

ESTRATTO



Volume 18 - Numero 10
Ottobre 2005
ISSN 0394-9303

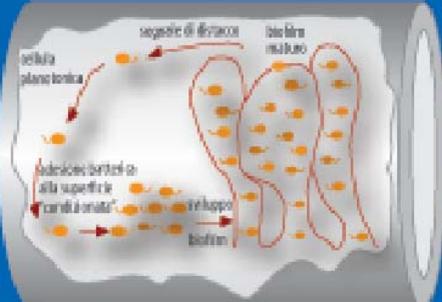
Notiziario

dell'Istituto Superiore di Sanità

**Biofilm microbici nelle reti idriche:
implicazioni di carattere sanitario**

**Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco,
Simonetta Della Libera**

Poste Italiane S.p.A. - Spedizione in abbonamento postale 70% DC Lazio - Roma



www.iss.it

BIOFILM MICROBICI NELLE RETI IDRICHE: IMPLICAZIONI DI CARATTERE SANITARIO E TECNOLOGICO



Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Simonetta Della Libera
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ISS

Riassunto – I biofilm microbici che si producono negli ecosistemi naturali e nei sistemi industriali sono strutture complesse ed eterogenee, costituite da cellule microbiche e polimeri extracellulari (EPS) dove possono coesistere microrganismi autoctoni, patogeni, opportunisti patogeni e composti organici ed inorganici. La presenza di biofilm nelle opere acquedottistiche è causa di numerosi problemi che rendono necessario il controllo del loro sviluppo negli impianti. Vengono quindi discusse le cause della sua formazione nelle reti idriche. Sono, inoltre, illustrati gli aspetti sanitari e tecnologici legati all'evoluzione di questi fenomeni e agli interventi per ridurre la presenza nelle tubature, anche in relazione alle caratteristiche dei materiali che possono essere impiegati a contatto con l'acqua potabile, definite in un decreto alla cui stesura ha partecipato anche l'Istituto Superiore di Sanità.

Parole chiave: acque destinate al consumo umano, biofilm, impianti idrici

Summary (*Microbial biofilms in drinking water pipelines: hygienic and technological aspects*) – Biofilms can be found in many natural and industrial systems. They are complex and heterogeneous structures where autochthonous, pathogens, opportunistic pathogens and chemical substances are embedded in a matrix of microbial origin, consisting of extracellular polymeric substances (EPS). Their effects in drinking water pipelines can be damaging, therefore a need to control these complex ecological systems emerges. Causes and hygienic and technological aspects are discussed and some countermeasures are illustrated, also in relation to an Italian decree formulated with the contribution of the Istituto Superiore di Sanità.

Key words: biofilm, distribution systems, drinking water

lucybond@iss.it

Nelle acque utilizzate a scopo potabile la flora microbica costituisce una presenza costante, ma in continua evoluzione. È infatti da tenere presente che l'acqua potabilizzata è microbiologicamente diversa da quella grezza e può comunque trasportare non solo microrganismi che fanno parte della flora autoctona, eventualmente selezionati, ma anche microrganismi alloctoni che sono stati in grado di sopravvivere ai processi di trattamento delle acque, compresa la disinfezione. Alcuni di essi possono trovare le condizioni favorevoli al loro mantenimento in rete. Il processo dinamico legato alla successione e all'evoluzione dell'attività microbica nell'acqua, pur non cessando mai completamente, può rallentare in risposta ad una serie di fattori, primi tra tutti una limitazione di nutrienti e variazioni della temperatura dell'acqua. In seguito a questa attività, percepibili modifiche delle caratteristiche dell'acqua in distri-

buzione possono manifestarsi sia con alterazioni del sapore, dell'odore e del colore, sia con problemi di ordine sanitario, inclusa la non conformità ai requisiti di qualità stabiliti dalla normativa. È anche in questo contesto che le caratteristiche dei materiali che possono essere impiegati a contatto con l'acqua potabile sono state definite in una normativa italiana alla cui elaborazione ha partecipato anche l'Istituto Superiore di Sanità (1).

