coinvolti comprendono l'eccessivo sfruttamento delle fonti di approvvigionamento, causato dal continuo incremento della richiesta idrica, e l'invecchiamento e deterioramento degli impianti di trattamento e della rete idrica. Anche la permanenza di sorgenti di inquinamento microbiologico delle acque (scarichi municipali, effluenti dei depuratori, scarichi industriali ed agricoli, ecc.) e le conseguenze sulle risorse idriche di alcune attività antropiche (es. eutrofizzazione), che hanno determinato la crescita incontrollata di *nuisance species*, hanno contribuito a determinare una nuova situazione nel settore della produzione e distribuzione di acqua potabile. Ciò ha favorito la comparsa di altre patologie idrodiffuse causate da patogeni nuovi, emergenti, riemergenti e opportunisti.

La pressione che determina la selezione di specifici microrganismi patogeni idrodiffusibili e la loro circolazione in un'area è dovuta alla presenza di sorgenti di contaminazione microbiologica e di attività antropiche che ne favoriscono la diffusione sul territorio, come la presenza di pascoli e la circolazione di animali selvatici, l'impiego di fertilizzanti organici naturali in agricoltura, le modalità di trattamento e smaltimento dei reflui civili e degli allevamenti, il trattamento effettuato sulle acque destinate ad uso potabile, la qualità dell'acqua impiegata a scopo irriguo, ecc. Anche la morfologia del territorio e le condizioni meteorologiche dell'area sono fondamentali per la idrodifusione di microrganismi patogeni, in quanto possono favorire o meno, attraverso fenomeni di percolazione e dilavamento, la contaminazione delle risorse idriche superficiali e profonde.

Anche se la manifestazione associata più spesso al consumo d'acqua potabile rimane la gastroenterite, è importante ricordare che vi sono altre patologie determinate dall'esposizione ad acqua contaminata. Le gastroenteriti idrodiffuse sono evidenti per la natura stessa dei sintomi e per il fatto che hanno un tasso d'attacco elevato (50% degli esposti). Vi sono però numerose altre patologie trasmissibili con l'acqua potabile, come polmoniti (*Legionella pneumophila*) e infezioni localizzate in diversi distretti, causate da patogeni e patogeni opportunisti (es. *Pseudomonas aeruginosa*), che assumono una notevole importanza per la salute pubblica e per le quali è molto spesso difficile riconoscere l'acqua quale sorgente d'infezione (Payment e Hunter, 2001).

Trattando l'incidenza delle patologie idrodiffuse si deve anche considerare il ruolo svolto dalle epidemie provocate dal consumo di alimenti venuti a contatto con acqua contaminata. Una quota rilevante delle patologie trasmesse da alimenti è infatti legata al loro contatto con acqua contaminata (Palumbo *et al.*, 1997).

I principali fattori associati alla comparsa d'infezioni idrodiffuse emergenti e riemergenti sono i cambiamenti demografici, climatici ed ecologici (Louria, 2000; Patz *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda le acque potabili è importante tenere in considerazione anche altre problematiche più specifiche. Uno dei problemi attualmente più diffuso nell'ambito della produzione e distribuzione di acqua potabile è rappresentato dalla contaminazione microbiologica cronica o episodica dell'acqua. Il riscontro di acqua contaminata all'utenza può essere dovuto al fenomeno del *breakthrough*, cioè dell'elusione del trattamento di potabilizzazione da parte di alcuni microrganismi (protozoi, virus e

batteri) presenti nell'acqua grezza. Alcuni microrganismi possono essere resistenti a certi trattamenti. Altri microrganismi possono sopravvivere al trattamento di potabilizzazione rimanendo danneggiati e in uno stato quiescente che non ne consente la crescita nei comuni terreni di coltura, determinando una condizione detta VBNC (*viable but not culturable*) (Momba *et al.*, 2000). Il fenomeno è stato dimostrato prevalentemente per i batteri del gruppo dei coliformi, ma anche per altri batteri eterotrofi (Leclerc, 2003). La contaminazione dell'acqua potabile può essere causata anche da un incidente durante il trattamento di potabilizzazione oppure dalla rottura di una tubazione. In caso di *breakthrough* di microrganismi resistenti ai trattamenti oppure di contaminazione dovuta ad un incidente, si parla di crescita nella rete di distribuzione, mentre nel caso di microrganismi danneggiati dal trattamento di potabilizzazione si parla di ricrescita (Momba *et al.*, 2000).

Parlando del controllo della qualità microbiologica delle acque destinate al consumo umano, i tradizionali indicatori microbiologici di contaminazione fecale (coliformi, *E. coli*, streptococchi e *Clostridium perfringens*) hanno dimostrato di non essere sempre sufficienti come indicatori della presenza di patogeni. Infatti, in numerose epidemie idrodiffuse causate da protozoi, ma anche da virus, non sono stati rilevati coliformi (Barrell *et al.*, 2000; Szewzyk *et al.*, 2000). Ciò è imputabile al fatto che questi indicatori sono meno resistenti ai trattamenti di potabilizzazione e agli stress ambientali di alcuni protozoi e virus patogeni, ma anche di alcuni batteri (*Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*). Inoltre, la condizione di VBNC dei coliformi può renderli non evidenziabili dai comuni controlli microbiologici dell'acqua (Romprè *et al.*, 2002).

La lista dei patogeni idrodiffusi è ampia e comprende virus, batteri e protozoi. Ampia è anche la gamma delle patologie provocate da questi patogeni, la quale può andare da alterazioni gastro-intestinali a complicanze polmonari, fino anche al decesso di individui particolarmente suscettibili (ad esempio, malati di AIDS). E' noto che la diffusione delle infezioni attraverso l'acqua dipende dalla sopravvivenza nell'acqua dei microrganismi, dalla dose infettante, dal periodo di latenza e dalla capacità di moltiplicarsi nell'ambiente. Gran parte dei batteri patogeni ha origine fecale (ad esempio, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter*), ma altri sono rappresentati da specie ambientali in grado di moltiplicarsi nell'acqua e nelle reti di distribuzione idrica (*Aeromonas spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*). Diversamente, i virus (Rotavirus, Calicivirus) e i protozoi enterici (*Cryptosporidium*, *Giardia*) idrodiffusibili non sono in grado di moltiplicarsi nelle acque e hanno una dose infettante tipicamente bassa, da unità a decine di unità infettanti, oltre ad essere resistenti sia all'ambiente acquatico, sia ai trattamenti di potabilizzazione.

I più importanti patogeni idrodiffusi nei paesi industrializzati sono riportati nelle Tabelle 2, 3 e 4. Una descrizione più dettagliata dei patogeni idrodiffusi è riportata in Bouzid *et al.* (2008), Leclerc *et al.* (2002) e Sharma *et al.* (2003).

**Tabella 2.** Caratteristiche di alcuni batteri patogeni idrodifusi nei paesi industrializzati (modificata da AWWA, 1999a).

Batteri	Resistenza ai trattamenti di potabilizzazione	Effetti sulla salute	Diffusione nelle acque	VBNC <sup>(a)</sup>	Persistenza in acque documentate	Epidemie idrodifuse
<i>Mycobacteria</i> ambientali <sup>(b)</sup>	Resistenti alla clorazione	Polmoniti, patologie gastrointestinali	Comune	No	Ricrescita	Si
<i>Helicobacter pylori</i>	Sensibile alla disinfezione	Ulcera, possibile tumore allo stomaco	Abbastanza comune	No	Informazione non disponibile	No
<i>E. coli</i> patogeni	Sensibile alla disinfezione	Diarrea	Comune	Si	Breve; 1 o 2 settimane	Si
<i>Legionella</i>	Resistente alla clorazione	Polmonite	Comune	Si	Lunga	Si
<i>Aeromonas</i>	Sensibile alla clorazione	Gastroenterite	Comune	No	Media	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente alla clorazione	Patologie gastrointestinali, infezioni polmonari	Comune	No	Media	No
<i>Campylobacter jejuni</i>	Sensibile alla disinfezione	Diarrea	Comune	Si	Breve	Si
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Sensibile alla clorazione	Diarrea	Abbastanza comune	No	Lunga	?

(a) VBNC (*viable but non culturable*); (b) comprende *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*; ? = informazione non disponibile; AWWA: American Water Works Association.

**Tabella 3.** Caratteristiche di alcuni virus patogeni idrodifusi nei paesi industrializzati (modificata da AWWA, 1999b).

Virus	Resistenza al Cl <sub>2</sub>	Dose infettante (pt. virali)	Effetti sulla salute	Diffusione nelle acque	Persistenza in acqua	Epidemie note
Enterovirus	Media	Bassa (1-10)	Vari (diarrea, paralisi, ecc.)	Comune	Lunga (90 gg)	Si
Norwalk virus	Medio-alta	?	Diarrea, vomito	?	?	Si
HAV	Medio-alta	Bassa (1-10)	Danni epatici	Comune	Lunga (120 gg)	Si
HEV	?	Bassa (1-10)	Danni epatici	Comune	Lunga (120 gg)	Si

AWWA: American Water Works Association; ? = informazione non disponibile.

**Tabella 4.** Caratteristiche di alcuni protozoi patogeni idrodifusi nei paesi industrializzati (modificata da AWWA, 1999b).

Protozoi	Resistenza al Cl <sub>2</sub>	Effetti sulla salute	Diffusione nelle acque	Persistenza in acqua	Epidemie note
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Alta	Diarrea acuta e cronica	Comune	Lunga	Si
<i>Giardia</i> spp.	Alta	Diarrea e malassorbimento	Comune	Moderata	Si
<i>Toxoplasma gondii</i>	?	Linfoadenopatia, febbre, infezioni congenite	?	?	Si
<i>Microsporidia</i>	?	Diarrea e perdita di peso	?	?	Si
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	?	Diarrea persistente	?	?	Si

AWWA: American Water Works Association; ? = informazione non disponibile.

Gli interventi di prevenzione dovrebbero basarsi sul controllo dei rischi di contaminazione e sulla presenza di un trattamento di potabilizzazione adeguato al tipo di risorsa, cioè in grado di eliminare o abbattere i contaminanti microbiologici specifici di quella risorsa. In altri termini, è fondamentale per il gestore della risorsa idrica, per garantire la sicurezza, conoscere a fondo le caratteristiche della risorsa e i rischi, sia costanti che accidentali, di inquinamento ai quali questa può essere soggetta. L'impiego di un approccio preventivo è anche indicato nella Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. La Direttiva, in base al principio di sussidiarietà, consente agli Stati Membri d'introdurre nelle proprie legislazioni nazionali parametri di controllo addizionali rispetto a quelli indicati, laddove la situazione nazionale o territoriale lo richieda per tutelare la salute umana (Direttiva 98/83/CE). In Italia, la Direttiva 98/83/CE è stata recepita con il decreto legislativo 2 febbraio 2001 n. 31 che è entrato in vigore a dicembre 2003 (Decreto Legislativo 2 febbraio 2001 n. 31 - Gazzetta Ufficiale n. 52, 3 marzo 2001).

### **1.1 Decreto Legislativo n° 31**

Il presente decreto disciplina la qualità delle acque destinate al consumo umano al fine di proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque, garantendone la salubrità e la pulizia.

Di seguito, vengono presentati gli Articoli e gli Allegati ritenuti più importanti per il lavoro svolto.

#### *Art.2 Definizioni.*

Ai fini del presente decreto, si intende per «acque destinate al consumo umano»:

- 1) le acque trattate o non trattate, destinate ad uso potabile, per la preparazione di cibi e bevande, o per altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori;
- 2) le acque utilizzate in un'impresa alimentare per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano, escluse quelle, individuate ai sensi dell'articolo 11, comma 1, lettera e), la cui qualità non può avere conseguenze sulla salubrità del prodotto alimentare finale.

I controlli interni ed esterni, intesi a garantire che le acque destinate al consumo umano soddisfino i requisiti del presente decreto, devono essere effettuati:

- a) ai punti di prelievo delle acque superficiali e sotterranee da destinare al consumo umano;
- b) agli impianti di adduzione, di accumulo e di potabilizzazione;
- c) alle reti di distribuzione;
- d) agli impianti di confezionamento di acqua in bottiglia o in contenitori;
- e) sulle acque confezionate;
- f) sulle acque utilizzate nelle imprese alimentari;



g) sulle acque fornite mediante cisterna, fissa e mobile.

I laboratori di analisi di cui agli articoli 7 e 8 devono seguire procedure di controllo analitico della qualità sottoposte periodicamente al controllo del Ministero della sanità, in collaborazione con l'Istituto superiore di sanità. Il controllo è svolto nell'ambito degli ordinari stanziamenti di bilancio.

Il giudizio di idoneità dell'acqua destinata al consumo umano spetta all'azienda U.S.L. territorialmente competente

#### *Art.7 Controlli interni.*

1. Sono controlli interni i controlli che il gestore è tenuto ad effettuare per la verifica della qualità dell'acqua, destinata al consumo umano.
2. I punti di prelievo e la frequenza dei controlli interni possono essere concordati con l'azienda unità sanitaria locale.
3. Per l'effettuazione dei controlli il gestore si avvale di laboratori di analisi interni, ovvero stipula apposita convenzione con altri gestori di servizi idrici.
4. I risultati dei controlli devono essere conservati per un periodo di almeno cinque anni per l'eventuale consultazione da parte dell'amministrazione che effettua i controlli esterni.

#### *Art.8 Controlli esterni.*

1. I controlli esterni sono quelli svolti dall'azienda unità sanitaria locale territorialmente competente, per verificare che le acque destinate al consumo umano soddisfino i requisiti del presente decreto, sulla base di programmi elaborati secondo i criteri generali dettati dalle regioni in ordine all'ispezione degli impianti, alla fissazione dei punti di prelievo dei campioni da analizzare, anche con riferimento agli impianti di distribuzione domestici, e alle frequenze dei campionamenti, intesi a garantire la significativa rappresentatività della qualità delle acque distribuite durante l'anno, nel rispetto di quanto stabilito.
2. L'azienda unità sanitaria locale assicura una ricerca supplementare, caso per caso, delle sostanze e dei microrganismi per i quali non sono stati fissati valori di parametro a norma dell'allegato I, qualora vi sia motivo di sospettare la presenza in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana. La ricerca dei parametri supplementari è effettuata con metodiche predisposte dall'Istituto superiore di sanità.
3. L'azienda unità sanitaria locale comunica i punti di prelievo fissati per il controllo, le frequenze dei campionamenti e gli eventuali aggiornamenti alla competente regione o provincia autonoma ed al Ministero della sanità secondo modalità proposte dal Ministro della salute e sulle quali la Conferenza Stato-regioni esprime intesa entro il 31 dicembre 2001 e trasmette gli eventuali aggiornamenti entro trenta giorni dalle variazioni apportate.
4. Per le attività di laboratorio le aziende unità sanitarie locali si avvalgono delle agenzie regionali per la protezione dell'ambiente, ai sensi dell'articolo 7-*quinqüies* del *decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502*, e successive modificazioni o di propri laboratori secondo il rispettivo

ordinamento. I risultati delle analisi eseguite sono trasmessi mensilmente alle competenti regioni o province autonome ed al Ministero della sanità, secondo le modalità stabilite rispettivamente dalle regioni o province autonome e dal Ministero della sanità.

Art.14 *Conformità ai parametri indicatori.*

1. In caso di non conformità ai valori di parametro o alle specifiche, l'autorità d'ambito, sentito il parere dell'azienda unità sanitaria locale in merito al possibile rischio per la salute umana derivante dalla non conformità ai valori di parametro o alle specifiche predetti, mette in atto i necessari adempimenti di competenza e dispone che vengano presi provvedimenti intesi a ripristinare la qualità delle acque ove ciò sia necessario per tutelare la salute umana.
2. Entro il 31 gennaio di ciascun anno, la regione o la provincia autonoma comunica al Ministero della sanità e dell'ambiente le seguenti informazioni relative ai casi di non conformità riscontrati nell'anno precedente:
  - a) il parametro interessato ed il relativo valore, i risultati dei controlli effettuati nel corso degli ultimi dodici mesi, la durata delle situazioni di non conformità;
  - b) l'area geografica, la quantità di acqua fornita ogni giorno, la popolazione coinvolta e gli eventuali effetti sulle industrie alimentari interessate;
  - c) una sintesi dell'eventuale piano relativo all'azione correttiva ritenuta necessaria, compreso un calendario dei lavori, una stima dei costi e la relativa copertura finanziaria nonché disposizioni in materia di riesame.
3. Nel caso di utenze inferiori a 500 abitanti, l'obbligo di cui al comma 2 è assolto mediante la trasmissione di una relazione contenente i parametri interessati con i relativi valori e la popolazione coinvolta.
4. Il presente articolo non si applica alle acque confezionate in bottiglie o contenitori, rese disponibili per il consumo umano e a quelle fornite tramite cisterna.

Allegato I .

Parte A. *Parametri microbiologici obbligatori. Indici di contaminazione fecale.*

<b>Parametro</b>	<b>Valore di parametro (numero/100 ml)</b>
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	0
Enterococchi	0

Per le acque messe in vendita in bottiglie o contenitori sono applicati i seguenti valori:

<b>Parametro</b>	<b>Valore di parametro (numero/ml)</b>
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	0/250 ml
Enterococchi	0/250 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 ml
Conteggio delle colonie a 22°C	100/1 ml
Conteggio delle colonie a 37°C	100/1 ml

Parte B. *Parametri chimici obbligatori.*

<b>Parametro</b>	<b>Valore di parametro</b>	<b>Unità di misura</b>
Acrilammide	0,10	µg/l
Antimonio	5,0	µg/l
Arsenico	10	µg/l
Benzene	1,0	µg/l
Benzo(α)pirene	0,010	µg/l
Boro	1,0	µg/l
Bromato	10	µg/l
Cadmio	5,0	µg/l
Cromo	50	µg/l
Rame	1,0	µg/l
Cianuro	50	µg/l
1,2 dicloroetano	3,0	µg/l
Epicloridrina	0,10	µg/l
Fluoruro	1,50	µg/l
Piombo	10	µg/l
Mercurio	1,0	µg/l
Nichel	20	µg/l
Nitrato (NO <sub>3</sub> )	50	µg/l
Nitrito (NO <sub>2</sub> )	0,50	µg/l
Antiparassitari	0,10	µg/l
Antiparassitari-totale	0,50	µg/l
Idrocarburi policiclici aromatici	0,10	µg/l
Selenio	10	µg/l
Tetracloroetilene	10	µg/l
Triometani-totale	30	µg/l
Cloruro di vinile	0,5	µg/l
Clorito	200	µg/l
Vanadio	50	µg/l

Parte C. Parametri indicatori di mal funzionamento dell'apparato preso in esame. Non costituiscono per forza indice di patogenicità.

Parametro	Valore di parametro	Unità di misura
Alluminio	200	µg/l
Ammonio	0,50	mg/l
Cloruro	250	mg/l
<i>C. perfringens</i> (spore comprese)	0	Numero/100 ml
Colore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Conduttività	2500	µScm-1 a 20°C
Concentrazione ioni idrogeno	≥ 6,5 e ≤ 9,5	Unità pH
Ferro	200	µg/l
Manganese	50	µg/l
Odore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Ossidabilità	5,0	mg/l O <sub>2</sub>
Solfato	250	mg/l
Sodio	200	mg/l
Sapore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Conteggio colonie 22°C	Senza variazioni anomale	
Batteri coliformi a 37°C	0	Numero/100 ml
Carbonio organico totale (TOC)	Senza variazioni anomale	
Torbidità	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale	
Durezza*		
Residuo secco a 180°C**		
Disinfettante residuo***		

Indipendentemente dalla sensibilità del metodo analitico utilizzato, il risultato deve essere espresso indicando lo stesso numero di decimali riportato in tabella per il valore di parametro.

\* valori consigliati: 15-50°F.

\*\* valore massimo consigliato: 1500 mg/L.

\*\*\* valore consigliato 0,2 mg/L (se impiegato)

## *Allegato II.*

### *1. Controllo di routine*

Il controllo di routine mira a fornire ad intervalli regolari informazioni sulla qualità organolettica e microbiologica delle acque fornite per il consumo umano nonché informazioni sull'efficacia degli eventuali trattamenti dell'acqua potabile (in particolare di disinfezione), per accertare se le acque destinate al consumo umano rispondano o no ai pertinenti valori di parametro fissati dal presente decreto.

Vanno sottoposti a controllo di routine almeno i seguenti parametri:

- Alluminio (Nota 1)
- Ammonio
- Colore
- Conduttività
- *Clostridium perfringens* (spore comprese) (Nota 2)
- *Escherichia coli* (*E. coli*)
- Concentrazione ioni idrogeno
- Ferro (Nota 1)
- Nitriti (Nota 3)
- Odore
- *Pseudomonas aeruginosa* (Nota 4)
- Sapore
- Conteggio delle colonie a 22°C e 37°C (Nota 4)
- Batteri coliformi a 37°C
- Torbidità
- Disinfettante residuo (se impiegato)

Nota 1: Necessario solo se usato come flocculante o presente, in concentrazione significativa, nelle acque utilizzate (\*).

Nota 2: Necessario solo se le acque provengono o sono influenzate da acque superficiali (\*).

Nota 3: Necessario solo se si utilizza la clorammina nel processo di disinfezione (\*).

Nota 4: Necessario solo per le acque vendute in bottiglie o in contenitori.

\* In tutti gli altri casi i parametri sono contenuti nell'elenco relativo al controllo di verifica.

### *2. Controllo di verifica*

Il controllo di verifica mira a fornire le informazioni necessarie per accertare se tutti i valori di parametro contenuti nel decreto sono rispettati. Tutti i parametri fissati sono soggetti a controllo di verifica, a meno che l'Azienda unità sanitaria locale competente al controllo non stabilisca che, per un periodo determinato, è improbabile che un parametro si ritrovi in un dato approvvigionamento d'acqua

in concentrazioni tali da far prevedere il rischio di un mancato rispetto del relativo valore di parametro.

Il presente punto non si applica ai parametri per la radioattività.

Allegato III.

*Parametri per i quali sono specificati metodi di analisi*

I seguenti metodi di analisi relativi ai parametri biologici sono forniti per riferimento, ogni qualvolta è disponibile un metodo CEN/ISO, o per orientamento, in attesa dell'eventuale futura adozione, conformemente alla procedura di cui all'articolo 12 della direttiva 98/83/CE, di ulteriori definizioni internazionali CEN/ISO dei metodi per tali parametri.

- Batteri coliformi ed *Escherichia coli* (*E. coli*) (ISO 9308-1)
- Enterococchi (ISO 7899-2:2000)
- *Pseudomonas aeruginosa* (prEN ISO 12780:2002)
- Enumerazione dei microrganismi coltivabili - conteggio delle colonie a 22°C (prEN ISO 6222)
- Enumerazione dei microrganismi coltivabili - conteggio delle colonie a 37°C (prEN ISO 6222)
- *Clostridium perfringens* (spore comprese) – (D.lgs 31/2001)

### **1.2 Microrganismi indicatori**

Microrganismo viene definito qualsiasi organismo che sia di dimensioni talmente piccole da poter essere visto unicamente con l'aiuto del microscopio ottico (protozoi, alghe unicellulari, muffe, lieviti, batteri). Per gli scopi di questa trattazione risultano importanti batteri, lieviti e muffe.

I microrganismi sono diffusi ovunque: nell'aria, nell'acqua e nel terreno e quindi anche sulla superficie delle piante, sulla cute e nel tratto intestinale di uomini e animali. In presenza di nutrimento organico, e in opportune condizioni di umidità e temperatura, essi si moltiplicano e possono aumentare enormemente di numero.

I batteri possono svolgere azioni benefiche sulla fertilità del suolo, sulla vitalità delle piante, sul benessere dell'uomo e degli animali, nel cui intestino esercitano utili attività di sintesi di vitamine indispensabili o di degradazione di sostanze altrimenti indigeribili quali, ad esempio, la cellulosa.

Esistono anche batteri patogeni capaci di causare malattie nell'uomo, alcune delle quali trasmesse attraverso gli alimenti.

I batteri sono microrganismi procarioti, con dimensioni di pochi micron, costituiti da una sola cellula di tipo procariotico, sprovvista di nucleo, dotata di un unico cromosoma ed eventualmente plasmidi.

Esistono migliaia di tipi diversi di batteri, ciascuno indicato da una doppia denominazione latina, la prima di genere (es. *Staphylococcus*) e la seconda di specie (es. *aureus*).

Mentre in alcuni casi è l'effettivo potere patogeno a determinare la virulenza, in altri è la via di ingestione che rende temibile il microrganismo, come nel caso di *Shigella dysenteriae* che, labilissimo

nelle usuali condizioni di conservazione degli alimenti, può scatenare una grave dissenteria quando anche una sola cellula venga ingerita assieme all'acqua, che ha un transito gastrico velocissimo ed evita al batterio il contatto con i succhi gastrici.

#### A) I marcatori

Alcuni batteri, non direttamente pericolosi per la salute, vengono chiamati “marcatori” e svolgono egregiamente il ruolo di “spie” della qualità microbiologica, per il fatto che sono facilmente applicabili nella routine dei laboratori aziendali quali componenti principali della sorveglianza analitica.

Fra i microrganismi indicatori quelli maggiormente utilizzati per le analisi delle acque potabili, in quanto spia della possibile presenza di enterobatteri patogeni, sono i cosiddetti indicatori della “contaminazione fecale”. Questi, nell'ambiente idrico, non sono in grado di moltiplicarsi e, di conseguenza, la loro presenza indica una contaminazione dovuta ad acque reflue.

La normativa Decr. lgs n°31 prevede per il controllo microbiologico minimo la ricerca di Coliformi totali, *Escherichia coli* e Enterococchi. Si prevede comunque che vengano tenuti sotto controllo, con idonea frequenza, anche parametri accessori come le spore di clostridi solfitoriduttori.

INDICATORI	SIGNIFICATO
Coliformi totali	Non possono essere considerati indicatori di contaminazione di sicura origine fecale, possono essere comunque utili come indicatori dell'efficienza dei trattamenti di depurazione delle acque e dell'integrità delle reti idriche
<i>E. coli</i>	Indica che nell'acqua vi è stato un inquinamento fecale e/o che gli interventi di potabilizzazione e di disinfezione non sono stati sufficienti a rimuovere la contaminazione
Enterococchi	Rappresentano dei buoni indicatori di contaminazione fecale e, avendo una resistenza al cloro del tutto simile a quella degli enterovirus, possono fornire informazioni sulla loro possibile presenza nelle acque in esame
Carica batterica	Rappresenta la biomassa microbica vitale rilevabile su uno specifico substrato
Clostridi	La presenza di spore e/o di forme vegetative può fornire un'indicazione di inquinamento remoto o intermittente e risulta quindi utile, accanto ai classici indicatori di contaminazione fecale, ai fini del controllo dello stato igienico-sanitario delle acque potabili e delle condizioni delle reti idriche

#### B) Caratteristiche e Patologia

##### *Coliformi totali*

Nel gruppo dei coliformi totali vengono compresi microrganismi che fanno parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. L'appartenenza a questa famiglia di generi differenti, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35°-37°C in 48 ore. I coliformi totali sono batteri a forma di bastoncello, gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni. Sono considerati, con i coliformi fecali e gli streptococchi, classici indicatori di contaminazione nelle acque. Pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10<sup>9</sup> UFC/g, sono ubiquitari. Proprio a causa della

loro costante presenza nell'ambiente, la loro validità come indicatori è stata più volte messa in dubbio. Le più recenti indicazioni, in fase comunque di ulteriore evoluzione, tendono a distinguere i microrganismi appartenenti al gruppo in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione. La prima categoria, ben conosciuta, è quella dei coliformi di origine fecale che comprende alcune specie dei generi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, presenti nel materiale fecale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e in acque e suoli contaminati. La seconda categoria corrisponde a specie che, al contrario, sono largamente distribuite nell'ambiente, dove possono anche moltiplicarsi, colonizzando suolo, acqua e vegetazione.

Nelle acque reflue grezze le loro concentrazioni possono raggiungere valori compresi tra  $10^7$ -  $10^9$  per 100 mL di campione.

La presenza di coliformi totali può essere considerata un segnale di fenomeni di ricrescita, indotti dalla presenza di nutrienti o di contaminazione secondaria. Per escludere con sicurezza che la sola presenza di coliformi totali sia imputabile a contaminazione di origine fecale, occorre verificare l'assenza di altri indicatori quali gli streptococchi fecali (APAT-IRSA-CNR Man 29/2003).

I siti d'infezione di questi batteri sono soprattutto le vie gastrointestinali, ma talvolta anche le vie urinarie, le basse vie respiratorie, il sistema circolatorio e quello nervoso centrale. *E. coli* è senza dubbio il patogeno più frequente, subito dopo troviamo *Klebsiella pneumoniae*, la quale è responsabile di numerose affezioni respiratorie ed infezioni dell'apparato urinario; *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes*, invece, provocano soprattutto infezioni urinarie, così come i *Citrobacter* (La Placa, 2002).