La formazione di biofilm nelle reti idriche, oltre a modificare le caratteristiche organolettiche dell'acqua, è causa di guasti operativi negli impianti idrici riconducibili principalmente a problemi meccanici, di efficienza dei processi di trattamento dell'acqua e, non ultimi, sanitari.

I biofilm microbici si formano sulle superfici a contatto con l'acqua di tutti gli elementi che compongono le opere acquedottistiche, dalle condotte, ai serbatoi e al sistema di tubazioni nel quale ►

sono inseriti i dispositivi di erogazione alle utenze di servizio e private. Concentrazioni di carbonio organico disponibile (AOC) favoriscono il loro sviluppo che, per lo più, si manifesta in corrispondenza di tratti della rete dove è ridotta la velocità di flusso dell'acqua (diramazioni, curve, raccordi, valvole) o dove si stabiliscono condizioni di potenziale ristagno (bracci morti, tubi delle utenze private, rubinetti, guarnizioni, raccordi e rompigitto, apparecchi per il trattamento domestico dell'acqua). In condizioni di dinamicità del sistema, i biofilm si distaccano dal substrato e, trasportati dall'acqua, giungono ai consumatori.

Anche se, nella sua accezione specifica, il termine biofilm indica monostrati cellulari continui, l'espressione è comunemente usata per descrivere la patina di microrganismi che si forma su superfici di varia natura immerse in un fluido (acqua, aria). La struttura di questa pellicola è alquanto complessa. Classici esempi di produzione di questo fenomeno si osservano sulle superfici immerse degli scafi delle barche e sulle superfici affrescate, e allo stesso principio è stato fatto riferimento per spiegare scientificamente il famoso miracolo di Bolsena.

I biofilm sono composti primariamente da cellule microbiche e polimeri extracellulari (EPS) altamente idratati che costituiscono uno strato organico in cui possono venire a trovarsi batteri, alghe, virus, protozoi e componenti organiche e inorganiche. Gli EPS possono costituire il 50-90% del carbonio totale presente nei biofilm e possono essere considerati la loro matrice primaria. Pur variando nelle proprietà chimiche e fisiche, sono principalmente composti da polisaccaridi e proteine che possono

essere associati a ioni metallo, cationi bivalenti e altre macromolecole.

L'adesione dei microrganismi alle superfici è un processo molto complesso a causa delle numerose variabili coinvolte: il tipo di substrato, l'idrodinamica del sistema, le caratteristiche del mezzo e varie proprietà della superficie cellulare. Generalmente, nel processo di adesione le caratteristiche della superficie solida hanno importanza primaria. In particolare, su una superficie esposta a un mezzo acquoso, inevitabilmente e quasi immediatamente, aderiscono polimeri e macromolecole: la risultante modificazione chimica ha effetto su quantità ed estensione dell'aggregato microbico (Figura 1).

In generale, l'adesione microbica avviene più rapidamente su superfici rugose ed idrofobiche. Essa sembra aumentare proporzionalmente con la rugosità della superficie, ma è anche nota l'influenza dell'idrofobicità della superficie cellulare, della presenza di fimbrie e flagelli e della produzione di EPS. In questo ambito è stata anche formulata l'ipotesi che, per superare le forze di repulsione dei batteri nei confronti di parecchi materiali abiotici, siano importanti le caratteristiche di motilità microbica. Il quadro che emerge è che le varie strutture hanno ruoli distinti nella formazione del biofilm a seconda delle specie e delle condizioni ambientali (2).