### *Escherichia coli*

Mentre le denominazioni "coliformi totali" e "coliformi fecali" fanno riferimento a gruppi eterogenei di batteri, il termine *Escherichia coli* corrisponde ad una specie tassonomicamente definita, a sua volta compresa nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*. *E. coli* è un microrganismo a forma di bastoncello gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno, che cresce alla temperatura di  $44\pm 1^\circ\text{C}$ , lattosio-fermentante, indolo-positivo in terreni contenenti triptofano,  $\beta$ -D-glucuronidasi-positivo. In letteratura, la presenza di questo enzima è stata evidenziata nel 94-99,5 % dei biotipi di *E. coli*, con l'eccezione dei sierotipi O157:H7, e anche, in bassa percentuale, in *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*. L'enzima non è prodotto dai coliformi; conseguentemente il rilevamento della sua presenza può essere usato per discriminare *E. coli* da questi ultimi.

Per talune peculiari caratteristiche *E. coli* sembra meglio soddisfare i requisiti insiti nella definizione di organismo indicatore, rispetto ai tradizionali indicatori di contaminazione fecale delle acque e, già da tempo, l'Organizzazione Mondiale della Sanità considera questa specie come indicatore primario di inquinamento di origine fecale. Tale scelta è motivata dalla maggiore stabilità della sua presenza nell'ambiente acquatico nel corso dell'anno rispetto ai coliformi, che risulterebbero più sensibili alle



variazioni stagionali e, non di meno, dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei patogeni enterici. Inoltre, nell'ambito del gruppo dei coliformi, *E. coli* è ampiamente rappresentato ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo (APAT-IRSA-CNR Man 29/2003).

*E. coli* è il patogeno più infettivo degli Enterobatteri, tanto da poter essere causa addirittura di decesso. La forma enteropatogena è particolarmente grave tra i bambini nella prima infanzia. Attacca l'intestino tenue o crasso, provocando diarrea del viaggiatore, diarrea infantile nei Paesi in via di sviluppo, vomito, crampi e febbre lieve. Nei casi più gravi può causare la distruzione delle cellule epiteliali che rivestono il colon e quindi lo sviluppo di dissenteria con occasionale emissione di feci sanguinolente. La forma uropatogena è dotata di particolari adesine che garantiscono l'adesione alle mucose delle vie urinarie, divenendo quindi l'agente etiologico più frequente ed importante delle infezioni delle vie urinarie, tanto che i pazienti immunocompromessi rischiano la setticemia. Infine, *E. coli*, è uno dei più frequenti agenti etiologici della *meningite dei neonati* (La Placa, 2002).

### *Streptococchi/Enterococchi*

Il gruppo degli Streptococchi fecali è stato considerato per lungo tempo efficace indicatore di contaminazione fecale per gli ecosistemi acquatici. Sebbene alcuni autori considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo, negli ultimi anni, è stato oggetto di ampia revisione. Con il termine Streptococchi fecali è stato indicato un gruppo di microrganismi eterogeneo sia dal punto di vista tassonomico sia ecologico, raggruppati in base alla morfologia microscopica, alla reattività alla colorazione di Gram ed all'assenza dell'enzima catalasi. Gli studi più recenti hanno distinto invece, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, tre generi diversi di cui due (*Enterococcus* e *Streptococcus*) comprenderebbero specie intestinali o di origine fecale. Attualmente, il genere *Enterococcus* comprende 17 specie individuate sulla base della sequenza dei geni codificanti l'RNA ribosomiale 16S. Le specie appartenenti al genere *Enterococcus* soddisfano specifici requisiti: crescita a 10°C e 45°C, resistenza a 60°C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e in presenza del 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil  $\beta$ -D-glucoside (MUD) in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC). Quattro sono i gruppi individuati in questo genere: il primo gruppo comprende *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*; il secondo, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* e *E. malodoratus*; il terzo *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*; il quarto *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. colombae* e *E. saccharolyticus*. L'appartenenza di specie diverse al genere *Enterococcus*, anche dal punto di vista molecolare, comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere. Anche il test comunemente utilizzato per una conferma dell'appartenenza al gruppo più ampio degli streptococchi, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile ad individuare anche le nuove specie del

genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*.

In precedenza era stata valutata la possibilità che il rapporto tra numero di streptococchi fecali e di coliformi fecali potesse dare una indicazione sulla origine fecale dell'inquinamento.

Con un rapporto  $\geq 4$  la contaminazione si considerava presumibilmente di derivazione umana, mentre era considerata di derivazione animale se il rapporto fosse stato  $\leq 0,7$ . Tuttavia, il valore di questo rapporto è stato messo in discussione a causa della diversa capacità di sopravvivenza da parte dei microrganismi considerati. Inoltre, avendo una resistenza al cloro del tutto simile a quella degli enterovirus, possono fornire informazioni sulla possibile presenza di questi ultimi nelle acque in esame.

Nelle acque reflue le concentrazioni degli streptococchi fecali in 100 mL sono comprese generalmente tra  $10^4$ - $10^6$  (APAT-IRSA-CNR Man 29/2003).

Per quanto riguarda i patogeni umani, sono da segnalare soprattutto *E. faecalis* e *E. faecium* ospiti pressoché costanti dell'intestino crasso dell'uomo ed occasionalmente causa di processi infettivi piogenici, come ascessi e mastoiditi, o di endocarditi e, soprattutto, d'infezioni delle basse vie urinarie. L'ampio spettro di resistenza nei confronti di numerosi farmaci antibatterici può, tra l'altro, porre seri problemi nella terapia delle infezioni sostenute da enterococchi.

### *Clostridium perfringens*

Il genere *Clostridium* fu riconosciuto da Prazmowski nel 1880. I microrganismi appartenenti a questo genere sono bacilli Gram-positivi. I clostridi riducono il solfito con produzione di solfuri e producono spore termoresistenti e stabili nell'ambiente, generalmente a localizzazione terminale o subterminale. *C. perfringens* produce colonie caratteristiche a 44°C su terreni contenenti solfito, non è motile, riduce i nitrati a nitriti, fermenta il lattosio e liquefa la gelatina in circa 48 ore. Il genere è molto eterogeneo riguardo all'ossigeno; si ritrovano, infatti, vicino a specie moderatamente aerotolleranti (*C. aerotolerans*, *C. histolyticum*, ecc.), specie anaerobie obbligate, (*C. perfringens*, *C. haemolyticum*, ecc.) che mancano del sistema dei citocromi e di catalasi, e producono ATP esclusivamente mediante reazioni di fosforilazione a livello del substrato. La temperatura è un parametro discriminante per i clostridi: molti ceppi di *C. perfringens* crescono a 44°C e questa caratteristica può essere sfruttata per migliorare la specificità e il recupero del microrganismo nei campioni ambientali.

La maggior parte dei clostridi sono normalmente saprofiti e vivono negli strati superficiali del suolo e nei sedimenti, alcune specie vivono nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo, e alcune sono patogene.

*C. perfringens* è anaerobio obbligato e la verifica dell'assenza dell'enzima catalasi è una delle prove biochimiche utili per distinguerlo dalle diverse specie appartenenti al genere *Bacillus*. È presente sia nelle feci umane, in concentrazioni variabili tra  $10^2$  e  $10^7$  UFC/g (Unità Formanti Colonia per grammo), sia in quelle 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 e la riduzione della sua concentrazione, durante i trattamenti di depurazione delle acque, può raggiungere il 95-98%. Nelle acque destinate al consumo umano la presenza di *C. perfringens* è raramente segnalata. I suoi livelli di concentrazione sono comunque ampiamente eterogenei, variando da <1 UFC/100 mL in acque non contaminate, a valori superiori a 3000 UFC/100 mL in acque contaminate da effluenti fognari.

*C. perfringens* può essere responsabile della gangrena gassosa, di setticemie e di gravi tossinfezioni alimentari. È noto, comunque, che ceppi tossigeni e non tossigeni presentano capacità diverse di resistenza alla temperatura di 100°C, con una minore capacità di sopravvivenza da parte dei ceppi tossigeni.

Al momento attuale, per la sua persistenza nell'ambiente, la determinazione di *C. perfringens* è considerata una ulteriore e buona prova per la valutazione della qualità di matrici ambientali, soprattutto se con caratteristiche particolari, quali acque clorate, acque non trattate che contengono scarichi industriali, letali per i microrganismi non sporigeni, e acque reflue. Molta cautela, comunque, deve essere posta nel trarre conclusioni dalla sua presenza nell'ambiente. Nelle acque destinate al consumo umano il parametro può fornire informazioni sia circa la qualità organolettica e microbiologica delle acque, sia circa l'efficienza del trattamento subito dalle acque.

Il Decr. lgs 31/2001 e successive modifiche ed integrazioni stabilisce che la presenza di *C. perfringens* (spore comprese) sia da determinare solo quando le acque derivino da acque superficiali. Inoltre, nella nota 2 dell'Allegato I, parte C è stabilito che, in caso di non osservanza del valore parametrico fissato (0 organismi/100 mL), sia necessario verificare che non sussistano rischi per la salute dei consumatori derivanti dalla presenza di patogeni quali, ad esempio, *Cryptosporidium* (APAT-IRSA-CNR Man 29/2003).

Dal punto di vista patogenico, benchè i clostridi siano normalmente saprofiti dell'intestino umano, le affezioni sono la conseguenza di un'introduzione accidentale nei tessuti profondi o dell'assunzione con alimenti delle tossine. *C. perfringens*, in particolare, oltre ad essere uno degli agenti etiologici più frequenti della gangrena gassosa, può essere anche la causa d'intossicazioni alimentari, clinicamente caratterizzate da diarrea e vomito, conseguenti all'ingestione di cibi contaminati dal batterio o in cui sia presente la tossina. Alcuni stipiti, infatti, sono in grado di produrre una particolare tossina che, ingerita con l'alimento, arriva fino al piccolo intestino, dove provoca aumento della permeabilità dei capillari, vasodilatazione, passaggio di liquido nel lume intestinale ed aumento della peristalsi, causando, quindi, diarrea, dolori addominali e vomito (La Placa, 2002).

#### CONTEGGIO DELLE COLONIE SU AGAR A 22°C E A 37°C

Il conteggio delle colonie su agar è un parametro che permette di rilevare un gruppo eterogeneo di microrganismi aerobi che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. L'uso di temperature diverse permette di mettere in evidenza microrganismi mesofili (a 37°C) e psicrofili (a

22°C). Molti di essi possono appartenere alla microflora ambientale autoctona delle acque, presente indipendentemente da qualsiasi contaminazione. Il parametro non ha rilevanza sanitaria.

Infatti, negli ultimi anni, il ruolo svolto, nelle acque destinate al consumo umano, dal gruppo di microrganismi indicati dagli anglosassoni sotto il nome di *Heterotrophic Plate Count* (HPC) (conteggio degli eterotrofi) e corrispondente al parametro Conteggio delle colonie su agar, è stato approfondito e riconsiderato. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riconosciuto che gran parte degli studi epidemiologici più recenti, volti alla verifica del rischio associato alla presenza di questi microrganismi nelle acque, ha confermato che non esistono evidenze che dimostrino che, in assenza di contaminazione fecale, i risultati ottenuti dalla determinazione dell'HPC siano correlati con i rischi per la salute della popolazione sana. Inoltre, è stato più volte sottolineato che i metodi analitici utilizzati per la determinazione del parametro si limitano a rilevare microrganismi vitali e non sono in grado di evidenziare patogeni eventualmente presenti nell'acqua.

Recentemente, sono stati sviluppati metodi rapidi anche per la determinazione di questo parametro. Nella Direttiva Europea 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano e nel conseguente Decr. Lgs n. 31 del 2001, il parametro è riportato nella Parte A e nella Parte C (parametri indicatori) dell'Allegato I.

La normativa stabilisce che i valori del conteggio delle colonie a 22°C nelle acque in rete debbano presentarsi “senza variazioni anomale”, accettando quindi la possibilità che ogni tipo di acqua abbia comunque intrinseche caratteristiche di qualità e una flora microbica naturale. Tuttavia, il superamento delle concentrazioni “storicamente” rilevate nell'acqua in distribuzione può segnalare la potenziale esistenza di condizioni di ricrescita batterica in rete e modifiche della qualità dell'acqua. Il parametro va considerato indicatore di qualità e di efficienza di trattamento. Variazioni di concentrazione sono tollerate fermo restando quanto stabilito nell'art. 14 del decreto e possono, in questo caso, essere segnalate come “inosservanza” del valore di parametro (APAT-IRSA-CNR Man 29/2003).

## 2. Scopo del lavoro

La presenza di contaminanti di natura biologica nelle acque ha particolare rilevanza per le possibili conseguenze sulla salute dell'uomo e/o degli animali. Organismi (patogeni e opportunisti patogeni) capaci di provocare malattie trasmesse per via idrica possono essere eliminati con le feci di individui infetti, raggiungere l'ambiente acquatico e, attraverso differenti modalità, possono infettare e dare origine a patologie in altri soggetti.

L'obiettivo primario dell'esame microbiologico delle acque destinate al consumo umano è quello di assicurare la tutela della salute del consumatore, garantendo l'assenza di patogeni.

Questo è un obiettivo ambizioso che, anche nelle migliori condizioni, lascia qualche margine di rischio conseguente a:

- distribuzione non omogenea dei batteri patogeni nelle acque;
- presenza di patogeni in concentrazioni molto basse per cui l'isolamento risulta difficoltoso;
- presenza di agenti patogeni non batterici la cui ricerca esula, al momento, dalle analisi routinarie eseguite nei laboratori di controllo.

Per cercare di superare questi inconvenienti si fa ricorso alla ricerca di altri microrganismi indicatori i quali, pur privi di potere patogeno, possono indirettamente fornire utili informazioni sulla possibile presenza di patogeni.

Lo scopo di questo lavoro è stata la valutazione microbiologica delle acque destinate al consumo umano; in particolare, l'attenzione si è focalizzata sulla ricerca dei microrganismi indicatori della contaminazione (Coliformi totali, *Escherichia coli*, Enterococchi, *Clostridium perfringens* e carica microbica a 22 e 37°C) applicando protocolli previsti dalla normativa vigente (D.lgs n. 31/01) e, nel caso dei Coliformi e di *E. coli*, i metodi APAT-IRSA-CNR 7010C e APAT-IRSA-CNR 7030C alternativi a quelli definiti dal D.lgs n. 31/01.

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso il Laboratorio di Microbiologia, diretto dalla Dott.ssa F. Borney, dell'ARPA (Agenzia Regionale Protezione Ambiente) della Valle d'Aosta.

## 3. Materiali e Metodi

Vengono presentati i metodi utilizzati per la ricerca di ciascun microrganismo indicatore all'interno di un campione di acqua destinata al consumo umano.

La fase preanalitica rappresenta una delle fasi più delicate dell'intero processo analitico. I risultati analitici, ed in particolare quelli microbiologici, devono permettere di stabilire le caratteristiche della matrice analizzata nelle condizioni in cui essa si trova nel momento in cui viene effettuato il prelievo.

### **3.1 Modalità di campionamento**

Il prelievo dei campioni deve essere effettuato utilizzando recipienti puliti e sterili in funzione delle determinazioni che devono essere effettuate. I contenitori utilizzati per la raccolta e il trasporto dei campioni non devono alterare il valore di quei parametri di cui deve essere effettuata la determinazione, in particolare:

- non devono cedere o adsorbire sostanze, alterando la composizione del campione;
- devono essere resistenti ai vari costituenti presenti nel campione;
- devono garantire la perfetta tenuta, anche per i gas disciolti e per i composti volatili, ove questi siano oggetto di determinazioni analitiche.

I materiali più usati per i contenitori sono generalmente il vetro, la plastica e altri materiali. Riguardo al vetro, che rimane il materiale da preferire, esistono in commercio diverse qualità che si differenziano per la composizione e per la resistenza agli agenti fisici e chimici.

La bottiglia non deve mai essere riempita completamente, al fine di consentire un'efficace agitazione del campione al momento dell'analisi. Se l'acqua da esaminare è clorata (per esempio acque disinfettate o acque di piscina), le bottiglie devono contenere una soluzione al 10% di sodio tiosolfato nella quantità di 0,1 ml ogni 100 ml di acqua campionata per neutralizzare fino a 5 mg/L di cloro residuo libero e combinato.

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione (ora, data, tipo di acqua, punto in cui è stato effettuato il prelievo, condizioni atmosferiche al momento del prelievo).

Tutti i campioni d'acqua devono essere esaminati nel minor tempo possibile, nel frattempo, vanno mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura inferiore ai 10°C; l'intervallo tra 2 e 8°C è quello consigliabile.

### **3.2 Trasporto e conservazione dei campioni**

L'inosservanza dei tempi e/o delle modalità di trasporto, può comportare alterazioni della composizione del campione.

Tra il momento del prelievo e quello dell'analisi il tempo massimo che può intercorrere, per le varie determinazioni, è indicato nella tabella seguente:

<i>Campylobacter</i>	24 ore
Organismi vitali a 22°C o 36°C, <i>Staphylococcus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	8 - 12 ore
<i>E. coli</i> e coliformi, Enterococchi, <i>Salmonella</i> ed altre <i>Enterobacteriaceae</i>	12 - 18 ore
Spore di clostridi solfito riduttori, batteriofagi, Enterovirus, Cisti/Oocisti di <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> , <i>Legionella</i> , uova di elminti, Cianobatteri, Amebe	24 ore Secondo la Norma UNI EN ISO 19458:2006

### **3.3 Attrezzature e materiali necessari:**

- Cappa a flusso laminare
- Bilancia
- pHmetro
- Autoclave
- Incubatori
- Frigorifero e congelatore
- Bagno termostatico
- Microscopio ottico
- Incubatori in atmosfera modificata o giare per anaerobiosi
- Micropipette
- Termometri (tipo Data Logger, i quali permettono di registrare la temperatura e di segnalare eventuali variazioni)
- Apparecchiatura per la filtrazione
- Membrane filtranti
- Capsule petri
- Pipette
- Terreni di coltura

### **3.4 Tecniche analitiche**

L'analisi microbiologica è effettuata seminando una aliquota di campione su adatti terreni di coltura.

Di norma, vengono impiegate tre metodiche:

- 1- semina in provette contenenti terreni liquidi (Metodo del Numero più Probabile o MPN)
- 2- filtrazione su membrana e deposito su terreno di coltura solido (adatta anche all'esame di grandi volumi ma problematica quando il particolato in sospensione è elevato)

### 3- semina per inclusione di terreni di coltura solidi

La tecnica della filtrazione su membrana è andata sempre più affermandosi per la semplicità operativa, per la rapidità delle operazioni e per la possibilità di contare direttamente i microrganismi in un determinato volume di campione. Questo è anche il metodo più utilizzato per la selezione e la crescita dei microrganismi indicatori per le acque destinate al consumo umano. Per il conteggio delle colonie cresciute a 22°C o 37°C si usa, invece, il metodo della semina per inclusione.

**Metodo della filtrazione su membrana (MF)** → adatto a tutti i tipi di acqua (tranne quelle particolarmente torbide), anche in grandi volumi. Consente di rilevare direttamente (per conta diretta) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato, contando le colonie sviluppate su membrana (UFC= unità formanti colonia)

$$UFC/100\ ml = n^{\circ}\ \text{colonie contate} / 100\ \text{ml di campione filtrati}$$

Procedura: in condizione di asepsi, prendere una membrana di esteri di cellulosa con porosità nominale 0,45 µm e, con il lato quadrettato verso l'alto, centrarla sulla base di un supporto filtrante (bicchierini di vetro su pompa da vuoto). Agitare il campione di acqua e poi misurare il



volume da analizzare direttamente nel bicchiere, il quale ha le tacche tarate. Filtrare attraverso la membrana utilizzando la pompa a vuoto. Trasferire la membrana su idoneo terreno di coltura agarizzato in piastre petri.

**Metodo della semina per inclusione** → adatto a piccole aliquote di campione. Permette di contare le unità formanti colonia (UFC), cioè le colonie che si formano da cellule di microrganismi capaci di moltiplicarsi e crescere nel terreno agarizzato (su una piastra si possono sviluppare anche solo 1 colonia oppure migliaia di colonie; il numero di colonie contabili è compreso tra 30 e 300).

Procedura: seminare in capsule Petri vuote aliquote di campione comprese tra 1 e 2 ml in funzione della dimensione della piastra utilizzata. Versare, rispettando le regole di asepsi, circa 15 ml di substrato nella capsula contenente l'inoculo. Non superare i 20 min. d'intervallo tra il momento dell'inoculo in capsula e l'aggiunta del terreno colturale, che dev'essere mantenuto liquefatto a bagnomaria ad una temperatura tra i 43°C e i 45°C. Mescolare accuratamente ruotando in vari versi le piastre. Lasciare solidificare e porre ad incubare ad una temperatura idonea. Dopo incubazione, contare le colonie cresciute.



### **3.5 Terreni di coltura**

I microrganismi necessitano, per potersi moltiplicare e diventare perciò visibili come colonie, di ambienti favorevoli e di sostanze nutritive adatte. Il terreno di coltura deve contenere principi nutritivi essenziali per lo sviluppo di una coltura microbica e deve fornire condizioni ambientali adatte alla crescita, vale a dire condizioni ottimali di pH, pressione, ecc. Gli elementi fondamentali per la crescita dei microrganismi sono: C, H, O, N, S, P (contenuti in amminoacidi, zuccheri ed acidi nucleici); ci sono altri elementi che non sono facilmente solubili e devono essere aggiunti sotto forma di sale (forma più solubile di tali elementi): N, P, S, Mg. Altri ancora sono aggiunti solo in tracce: Fe, Ca, Co, Mn (che fungono da cofattori enzimatici di alcune reazioni). Se sappiamo quale microrganismo dobbiamo isolare e conosciamo il suo metabolismo, possiamo allestire il terreno di coltura con tutti i nutrienti di cui il microrganismo ha bisogno.

- Terreno liquido: i componenti sono disciolti in acqua e sterilizzati
- Terreno solido: contiene Agar (polisaccaride contenente zolfo estratto da un'alga marina. Non è un nutriente, ma utilizzato come agente solidificante nei terreni di coltura. Liquefa a 100°C; solidifica a 45°C)

In base alla composizione chimica e alla funzione si distinguono:

1. Terreni minimi
  2. Terreni massimi
  3. Terreni selettivi
  4. Terreni differenziali
1. Chimicamente definiti o minimi: si conosce l'esatta composizione chimica (azoto, zolfo e fosforo sotto forma di sali inorganici, aggiunti in concentrazione nota e una fonte di carbonio)
  2. Terreni complessi o massimi: non si conosce la composizione esatta (estratto di lievito, di carne, peptone, ecc. )
    - ✓ Nutrient Agar (NA)
    - ✓ Luria Broth (LB)
  3. Terreno selettivo: Favorisce la crescita di particolari specie batteriche grazie alla presenza di fattori che inibiscono lo sviluppo di altre specie, come ad esempio coloranti (cristalvioletto, verde brillante, fucsina basica)
    - ✓ Sabouraud (SAB)
    - ✓ Brilliant Green Agar

4. Terreno differenziale: E' un terreno che, grazie alla presenza di particolari componenti, permette di distinguere fra diversi gruppi di batteri, consentendo una identificazione presuntiva della specie isolata. Contiene carboidrati (zuccheri) ed indicatori di pH, che consentono di distinguere tra batteri in grado di fermentare specifici carboidrati e batteri privi di questa capacità, in base alla colorazione delle colonie e alla loro morfologia. Indicatori di pH sono ad esempio il rosso fenolo e il blu di bromo fenolo.

- ✓ Agar Sangue
- ✓ C-EC Agar

### **3.6 Schede tecniche**

Sono di seguito presentate le schede tecniche dei principali metodi e terreni di coltura per l'analisi microbiologica delle acque. Vengono descritte le Norme a cui bisogna fare riferimento, i volumi di campione o il numero di colonie da prendere in considerazione per ciascuna analisi, i tipi di terreni da utilizzare, con le rispettive composizioni, il tempo e la temperatura d'incubazione ed, infine, la morfologia ed il colore della colonia alla fine di ciascuna prova effettuata.

#### **3.6.1 Coliformi totali ed *E. coli***

A) Metodo delle membrane filtranti normalizzato

<b>Riferimento Norma/Legge</b>	<b>Vol. campione</b>	<b>Repliche</b>	<b>Terreno</b>	<b>Principio/ Agente selettivo</b>	<b>Incubazione</b>	<b>Morfologia colonia</b>
<b>D.Lgs 31/01 UNI EN ISO 9308-1:2002</b>	100 ml	1	Lactose TTC agar*	Il terreno di coltura permette di discriminare i coliformi per la fermentazione di lattosio	37°C per 24 h + altre 24 h se non è cresciuto nulla	Colore giallo (coliformi)  Colore rosso (non coliformi)

Prove di conferma obbligatorie: lo sviluppo di colonie gialle indica la presenza di coliformi, la quale deve essere confermata con i seguenti test.

Tipologia	N° colonie	Terreno/ Reagente	Principio	Incubazione	Note
<b>Reisolamento</b>	Almeno 10 colonie gialle da TTC	TSA**	Terreno elettivo; non interferisce con prova dell'ossidasi	37°C per 24 h	Sviluppo di colonie incolori
<b>Prova dell'ossidasi</b>	Tutte le colonie reisolate	Reagente al Tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina idrocloruro (1%)	Differenzia i microrganismi in base alla presenza/assenza dell'enzima citocromossidasi.	Collocare 2 gocce di reagente su carta da filtro, poi strisciarvi una colonia da TSA. Attendere 30 sec.	La reazione è positiva se si sviluppa colorazione blu-viola, negativa se non si sviluppa colore. I coliformi sono ossidasi-negativi.
<b>Reisolamento</b>	Almeno 10 colonie da TSA	Brodo di triptofano***	Utile per poi fare la prova dell'indolo	44°C per 24 h	/
<b>Prova dell'indolo</b>	Provetta di Brodo di triptofano	0,2-0,3 ml di Reattivo di Kovacs****	L'indolo è un composto eterociclico, sottoprodotto della digestione batterica del triptofano da parte dell'enzima triptofanasi.	Aggiunta di reattivo nelle provette inoculate e attesa di pochi secondi	Reazione positiva con lo sviluppo di una colorazione rossa ad anello all'interfacci a tra brodo e reattivo. <i>E. coli</i> è indolo-positivo.

Conclusioni: Considerare come *E. coli* le colonie gialle, ossidasi negative ed indolo positive.

Terreni utilizzati:

*\*Lactose TTC agar*

Lattosio 20 g  
 Peptone 10 g  
 Estratto di lievito 6 g  
 Estratto di carne 5 g  
 Blu di bromotimolo 0,05 g  
 Agar 15 g  
 Acqua distillata 1000 mL  
 pH 7,2±0,1

*Soluzione di TTC*

2,3,5-trifeniltetrazoliodicloruro (TTC) 0,05 g  
 Acqua distillata 100 mL

*Soluzione di eptadecilsolfato di sodio*

Eptadecilsolfato di sodio (Tergitol 7) 0,2 g  
 Acqua distillata 100 mL

*\*\* Agar soia triptone (TSA)*

Triptone 15 g  
 Peptone di soia 5 g  
 Sodio cloruro 5 g  
 Agar 20g  
 Acqua distillata 1000 mL  
 pH 7,2±0,2

*\*\*\* Brodo al triptofano*

Digerito triptico di caseina 10 g  
 L-triptofano 1 g  
 Cloruro di sodio 5 g  
 Acqua distillata 1000 mL  
 pH 7,5±0,2

*\*\*\*\* Reattivo di Kovacs*

*p*-dimetilaminobenzaldeide 5 g  
 Alcool amilico o butilico 75 mL  
 Acido cloridrico 25 mL

B) Metodo alternativo

Riferimento Norma/Legge	Vol. campione	Repliche	Terreno	Principio/ Agente selettivo	Incubazione	Morfologia colonia
Metodo alternativo  APAT-IRSA- CNR 7010C e 7030C	100 ml	1	C-EC Agar *	Il terreno di coltura permette di discriminare i coliformi ed <i>E. coli</i> , microrganismi β-galattosidasi positivi	44°C per 24 h per <i>E. coli</i>  37°C per 24 h per i coliformi	Colore verde-blu (coliformi); inoltre, <i>E.</i> <i>coli</i> è fluorescente alla lampada di Wood. Colore bianco- trasparente (non coliformi)

Prove di conferma: non sono previste; si fanno come ulteriore prova in caso di dubbio sulle colonie blu, prima di definirle come colonie di coliformi. Nel caso di *E. coli* non si possono avere dubbi, poiché devono essere blu e fluorescenti.