La formazione di biofilm avviene mediante stratificazioni successive sicché la struttura che ne deriva è eterogenea e costituita da microcolonie di cellule microbiche incapsulate in una matrice di EPS e separate da canali interstiziali. Tra i canali interstiziali fluisce acqua che permette la diffusione

di vari composti ed elementi: nutrienti, ossigeno, agenti antimicrobici e disinfettanti. Le cellule microbiche all'interno del biofilm coordinano il loro comportamento per costruire biofilm maturi tramite un sistema di regolazione genica (*quorum sensing*). La comunicazione avviene attraverso la secrezione di alcune "molecole segnale", dette autoinduttori, che, in funzione della densità cellulare, al raggiungimento di un valore soglia (*quorum*), interagiscono con i recettori situati sulla superficie cellulare, controllando l'espressione genica della cellula e quindi la replicazione. In tal modo, in un biofilm, la densità di popolazione ma anche l'espressione di altri fattori, tra cui la

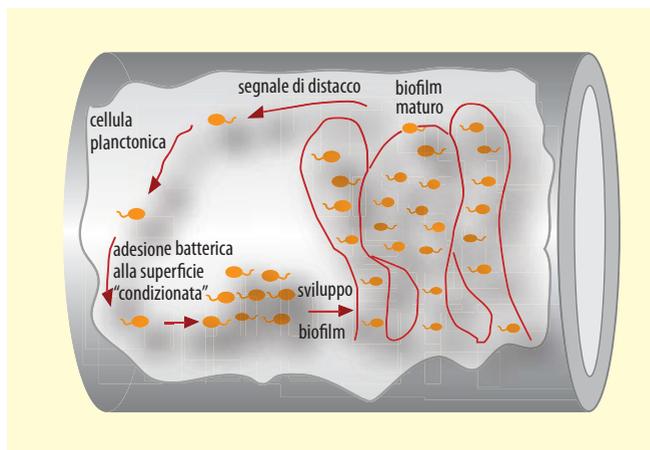


Figura 1 - Schema della formazione di biofilm

virulenza, è regolata dall'espressione coordinata di diversi gruppi di geni.

Gli stessi organismi che compongono un biofilm possono avere un effetto marcato sulla sua struttura. Infatti, è noto che lo spessore del biofilm può essere influenzato dal numero degli organismi presenti, che una specie può aumentare la stabilità dell'altra, come anche che la composizione in specie dipende dalla velocità dell'acqua.

Composizione microbica

Tutti i microrganismi possono contribuire alla formazione di biofilm e più del 99% dei microrganismi presenti sulla Terra vive in stato di aggregazione (Figura 2).

Anche i biofilm delle reti acquedottistiche possono ospitare un'ampia varietà di organismi e sono caratterizzati da un *turn-over* di gruppi microbici. Un distacco di cellule microbiche e l'adesione di altre sarebbe osservabile in continuo (3). L'ordine delle successioni dipende da diversi fattori, primo tra tutti il ciclo vitale cellulare che comporta che i microrganismi si distacchino attivamente dalle superfici, alternando quindi stadi microbici adesi e stadi planctonici *free-living*. Inoltre, hanno influenza tipologia e disponibilità di nutrienti, fattori fisici e fattori biologici quali competizione e predazione.

Le specie che vanno a costituire i biofilm nei sistemi di distribuzione delle acque potabili sono piuttosto ricorrenti anche se le loro concentrazioni possono ampiamente variare. Tra i primi colonizzatori sono segnalati microrganismi che fanno parte della flora microbica naturale delle acque, principalmente batteri pigmentati, a cui fanno seguito specie appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, attinomiceti e lieviti. Anche alcuni coliformi, come *Klebsiella pneumoniae*, sono più spesso riscontrabili rispetto ad altre specie dello stesso gruppo, molto probabilmente perché hanno un maggior successo competitivo.