<b>Tipologia</b>	<b>N° colonie</b>	<b>Terreno/ Reagente</b>	<b>Principio</b>	<b>Incubazione</b>	<b>NOTE</b>
<b>Crescita su terreno selettivo e differenziale</b>	Tutte quelle positive su C-EC o, se sono molte, almeno 5 colonie	Mc Conkey***	Questo terreno contiene un colorante rosso (Cristal violetto) e dei sali biliari che inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi. La fermentazione del lattosio da parte dei coliformi risulta in un abbassamento del pH del terreno, il quale contiene del rosso fenolo come indicatore di pH. I sali biliari precipitano facendo assumere un colore rosa/rosso alle colonie di coliformi, con un alone di precipitazione, mentre colonie di altri Gram-negativi sono gialle	37°C per 24 h	Colonie rosa (coliformi)  Colonie gialle (altri Gram-negativi)
<b>Prova dell'ossidasi</b>	1 risultata rosa da Mc Conkey	Reagente al tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina idrocloruro (1%)	Permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi	Collocare 2 gocce di reagente su carta da filtro, poi strisciarvi una colonia da TSA. Attendere 30 sec.	La reazione è positiva se si sviluppa colorazione blu-viola, negativa se non si sviluppa colore. I coliformi sono ossidasi-negativi
<b>Sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica</b>	1 risultata rosa da Mc Conkey	Kit ENTEROTUBE ****	Identificazione rapida delle Enterobacteriaceae in base alla valutazione dei risultati di diverse prove	37°C per 24 h	L' <i>ID value</i> consente la rapida identificazione del batterio in esame attraverso un apposito manuale

Terreni utilizzati:

\* *C-EC Agar*

Triptosio 10 g  
Triptofano 1 g  
Peptocomplesso 5 g  
Estratto di lievito 3 g  
Cloruro di Sodio 5 g  
Sali di bile n. 3 1,5 g  
IPTG 0,1 g  
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside 0,08 g  
4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide 0,05 g  
Agar Bios LL 13 g  
Acqua distillata 1000 mL  
pH 6,8 $\pm$ 0,2

\*\* *Agar soia tripton e (TSA)*

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

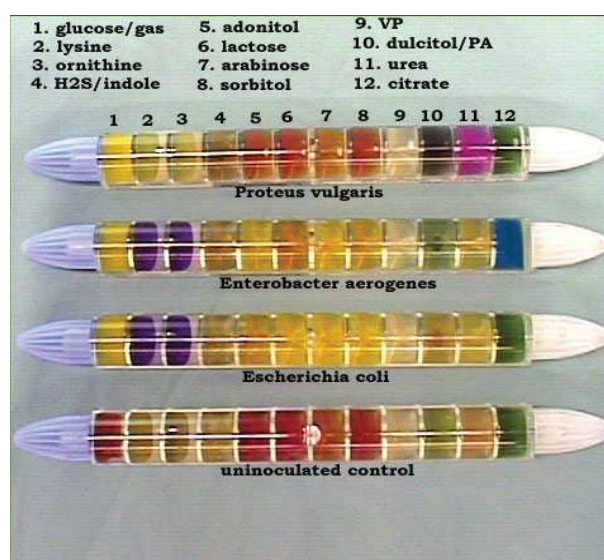
\*\*\* *Mc Conkey agar*

Digerito pancreatico di gelatina 17,0 g/l  
Digesto pancreatico di caseina 1,5 g/l  
Digerito peptidico di tessuto animale 1,5 g/l  
Lattosio 10,0 g/l  
Sali biliari 1,5 g/l  
Cloruro di Sodio 5,0 g/l  
Rosso neutro 0,03 g/l  
Cristal violetto 0,001 g/l  
Agar 13,5 g/l  
pH 7,1  $\pm$  0,2

\*\*\*\* *Galleria Enterotube II:*

Consente l'esame simultaneo di 15 differenti caratteristiche biochimiche dei batteri Gram-negativi, ossidasi-negativi, della famiglia degli Enterobatteri:

- test del destrosio (glucosio) e produzione di gas
- decarbossilazione della lisina
- decarbossilazione dell'ornitina
- test dell'indolo e produzione di H<sub>2</sub>S
- fermentazione dell'adonitolo
- fermentazione del lattosio
- fermentazione dell'arabinosio
- fermentazione del sorbitolo
- test di Voges-Proskauer, (serve a differenziare i coliformi fecali dai coliformi ambientali)
- fermentazione del dulcitololo e della fenilalanina
- idrolisi dell'urea
- utilizzazione del citrato



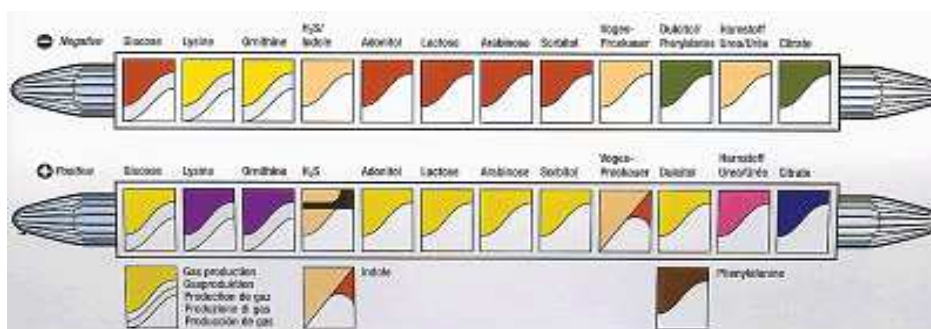
Non si devono mai fare le prove biochimiche d'identificazione senza aver effettuato prima dei reisolamenti per essere sicuri che la colonia sia pura ed avere un risultato preciso ed attendibile.

*Procedura:* per prima cosa, rimuovere i tappini dalle due estremità per accedere all'ago sterile d'inoculo. Toccare con l'ago una colonia pura sulla piastra. Successivamente, ritirare l'ago ruotandolo ed inoculando così tutti i compartimenti del kit. Arrivati alla fine, rompere l'ago e richiudere le

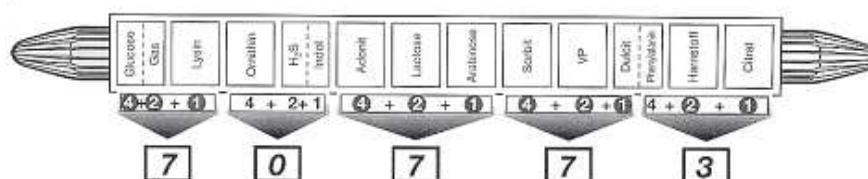


estremità del kit con gli appositi tappini. Perforare i compartimenti aerobi avvalendosi di un ago sterile. Incubare, quindi, il kit a 37°C per 24 ore.

In seguito, registrare le reazioni come positive o negative :



Utilizzare i foglietti allegati alla confezione di Enterotube, contrassegnando per ogni reazione positiva i numeri corrispondenti.  
Per esempio:



Sommare i numeri contrassegnati, come indicato sopra. Il numero a 5 cifre ottenuto (ID value), consente la rapida identificazione del batterio in esame utilizzando il sistema di identificazione con codifica computerizzata.

### 3.6.2 Enterococchi

#### Metodo delle membrane filtranti

Riferimento Norma/Legge	Vol. campione	Repliche	Terreno	Principio/ Agente selettivo	Incubazione	Morfologia colonia
D.Lgs 31/01  ISO 7899- 2:2000	100 ml	1	SB* Slanetz e Bartley	Permette di discriminare gli enterococchi, i quali crescono a pH 9,6 e a 6,5% di NaCl, idrolizzano il 4-metilumbelliferil-β-D-glucoside (MUD) in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC)	37°C per 48 h	Colonie di colore dal rosa al marrone

Prove di conferma: lo sviluppo di colonie dal rosa al marrone indica la presenza di enterococchi, la quale deve essere confermata con i seguenti test.

Tipologia	N° colonie	Terreno/ Reagente	Principio	Incubazione	NOTE
<b>Reisolamento</b>	Membrana	BEA** Esculina bile azide agar	Gli enterococchi sono in grado d'idrolizzare l'esculina	44°C per 2 h	Colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana compare un alone nero-marrone

#### Terreni utilizzati:

##### \* *Slanetz e Bartley*

Triptosio 20 g  
Estratto di lievito 5 g  
Destrosio 2 g  
Dipotassio idrogeno fosfato 4 g  
Sodio azide 0,4 g  
Agar 10 g  
Acqua distillata 1000 mL  
pH 7,0±0,2

##### \*\* *Esculina bile azide agar*

Triptone 17 g  
Peptone 3 g  
Estratto di lievito 5 g  
Bile 10 g  
Esculina 1,0 g  
Ferro (III) ammonio citrato 0,5 g  
Cloruro di sodio 5 g  
Sodio azide 0,15 g  
Agar 15 g  
Acqua distillata 1000 mL  
pH 7,1±0,1



### 3.6.3 *Clostridium perfringens*

Metodo delle membrane filtranti

Riferimento Norma/Legge	Vol. campione	Repliche	Terreno	Principio/ Agente selettivo	Incubazione	Morfologia colonia
D.Lgs 31/01	100 ml	1	TSC* Tryptosio Solfito Cicloserina Agar	I clostridi riducono il solfito con produzione di solfuri. In particolare, <i>Clostridium perfringens</i> produce colonie caratteristiche su terreni contenenti solfito, riduce i nitrati a nitriti, fermenta il lattosio e liquefa la gelatina in circa 48 h	44°C per 24 h in anaerobiosi	Colonie nere o grigio/giallo-marrone; colorazione scura sul retro della membrana filtrante

Prove di conferma: lo sviluppo in anaerobiosi di colonie dal grigio al marrone indica la presenza di clostridi, la quale deve essere confermata con i seguenti test.

Tipologia	N° colonie	Terreno/ Reagente	Principio	Incubazione	NOTE
<b>Reisolamento</b>	Tutte quelle positive su TSC o, se sono molte, almeno 5 colonie Da ciascuna colonia srisciare 2 piastre distinte	SA** Agar Sangue	Le colonie di <i>C. perfringens</i> producono tipiche aree di emolisi chiarificate sulla superficie del terreno e crescono solo in anaerobiosi	1 piastra in anaerobiosi e l'altra in aerobiosi, entrambe a 37°C per 24 h	Procedere allo svolgimento delle prove di conferma solo per le colonie che crescono in anaerobiosi

<b>Prova della catalasi</b>	Strisciare su un vetrino portaoggetti la colonia da saggiare	Gocce di perossido di idrogeno al 3%	La presenza dell'enzima è rilevata dallo sviluppo di bollicine di gas.	Far cadere gocce di reagente sul vetrino e lasciare agire 2 secondi	Gli enterococchi sono catalasi-negativi perciò non si osserva sviluppo di bollicine
<b>Sistema miniaturizzato d'identificazione biochimica</b>	1	galleria API 20 A***	Test per l'identificazione degli anaerobi	37°C per 24 h	Codice numerico ottenuto consente la rapida identificazione del batterio in esame utilizzando il sistema con codifica computerizzata
<b>Colorazione di Gram****</b>	1	Soluzione fisiologica su vetrino	Colorazione di tipo regressivo in quanto dopo una prima colorazione generale con violetto di nicole o di genziana, prevede la decolorazione dei batteri Gram-negativi con dell'alcool etilico puro, per poi essere ricolorati utilizzando della safranina	/	Bacillo Gram-positivo. Viola.

#### Terreni utilizzati:

##### \* *Triptosiso Solfito Cicloserina Agar*

Triptosiso 15 g  
 Soia peptone 5 g  
 Estratto di lievito 5 g  
 Sodio metabisolfito 1 g  
 Ferro ammonio citrato 1 g  
 Agar 12 g  
 Acqua distillata 1000 mL  
*Soluzione di D-cicloserina*  
 D-cicloserina 4 g  
 Acqua distillata 100 mL  
 pH 7,6±0,2

##### \*\* *Agar Sangue*

Agar con 5% di sangue di cavallo

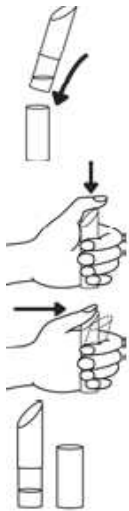
È possibile utilizzare Columbia agar o qualsiasi altro analogo idoneo terreno

### \*\*\* API test 20 A

Si tratta di un sistema miniaturizzato che permette di esaminare 20 reazioni metaboliche e di fermentazione. E' costituito da una ventina di pozzetti che sono inoculati con una sospensione batterica.

#### Preparazione dell'inoculo, allestimento e lettura del kit (BioMérieux, 07882F - GB - 2002/12)

Aprire l'ampolla di API 20A Medium (la cui composizione è mostrata a destra) contenuta nel kit, come illustrato a sinistra.



Successivamente, prelevare tutte le colonie cresciute in anaerobiosi su agar sangue con un'ansa sterile, inserirla nell'ampolla e stemperare le colonie in modo da allestire l'inoculo. La torbidità dell'ampolla deve essere pari a 3 McFarland. Usare istantaneamente la sospensione preparata. Allestire il box d'incubazione distribuendovi 5 ml di acqua distillata, in modo da creare un ambiente umido e quindi disporvi sopra la striscia di API 20A. Utilizzando una pipetta sterile, prelevare la sospensione dall'ampolla e distribuirla nelle cellette della striscia. Coprire la celletta del test dell'indolo con olio minerale, in modo da prevenire l'eventuale evaporazione dell'indolo formato. Infine, incubare a 37°C per 24 h in anaerobiosi. Trascorse le 24 h, leggere i risultati e, in caso di dubbi, incubare nuovamente per altre 24 h. Il BCP (violetto di bromo cresolo) presente nella reazione deve essere decolorato per riduzione. Perciò, per rivelare la reazione di acidificazione, aggiungere, nelle cellette contenenti carboidrati, una goccia di reagente BCP e poi leggere la reazione. Dopodiché, mettere una goccia di reagente XYL (xilene) nella celletta del test dell'indolo (IND) e lasciare agire 2-3 minuti, poi, aggiungere una goccia di reagente EHR (Reagente di Ehrlich) e leggere nel giro di 5 min. Per far avvenire la reazione della Catalasi (CAT) è necessario mettere due gocce di perossido d'idrogeno al 3% prima della lettura.

Medium		
API 20 A Medium 4 ml	Trypticase	5 g
	Yeast extract	5 g
	Sodium chloride	2.5 g
	L-tryptophane	0.2 g
	L-cystine	0.4 g
	Hemin (porcine origin)	0.005 g
	Vitamin K <sub>1</sub>	0.01 g
	Sodium sulfite	0.1 g
	DeminerIALIZED water	to make 1000 ml
	pH	6.9-7.3

le colonie in modo da allestire l'inoculo. La torbidità dell'ampolla deve essere pari a 3 McFarland. Usare istantaneamente la sospensione preparata. Allestire il box d'incubazione distribuendovi 5 ml di acqua distillata, in modo da creare un ambiente umido e quindi disporvi sopra la striscia di API 20A. Utilizzando una pipetta sterile, prelevare la sospensione dall'ampolla e distribuirla nelle cellette della striscia. Coprire la celletta del test dell'indolo con olio minerale, in modo da prevenire l'eventuale evaporazione dell'indolo formato. Infine, incubare a 37°C per 24 h in anaerobiosi. Trascorse le 24 h, leggere i risultati e, in caso di dubbi, incubare nuovamente per altre 24 h. Il BCP (violetto di bromo cresolo) presente nella reazione deve essere decolorato per riduzione. Perciò, per rivelare la reazione di acidificazione, aggiungere, nelle cellette contenenti carboidrati, una goccia di reagente BCP e poi leggere la reazione. Dopodiché, mettere una goccia di reagente XYL (xilene) nella celletta del test dell'indolo (IND) e lasciare agire 2-3 minuti, poi, aggiungere una goccia di reagente EHR (Reagente di Ehrlich) e leggere nel giro di 5 min. Per far avvenire la reazione della Catalasi (CAT) è necessario mettere due gocce di perossido d'idrogeno al 3% prima della lettura.

#### API 20A PRIMA DELL'ALLESTIMENTO



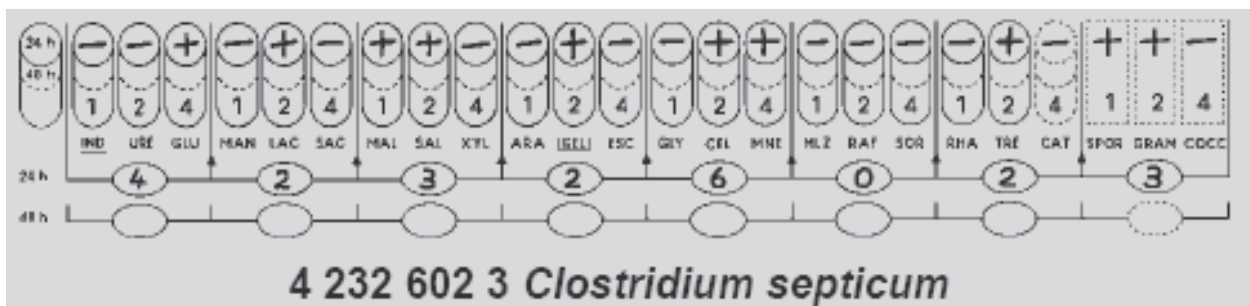
#### API 20A DOPO L'ALLESTIMENTO E L'INCUBAZIONE A 37°C PER 24 H



Reazioni	Risultato negativo	Risultato positivo
Produzione di indolo (IND) → Kovac	Giallo	Rosso
Idrolisi di urea (URE)	Giallo	Rosso/arancio
Fermentazione di D-glucosio (GLU)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-mannitolo (MAN)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-lattosio (LAC)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-saccarosio (SAC)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-maltosio (MAL)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di salicina (SAL)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-xilosio (XYL)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di L-arabinosio (ARA)	Blu/verde	Giallo
Attività gelatinasica (GEL)	Nero non diffuso	Nero diffuso
Idrolisi dell'esculina, citrato ferrico (ESC)	Giallo/trasparente	Grigio/marrone-nero
Fermentazione della glicerolo (GLY)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-cellobiosio (CEL)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-mannosio (MNE)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-melizitosio (MLZ)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-raffiniosio (RAF)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-sorbitolo (SOR)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di L-ramnosio (RHA)	Blu/verde	Giallo
Fermentazione di D-trealosio (TRE)	Blu/verde	Giallo

#### Interpretazione:

L'identificazione è ottenuta attraverso un profilo numerico. Segnare le reazioni positive o negative, come indicato nell'immagine sotto riportata, e sommare i numeri corrispondenti alle reazioni positive a gruppi di 3. Il codice ottenuto, immesso in un database interattivo, corrisponderà ad una determinata specie del genere *Clostridium*.



#### \*\*\*\* Colorazione di Gram

La differenza nella capacità di trattenere il colorante basico è data dalla quantità di peptidoglicano (mureina) contenuto nella parete cellulare: i batteri che sono in grado di trattenere il colorante si definiscono Gram (+), quelli che non lo trattengono sono Gram (-). I batteri Gram (+), infatti, presentano una membrana cellulare fosfolipidica circondata da una parete cellulare costituita prevalentemente da peptidoglicano, il quale conferisce alla cellula, tra le altre caratteristiche, elevata rigidità e resistenza alla disgregazione meccanica; i batteri Gram (-) hanno una parete cellulare con uno spessore minore e presentano una seconda membrana esterna. Una delle caratteristiche principali di tali batteri è la presenza, nello strato esterno della membrana, di lipopolisaccaridi (LPS), endotossine in grado di innescare una risposta immunitaria nell'organismo ospite.

#### Procedura

1) Il campione si fissa o al calore o con fissativo chimico. Al calore : una volta asciutto si passa sopra la fiamma non più di tre volte. Si può anche lasciare una notte in termostato a 37°C e il giorno dopo colorarlo. Il vetrino si fissa chimicamente con metanolo puro o anche usando lo stesso decolorante di cui sotto per qualche minuto;

2) versare sopra il vetrino la soluzione di Cristal violetto e lasciare agire per un minuto;

3) lavare con acqua di fonte;

4) versare la soluzione di Lugol (soluzione acquosa iodo-iodurata) e attendere un minuto. Ha un colore bruno scuro che tende a schiarirsi quando esposto alla luce o all'aria. Lo iodio in associazione al Cristal violetto forma un composto stabile più resistente alla decolorazione nei Gram positivi;

5) lavare con acqua di fonte;

6) decolorare per circa 10 secondi con alcool etilico /acetone 1:1 o con isopropanolo /acetone 3:1

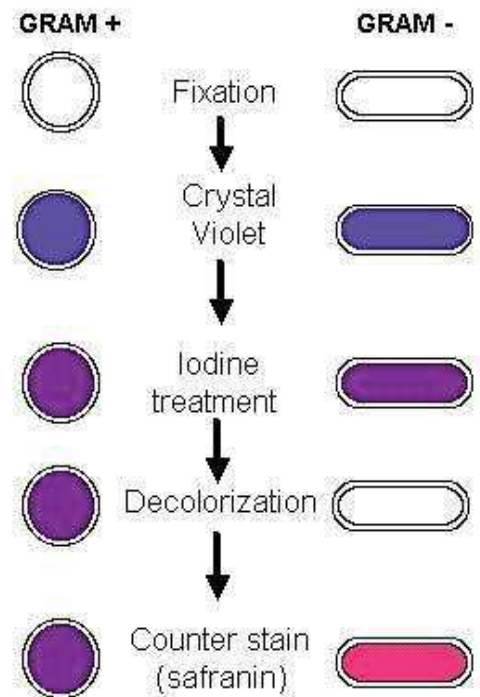
(maggiore la percentuale di alcool meno rapida sarà la decolorazione, più alta la percentuale di acetone e più rapida la decolorazione);

7) lavare con acqua di fonte;

8) versare sul vetrino la soluzione di contrasto Safranina, che penetra nelle cellule decolorate, colorandole di rosso;

9) lavare con acqua di fonte e lasciare asciugare;

10) guardare al microscopio ottico il preparato e determinarne la colorazione e la forma delle cellule.



**3.5.4 Determinazione della carica microbica mediante conteggio delle colonie cresciute  
su agar a 22°C e 37°C**

Metodo di semina per inclusione

<b>Riferimento Norma/ Legge</b>	<b>Vol. campione</b>	<b>Repliche</b>	<b>Terreno</b>	<b>Principio/ Agente selettivo</b>	<b>Incubazione</b>	<b>Morfologia colonia</b>
D.Lgs 31/01  UNI EN ISO 6222:2001	1 ml	2	15 mL di Substrato di isolamento* mantenuto liquefatto alla temperatura di 44°C	Agar all'estratto di lievito che permette di contare le colonie di tutti i microrganismi (batteri, lieviti e funghi)	22°C per 72 h  37°C per 48 h	Contare tutte le colonie con idoneo sistema di ingrandimento su fondo scuro

*\*Substrato d'isolamento*

Estratto di lievito 3 g  
Tryptone 6 g  
Agar 15 g  
Acqua distillata 1000 mL  
pH 7,2±0,2

## 4. Risultati e Conclusioni

Nel periodo tra Luglio e Settembre 2008 sono stati analizzati 224 campioni di acqua destinata al consumo umano, di cui 6 erano controlli di qualità interni. Poiché si tratta di un lavoro svolto presso l'Agenzia Regionale Protezione Ambiente della Valle d'Aosta su campioni ufficiali, prelevati dagli operatori dell'USL (Unità Sanitaria Locale) Valle d'Aosta, si tratta di dati sensibili, per cui non è possibile rendere noti la provenienza di queste acque e i risultati di queste analisi. Perciò, in questo lavoro faremo riferimento ai 6 campioni (A, B, C, D, E, F) di controlli interni.

### 4.1 Batteri Coliformi ed *E. coli*

Per quanto riguarda la ricerca di **batteri coliformi totali e di *E. coli*** si è deciso di usare metodi analitici alternativi a quello previsto dal D.Lgs n. 31/01, ovvero i metodi APAT-IRSA-CNR 7010C e APAT-IRSA-CNR 7030C, accreditati dal SINAL (SISTEMA NAZIONALE PER L'ACCREDITAMENTO DI LABORATORI). La scelta è motivata dal fatto che questi metodi sono più veloci e di più facile esecuzione rispetto al metodo che segue la Norma ISO 9308-1:2002, perché prevedono meno passaggi, in particolare in fase di identificazione delle colonie dei microrganismi target (Coliformi ed *E. coli*) rispetto ad eventuali microrganismi interferenti. Infatti, come già sottolineato in Materiali e Metodi, quello normalizzato richiede 2 giorni per la crescita del microrganismo su terreno selettivo Lactose TTC agar, e da 1 a 3 giorni per le prove di conferma. Ciò significherebbe dover chiudere l'acquedotto in questione per un minimo di 3 giorni al fine di prevenire la diffusione dell'acqua in caso di possibile contaminazione fecale. In alternativa alla preliminare chiusura dell'impianto idrico, si rischia d'impedire troppo tardi la diffusione di acqua contaminata, poiché i risultati non si possono avere che dopo un minimo di 3 giorni. Inoltre, l'identificazione del batterio in esame è più complicata, poiché il terreno Lactose TTC agar permette la crescita anche di altri microrganismi perfettamente confondibili, sia per colore che per forma della colonia, con *E. coli* (Fig.1). In particolare, non è possibile distinguere i Coliformi da *E. coli*. I primi, infatti, come detto nell'Introduzione, possono essere anche di origine tellurica e, quindi, non sono microrganismi indicatori di contaminazione fecale e la loro presenza è, entro certi limiti, "tollerabile". La presenza di *E. coli*, invece, in quanto indice di contaminazione fecale, testimonia un problema di entità ben più grave.

I metodi APAT-IRSA-CNR 7010C e 7030C usano, invece, il terreno selettivo C-EC il quale richiede 24 h per la crescita dei microrganismi, che appaiono come colonie di colore verde/blu, ben distinguibili da quelle bianche atipiche (Fig. 2). Inoltre, le colonie di *E. coli* appaiono fluorescenti alla lampada di Wood. Oltre a ciò, questi metodi non richiedono prove di conferma. Tali prove possono eventualmente essere effettuate nel caso in cui si abbia il dubbio se si tratti o meno di una colonia caratteristica dei Coliformi e, più in generale, sono effettuate durante i controlli di qualità interni ed esterni, necessari per mantenere accreditati i parametri analitici. In effetti, richiedono al massimo 24 h

di tempo, perciò dopo 2 giorni è possibile avere la certezza della presenza/assenza di contaminazione e provvedere, se necessario, anche nel giro di 24 h dal prelievo del campione, alla chiusura dell'impianto idrico analizzato.

Il numero totale di colonie, cresciute su terreno C-EC a 37°C per 24 h e analizzate in questo lavoro, è pari a 38, di cui 10 nel caso dei campioni A e B, 7 nel caso del campione C, 5 nel caso dei campioni D e F e una nel caso del campione E. Tali colonie sono di diverso colore, bianche (non coliformi) oppure di diversa gradazione blu/verde (Coliformi).

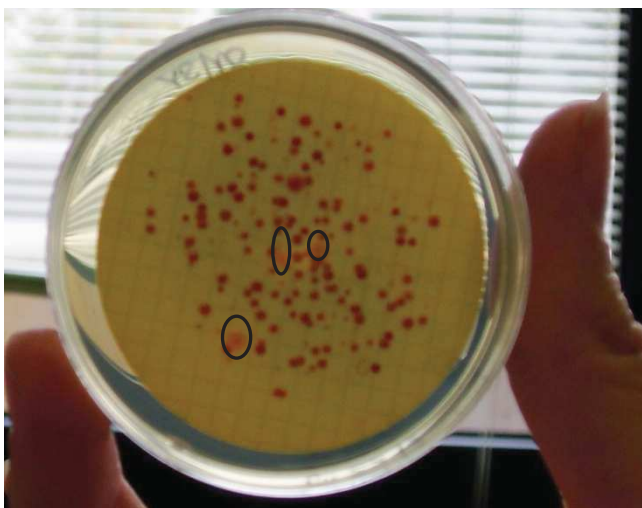


Fig. 1. Morfologia delle colonie su terreno normalizzato Lactose TTC agar. Le colonie gialle cerchiare dovrebbero essere coliformi/*E. coli*. Le colonie rosse sono altri

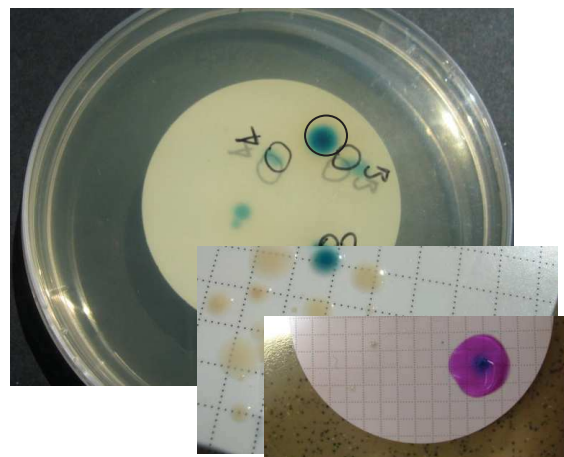


Fig. 2. Morfologia delle colonie su terreno C-EC agar. Le colonie blu dovrebbero essere coliformi/*E. coli*. Le colonie bianche sono atipiche e non vengono ulteriormente caratterizzate. L'alone viola rivela una colonia di *E. coli* a contatto con reattivo di Kovacs.

Il primo test da effettuare per confermare l'identificazione è quello di esporre le colonie cresciute su membrana alla lampada di Wood (luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 366 nm), per vedere la distinzione tra *E. coli*, fluorescenti, e Coliformi, non fluorescenti. Se le colonie sono blu e fluorescenti allora sono di *E. coli* (Fig. 3); si può procedere ad ulteriore conferma, attraverso prova con reattivo di Kovacs (Fig. 2), reisolamento su terreno McConkey, prova dell'ossidasi ed, infine, test dell'Enterotube II. Se sono bianche e fluorescenti, non dovrebbe trattarsi di *E. coli*; si possono comunque

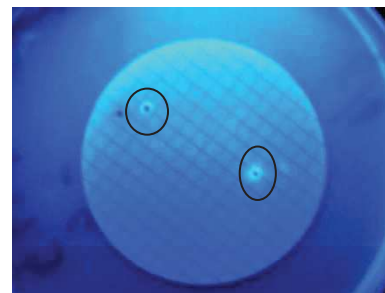


Fig. 3. Colonie di *E. coli* fluorescenti alla lampada di Wood.

effettuare le altre prove di conferma per confermare la non appartenenza al gruppo degli *E. coli*. Nel caso in cui le colonie non siano fluorescenti, se sono bianche vengono escluse dall'identificazione, in quanto colonie atipiche. Se, invece, sono di diversa gradazione blu/verde si procede all'identificazione attraverso reisolamento su McConkey, prova dell'ossidasi ed, infine, test dell'Enterotube II.

In particolare, il reisolamento su terreno McConkey (Fig. 4) permette di selezionare e ben evidenziare i batteri Gram-negativi fermentanti il lattosio come *E. coli* e coliformi, i quali assumono un'evidente



colorazione rosa, al contrario di altri Gram-negativi non fermentanti il lattosio, che sono gialli o trasparenti.

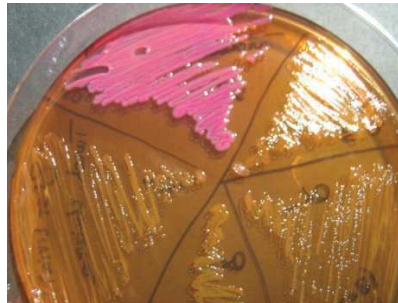


Fig. 4. Reisolamento di batteri Gram-negativi fermentanti il lattosio (rosa) e non (trasparenti) su terreno



E', poi, possibile eseguire la prova dell'ossidasi, che deve risultare negativa nel caso in cui si tratti di batteri coliformi. Quando viene effettuata sulle colonie di sospetti coliformi, e quindi rosa su terreno McConkey, non deve svilupparsi colore

viola.

Test dell'ossidasi, reazione positiva

Test dell'ossidasi, reazione negativa

Altra prova di conferma veramente esaustiva è il kit biochimico miniaturizzato Enterotube II (Fig. 5), il quale permette di identificare con certezza la specie del batterio in questione grazie ad un sistema basato su codici numerici. Il test è stato allestito ed interpretato dopo incubazione a 37°C per 24 h come descritto in Materiali e Metodi. Nella quarta e sesta colonna delle Tabelle 5 e 6 sono riportati, rispettivamente, i codici numerici ottenuti e l'assegnazione del genere e della specie dei batteri in esame.

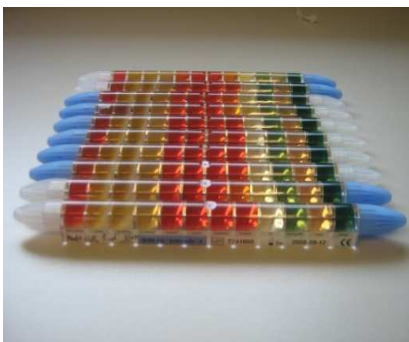


Fig. 5. Kit Enterotube II prima e dopo l'inoculo con colonie isolate su terreno C-EC. A sinistra, i pozzetti sono tutti dello stesso colore, a destra, hanno virato colore in funzione della positività della reazione.



Il numero di Coliformi totali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte a conferma, considerando la eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL). Dal numero di colonie verde/blu contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, si calcola il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula:  $C = Z \cdot V_s / V_t$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

Z = numero di colonie verde/blu contate sulla membrana;

Vt = volume (mL) di campione analizzato;

Vs = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

L'accuratezza del risultato dipende anche dal numero di colonie contate. Per avere un risultato statisticamente significativo è necessario che sulla membrana siano cresciute 10 - 100 colonie caratteristiche e non più di 200 colonie totali (ISO 8199:2005).

Il numero di *E. coli* si calcola in base al numero di colonie contate fluorescenti sul terreno selettivo C-EC, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL). Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente che possa avere influenzato i risultati.

Per quanto riguarda gli indicatori *E. coli* e coliformi, i risultati Veri positivi e Veri negativi ottenuti dall'analisi dei campioni A, B, C, D, E e F, effettuate come descritto in Materiali e Metodi, sono riassunti nelle Tabelle 5 e 6. Non sono stati evidenziati Falsi positivi e Falsi negativi.

**Tabella 5.** Caratteristiche e identificazione di 25 colonie, isolate dai campioni A, B, C, D, E e F risultate essere Veri positivi (a).

Campione	Colonia	Tipo di colonia su terreno C-EC	Reisolamento (McConkey)	Codice identificativo	Identificazione
A	1	Blu, non fluorescente	Colonie rosa	34763 (Test Enterotube)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (coliforme)
A	2	Blu, non fluorescente	Colonie rosa	34761 (Test Enterotube)	<i>K. oxytoca</i> (coliforme)
A	3	Blu, non fluorescente	Colonie rosa	34763 (Test Enterotube)	<i>K. oxytoca</i> (coliforme)
A	4	Blu, non fluorescente	Colonie rosa	34761 (Test Enterotube)	<i>K. oxytoca</i> (coliforme)
A	5	Blu, non fluorescente	Colonie rosa	34763 (Test Enterotube)	<i>K. oxytoca</i> (coliforme)
A	6	Blu, fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa	36570 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
A	7	Blu, fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa	36570 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
A	8	Blu, fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa	36570 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
A	9	Blu, fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa	36570 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
A	10	Blu, fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa	36570 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
B	11	Blu, non fluorescente	Colonie rosa, Ox -	36361 (test Enterotube)	<i>Enterobacter aerogenes</i>

B	12	Blu, non fluorescente	Colonie rosa, Ox -	36361 (test Enterotube)	<i>E. aerogenes</i>
B	13	Blu, non fluorescente	Colonie rosa, Ox -	36361 (test Enterotube)	<i>E. aerogenes</i>
B	14	Blu, non fluorescente	Colonie rosa, Ox -	36361 (test Enterotube)	<i>E. aerogenes</i>
B	15	Blu, non fluorescente	Colonie rosa, Ox -	36361 (test Enterotube)	<i>E. aerogenes</i>
C	16	Turchese, non fluorescente	Colonie rosa, Ox -	32370 (test Enterotube)	<i>E. cloacae</i>
C	17	Turchese, fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa, Ox -	34560 (test Enterotube)	<i>E. coli</i>
C	18	Turchese, fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa, Ox -	26560 (test Enterotube)	<i>E. coli</i>
D	19	Turchese, non fluorescente	Colonie rosa, Ox -	32370 (test Enterotube)	<i>E. cloacae</i>
E	20	Turchese, non fluorescente, Kovac's +	Colonie rosa, Ox -	32770 (test Enterotube)	<i>Citrobacter</i>
F	21	Blu, fluorescente	Colonie rosa	36560 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
F	22	Blu, fluorescente	Colonie rosa	36560 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
F	23	Blu, fluorescente	Colonie rosa	36560 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
F	24	Blu, fluorescente	Colonie rosa	36560 (Test Enterotube)	<i>E. coli</i>
F	25	Blu, fluorescente	Colonie rosa	36560 (Test Enterotube)	<i>E.coli</i>

Ox - = negativi alla prova dell'Ossidasi;

Kovac's + = positivi alla prova dell'indolo.

**Tabella 6.** Caratteristiche e identificazione di 13 colonie, isolate dai campioni B, C e D, risultate essere Veri negativi (d).

Campione	Colonia	Tipo di colonia su terreno C-EC	Reisolamento (McConkey)	Codice identificativo	Identificazione
C	26	Turchese chiara, non fluorescente	Colonie non tipiche, Ox -	30060 (Test Enterotube)	<i>K. ozaene (Serratia plymutica)</i>
C	27	Turchese chiara, non fluorescente	Colonie non tipiche, Ox -	30040 (Test Enterotube)	<i>Shigella, Pantoea, Klebsiella</i>
C	28	Turchese chiara, non fluorescente	Colonie non tipiche, Ox -	20060 (Test Enterotube)	<i>K. ozaene (Serratia plymutica)</i>
C	29	Verde	Colonie non tipiche, Ox -	30040 (Test Enterotube)	<i>Shigella, Pantoea, Klebsiella</i>
D	30	Turchese piccola, non fluorescente	Colonie non tipiche, Ox -	30260 (Test Enterotube)	<i>K. ozaene</i>
D	31	Turchese chiara, non fluorescente	Colonie non tipiche, Ox +	ND	
D	32	Turchese chiara, non fluorescente	Colonie non tipiche, Ox +	ND	
D	33	Turchese chiara, non fluorescente	Colonie non tipiche, Ox +	ND	
B	34	Colonie bianche trasparenti, fluorescenti	Colonie non tipiche, Ox +	ND	
B	35	Colonie bianche trasparenti, fluorescenti	Colonie non tipiche, Ox +	ND	
B	36	Colonie bianche trasparenti, fluorescenti	Colonie non tipiche, Ox +	ND	
B	37	Colonie bianche trasparenti, fluorescenti	Colonie non tipiche, Ox +	ND	
B	38	Colonie bianche trasparenti, fluorescenti	Colonie non tipiche, Ox +	ND	

Ox- = negativi alla prova dell'Ossidasi;

Ox + = positivi alla prova dell'Ossidasi;

Kovac's + = positivi alla prova dell'indolo;

ND = non determinati, perché non sono coliformi in quanto ossidasi positivi e non fermentanti il lattosio. Non è necessario giungere ad una identificazione, è sufficiente sapere che si tratta di batteri interferenti.

Anche dal punto di vista prestazionale e qualitativo i metodi APAT- IRSA-CNR 7010C e 7030C possono indiscutibilmente sostituire il metodo normalizzato. Infatti, andando a calcolare le

caratteristiche prestazionali, sui campioni analizzati in questo lavoro, si ottengono dei risultati validi, che permettono di accettare i metodi.

Specificità e Selettività possono essere definite numericamente (Havelaar *et al.*, 1993) e sono correlate alle proporzioni relative delle colonie che si suppongono negative o positive sulla base di tutte le prove effettuate. I risultati sono divisi in quattro categorie:

- a) numero di presunti positivi trovati positivi (veri positivi)
- b) numero di presunti negativi trovati positivi (falsi negativi)
- c) numero di presunti positivi trovati negativi (falsi positivi)
- d) numero di presunti negativi trovati negativi (veri negativi)

		Conta presunta		
		+	-	
Conta confermata	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
		a+c	b+d	n

Le caratteristiche prestazionali calcolate da tali osservazioni sono definite come segue (Norma UNI ENV ISO 13843:2003) :

- 2) sensibilità =  $a/(a + b)$ , la frazione dei positivi totali correttamente assegnata nella conta presunta;
- 3) specificità =  $d/(c + d)$ , la frazione dei negativi totali correttamente assegnata nella conta presunta;
- 4) tasso di falsi positivi =  $c/(a + c)$ , la frazione dei positivi osservata erroneamente assegnata;
- 5) tasso di falsi negativi =  $b/(b + d)$ , la frazione dei negativi osservata erroneamente assegnata;
- 6) l'efficienza E è un parametro singolo generale, che dà la frazione di colonie o provette correttamente assegnate:  $E = (a + d)/n$

Il numero totale delle prove è  $a + b + c + d = n$

La selettività del metodo microbiologico è definita come il logaritmo della frazione di colonie di riferimento presunte (presunti positivi) del totale:

$$F = \lg [(a + c)/ n]$$

Quindi, inserendo i dati ottenuti dall'analisi delle 38 colonie isolate dai campioni testati in questo lavoro (A, B, C, D, E e F) e deducibili dalle Tabelle 5 e 6, nello schema seguente, possono essere calcolate specificità e selettività per i metodi APAT- IRSA-CNR 7010C e 7030C.

		Conta presunta		
		+	-	
Conta confermata	+	25	0	20
	-	0	13	13
		25	13	38

I valori ottenuti sono i seguenti:

Sensibilità =  $a/(a + b) = 1$ , tutti i presunti positivi sono veri positivi;

Specificità =  $d/(c + d) = 1$ , tutti i presunti negativi sono veri negativi;

Falsi positivi =  $c/(a + c) = 0$ , non sono presenti;

Falsi negativi =  $b/(b + d) = 0$ , non sono presenti;

Efficienza =  $(a + d)/n = 1$ ;

Selettività =  $\lg [(a + c)/ n] = - 0,18$  è un risultato accettabile in quanto in genere dev'essere migliore di -1, mentre i risultati non sono validi se la selettività è inferiore a -2 (UNI ENV ISO 13843:2003).

Si può, quindi, concludere che i metodi APAT- IRSA-CNR 7010C e 7030C, hanno buone caratteristiche prestazionali e possono sostituire il metodo previsto dal D.Lgs n. 31/01.

#### 4.2 Enterococchi

Per quanto riguarda, invece, la ricerca di batteri della famiglia degli **Enterococchi**, effettuata con il metodo normalizzato ISO 7899-2:2000, sono state osservate colonie di colore rosso su terreno selettivo di Slanetz e Bartley (Fig. 6). A differenza del metodo accreditato per i coliformi ed *E. coli*, non sono state fatte prove aggiuntive rispetto a quelle previste dal metodo stesso, poiché è un metodo normalizzato previsto dal D. lgs n° 31.

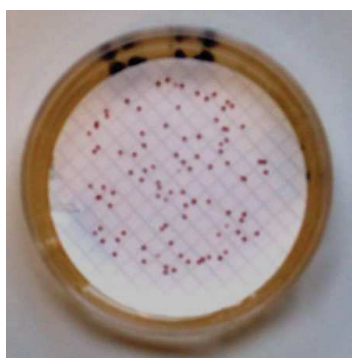


Fig. 6. Colonie rosse di Enterococchi su terreno SB.



Fig. 7. Aloni marroni sul retro della membrana posta su terreno BEA.

Applicando le prove di conferma previste dal metodo, la membrana è stata trasferita sul terreno BEA all'esculina e incubata per 2 ore a 44°C. Trascorse le 2 ore, è stato possibile vedere un alone nero-marrone sul retro della membrana in corrispondenza delle colonie (Fig. 7). Ciò ha dimostrato che i batteri formanti colonia sono in grado d'idrolizzare l'esculina e sono quindi sicuramente degli enterococchi. Nel caso si volesse identificare il microrganismo in questione, si dovrebbero eseguire le prove differenziali illustrate nell'introduzione (pag. 16) e il test biochimico miniaturizzato API 20STREP, specifico per gli streptococchi.

La concentrazione di enterococchi si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma e riportando il valore come numero per 100 mL di campione (N. /100 mL). Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati della prova di conferma, si calcola il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:  $C = Z \cdot V_s / V_t$  dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

Z = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V<sub>t</sub> = volume (mL) di campione analizzato;

V<sub>s</sub> = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

#### 4.3 *Clostrium perfringens*

Per quanto riguarda la ricerca di *Clostrium perfringens*, dopo analisi selettiva su terreno TSC contenente solfito e incubazione in anaerobiosi, in un campione solo è stata riscontrata la crescita di una colonia marrone-nera. Si sono perciò effettuate le prove di conferma, per assicurarsi che appartenesse proprio al genere *Clostridium*. La presunta colonia positiva è stata reisolata su due piastre di agar sangue, una incubata in anaerobiosi e l'altra in aerobiosi. Su quest'ultima non è cresciuto niente, mentre su quella in anaerobiosi è stato possibile osservare colonie con un alone di emolisi (Fig. 8). Ciò permette di concludere che si tratta esattamente di un clostridio.

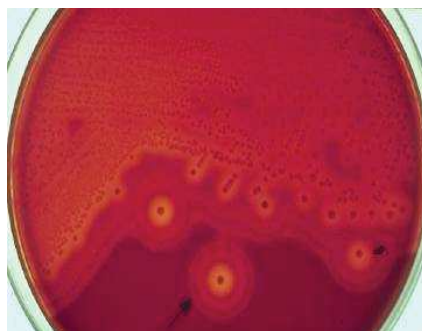


Fig. 8. Tipico alone di emolisi da *C. perfringens* su terreno agar sangue.

Per giungere all'identificazione di *C. perfringens*, sono state eseguite due ulteriori prove. A seguito di colorazione di Gram, il batterio è risultato essere un bastoncino viola, quindi Gram-positivo (Fig. 9), e sporigeno, caratteristiche tipiche dei clostridi.

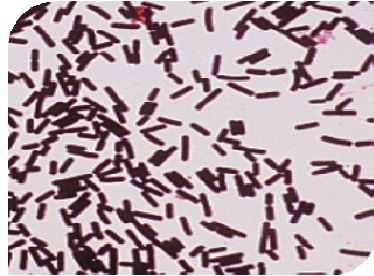


Fig. 9. Esame al microscopico ottico di cellule di *C. perfringens* sottoposte a colorazione di Gram.

Infine, è stato eseguito il test API 20A apposto per l'identificazione di microrganismi anaerobi. Il test è stato allestito e incubato a 37°C per 24 h come descritto in Materiali e Metodi. L'identificazione è ottenuta attraverso un profilo numerico. Si segnano le reazioni positive o negative, come indicato in Fig. 10, e si sommano i numeri corrispondenti alle reazioni positive a gruppi di 3. Il codice ottenuto (46124023) è stato immesso in un database interattivo permettendo di assegnare genere (*Clostridium*) e specie (*perfringens*) al batterio in esame.

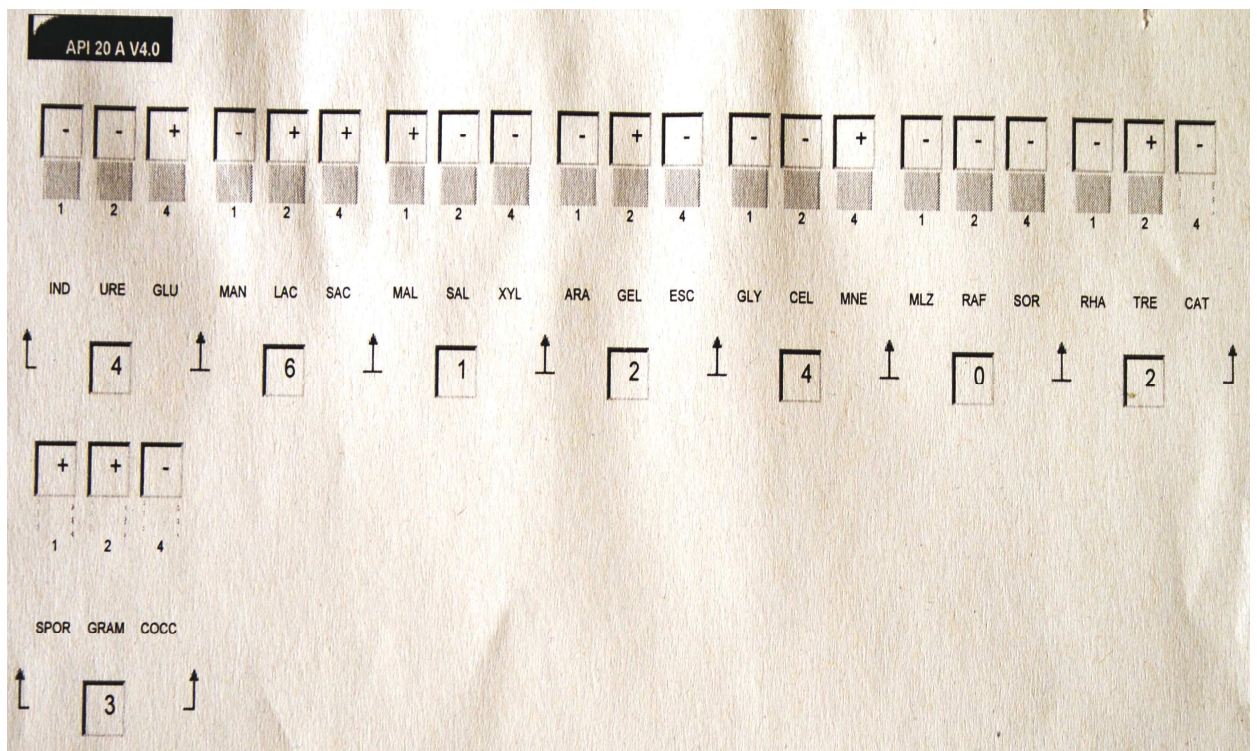


Fig. 10. Interpretazione del test API 20A dopo incubazione a 37°C per 24 h. +/-, indicano positività/negatività della reazione. Il significato delle sigle riportate sotto ogni celletta è descritto in Materiali e Metodi (pag. 35).



Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, o identificate con i sistemi miniaturizzati di prove biochimiche, si calcola, poi, il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:  $C = Z \cdot V_s / V_t$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

Z = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V<sub>t</sub> = volume (mL) di campione analizzato;

V<sub>s</sub> = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL).

#### 4.4 Conta delle colonie cresciute a 37°C e 22°C

Infine, per quanto riguarda l'ultimo indicatore, cioè la **conta delle colonie cresciute a 37°C e 22°C**, bisogna esprimere i risultati come UFC per millilitro di campione per ciascuna temperatura d'incubazione. Se, nelle piastre inoculate, non sono cresciute colonie oppure sono cresciute in numero inferiore a 15, si esprime il risultato come "non rilevato"/mL. Se sono presenti più di 300 colonie, si esprime il risultato come >300/mL, poiché questo è l'intervallo che precisa la Norma ISO 8199:2005 per la tecnica della semina per inclusione. Infatti, non è un metodo selettivo, ma quantitativo, in cui bisogna contare tutte le colonie presenti. La legge, nel caso di acque potabili, dà il limite solo per le acque imbottigliate (per quelle incubate a 22°C ≤ 100 UFC/ml e per quelle a 37°C ≤ 20 UFC/ml), mentre per le altre scrive che il numero di UFC/ml non deve dimostrare variazioni anomale durante il periodo dei controlli, ovvero deve rimanere più o meno lo stesso; in ogni caso, un'acqua di buona qualità è sempre caratterizzata da una carica batterica molto bassa.

#### 4.5 Conclusioni

Quando si affronta un'analisi microbiologica di campioni qualunque di acqua destinata al consumo umano non è possibile andare a ricercare tutti i microrganismi patogeni presenti. Pertanto, si ricercano Coliformi totali, *E. coli*, Enterococchi, *Clostridium perfringens* e carica microbica a 22 e 37°C, che segnalano la possibile presenza di patogeni con caratteristiche simili. Questi microrganismi indici devono essere isolati selettivamente e confermati affinché il risultato sia il più affidabile possibile. La ricerca di Coliformi e *E. coli* è stata effettuata utilizzando i metodi APAT-IRSA-CNR 7010C e APAT-IRSA-CNR 7030C in alternativa a quelli definiti dal D.lgs n. 31/01. Come dimostrato dai valori di sensibilità, specificità, efficienza e selettività (caratteristiche prestazionali), i metodi APAT-IRSA-CNR 7010C e APAT-IRSA-CNR 7030C sono sicuramente efficienti e qualitativi dal punto di vista del riconoscimento dell'appartenenza di un batterio ad una determinata specie ricercata. Pertanto, possono essere facilmente utilizzati per un'analisi di routine nei laboratori microbiologici.

## Bibliografia

- ❖ **American Water Works Association.** 1999a. Committee Report. Emerging pathogen bacteria. *JAWWA* 91: 101-9.
- ❖ **American Water Works Association.** 1999b. Committee Report. Emerging pathogens viruses, protozoa, and algal toxins. *JAWWA* 91: 110-21.
- ❖ **Barrell RA, Hunter PR, Nichols G.** 2000. Microbiological standards for water and their relationship to health risk. *Commun Dis Pub Health* 3: 8-13.
- ❖ **Bartram J, Thyssen N, Gowers A, et al.** 2002. *Water and health in Europe*. WHO (WHO Regional Publications) p. 109-17.
- ❖ **Bouزيد M, Steverding D, Tyler KM.** 2008. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Curr Opin Biotechnol* 19: 302-6.
- ❖ **Havelaar AH, Heisterkamp SH, Hoekstra JA, et al.** 1993. Performance characteristics of methods for the bacteriological examination of water. *Water Science Technology* 27: 1-13.
- ❖ **La Placa M.** 2002. *Principi di Microbiologia Medica*. Esculapio Editore.
- ❖ **Leclerc H.** 2003. Relationship between common water bacteria and pathogens in drinking water. In: Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmaker A (Eds). *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. London: IWA Publishing. p. 80-118.
- ❖ **Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E.** 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol* 28: 371-409.
- ❖ **Lee SH, Levy DA, Craun GF, et al.** 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreak - United States, 1999-2000. *MMWR* 51: 1-47.
- ❖ **Louria DB.** 2000. Emerging and re-emerging infections: the social determinants. *Futures* 32: 581-94.
- ❖ **Momba MNB, Kfir R, Venter SN, et al.** 2000. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA* 1: 59-66.
- ❖ **Morris RD, Levin R.** 1995. Estimating the incidence of waterborne infectious disease related to drinking water in the United States. In: Reichard EG, Zapponi GA (Ed). *Assessing and managing health risks from drinking water contamination: approaches and applications*. Wallingford: IAHS; p.75-88.
- ❖ **Palumbo SA, Rajkowski T, Miller AJ.** 1997. Current approaches for reconditioning process water and its use in food manufacturing operations. *Trend Food Sci Technol* 8: 69-74.
- ❖ **Patz JA, Epstein PR, Burke TA, et al.** 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic disease. *Int J Parasitol* 30:1395-405.
- ❖ **Payment P, Hunter PR.** 2001. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standards and health*. London: IWA Publishing. p. 61- 89.

- ❖ **Poullis DA, Attwell RW, Powell SC.** 2002. An evaluation of waterborne disease surveillance in the European Union. *Rev Environ Health* 17: 149-61.
- ❖ **Romprè A, Servais P, Baudart J, et al.** 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods* 49: 31-54.
- ❖ **Rose JB, Daeschner S, Easterling DR, et al.** 2000. Climate and waterborne disease outbreaks. *JAWWA* 92:77-87.
- ❖ **Sharma S, Sachdeva P, Virdi JS.** 2003. Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 424-8.
- ❖ **Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, et al.** 2000. Microbiological safety of drinking water. *Ann Rev Microbiol* 54: 81-127.

## Normativa

- ❖ **APAT-IRSA-CNR Man 29/2003.** Metodi analitici per le acque (Vol. 3).
- ❖ **APAT-IRSA-CNR 7010C.** Coliformi totali. In: APAT-IRSA-CNR Man 29/2003. Metodi analitici per le acque (Vol. 3, Sezione 7000).
- ❖ **APAT-IRSA-CNR 7030C.** *Escherichia coli*. In: APAT-IRSA-CNR Man 29/2003. Metodi analitici per le acque (Vol. 3, Sezione 7000).
- ❖ **Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n° 31.** Attuazione della DIRETTIVA 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana – Serie generale - n. 52, 3 marzo 2001.
- ❖ **Direttiva 98/83/CE.** Consiglio dell’Unione Europea del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea - Serie L – n. 330, 5 dicembre 1998.
- ❖ **ISO 7899-2:2000.** Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: membrane filtration method.
- ❖ **ISO 8199:2005.** Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.
- ❖ **ISO 19458:2006.** Water quality - Sampling for microbiological analysis.
- ❖ **UNI EN ISO 6222:2001.** Qualità dell’acqua - Valutazione quantitativa dei microrganismi vitali. Conteggio delle colonie per inoculo su terreno agarizzato.
- ❖ **UNI EN ISO 9308-1:2002.** Qualità dell’acqua - Ricerca ed enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi. Metodo di filtrazione su membrana.
- ❖ **UNI ENV ISO 13843:2003.** Qualità dell’acqua - Guida per la validazione di metodi microbiologici.
- ❖ **UNI EN ISO 19458:2006.** Qualità dell’acqua - Campionamento per analisi microbiologiche.

# Ringraziamenti

Innanzitutto, un cordiale ringraziamento alla Dott.ssa Borney e a tutto il laboratorio di microbiologia, Livia, Rita e Joelle, dell'ARPA della Valle d'Aosta per gli insegnamenti, la cortesia e la simpatia durante il periodo di tirocinio.

Successivamente, un immenso ringraziamento per l'attenzione, la pazienza e la cordialità alla Prof.ssa Edda De Rossi.

Dopodichè, un affettuoso ringraziamento alle persone che mi hanno aiutato ad affrontare con serenità ed allegria questi tre anni di università, permettendomi di arrivare fino qua. Ringrazio, quindi, l'insostituibile compagna di viaggio Chiara e gli amici vicini e lontani, tra cui soprattutto Sophie, Alessia, gli amici dell'università Serena, Lisa, Elisa e Beppe. Una gratitudine particolare ad una persona speciale, Marco, per l'aiuto e l'affetto che riesce sempre a dimostrarmi.

Infine, non può mancare un doveroso ringraziamento alla mia famiglia e a tutti coloro che mi vogliono bene.

*Cristina Gyppez*