Se rare sono le evidenze associate alla presenza di microrganismi patogeni *free-living* nelle acque potabili in distribuzione, soprattutto in Italia, diversi patogeni e potenziali patogeni sono invece stati isolati dai biofilm (*Legionella*, *Aeromonas*, protozoi, micobatteri). Controversa invece è l'opinione degli studiosi sulla presenza di virus, anche se la recente

segnalazione di un mimivirus all'interno di amebe apre nuove spazi allo studio di questi fenomeni.

Anche se patogeni alloctoni partecipano alla formazione della struttura del biofilm, hanno comunque difficoltà a mantenersi vitali a causa delle loro specifiche necessità di crescita e della loro incapacità di competere con gli organismi autoctoni. Tuttavia, anche in queste condizioni, l'adesione contigua e fenomeni di fagocitosi da parte di amebe ambientali sono fattori che ne favoriscono la sopravvivenza e, come nel caso di *Legionella*, anche la moltiplicazione. Inoltre, la specifica architettura del biofilm rende inefficace l'azione dei biocidi, come dimostrato anche da prove effettuate in laboratorio.

Fenomeni di biocorrosione

Oltre ai batteri indicatori, a potenziali patogeni e a patogeni primari, tra i microrganismi che concorrono alla formazione di biofilm si ritrovano anche quelli che producono la corrosione delle condotte e delle tubature, generalmente gruppi microbici a cui appartengono prevalentemente microrganismi ambientali che non hanno rilevanza sanitaria. Le loro concentrazioni nelle reti possono essere molto elevate (4). In questi casi, nella struttura del biofilm prevalgono composti inorganici e lo sviluppo del fenomeno è il risultato di processi galvanici prodotti all'interno e all'esterno delle condotte metalliche, spesso favoriti da attività microbica e da fattori che rendono l'acqua aggressiva per caratteristiche legate a pH acido, a un grado elevato di durezza, a presenza di cloruri e/o solfati. L'attività microbica può inoltre aumentare l'accumulo ►



Figura 2 - Cellule microbiche aggregate

lo di ossidi di ferro, alluminio, manganese, silice, carbonato di calcio e di altri composti inorganici che, come prodotti della corrosione, possono rappresentare un fattore aggiuntivo di protezione nei confronti degli organismi. I microrganismi possono provocare corrosione nelle condotte metalliche delle reti acquedottistiche anche riducendo l'ossigeno disciolto, liberando metaboliti corrosivi, producendo acido solforico e partecipando al processo catodico. Gli stessi organismi sono anche causa di biodeterioramento di materiali come le plastiche e le gomme utilizzate nelle tubature che vengono quindi a rappresentare fonte di nutrienti organici che ne sostengono la crescita.

Alcuni dei microrganismi spesso riscontrati in associazione a questi fenomeni possono dare origine a torbidità e colorazioni delle acque osservabili anche dalle utenze, soprattutto dopo stagnamento di acqua nei tubi.

Materiali a contatto con le acque destinate al consumo umano

La rete di condotte dell'acqua potabile costituisce la parte più estesa del sistema di distribuzione. Tra i diversi fattori che favoriscono la colonizzazione degli impianti da parte dei microrganismi naturalmente presenti o eventualmente introdotti nelle acque, i materiali componenti e i dispositivi di giunzione delle tubature rivestono importanza primaria. Numerosi sono infatti i materiali che possono essere utilizzati per il trasporto dell'acqua nelle opere idrauliche che dalla captazione la distribuiscono fino alle utenze. Acciaio zincato, ghisa, rame, ferro galvanizzato, calcestruzzo, cemento amianto, polivinilcloruro (PVC), polibutilene (PB), polietilene ad alta densità (PEAD) possono essere componenti per tubazioni, raccordi, guarnizioni e accessori negli impianti (1). Alcuni di questi materiali facilitano più di altri la colonizzazione e lo sviluppo di nicchie di moltiplicazione e resistenza microbica. È stato, ad esempio, osservato che nelle condotte in ferro colonizzate da biofilm, i prodotti della corrosione, interferendo con il cloro libero, conducono



ad una domanda di cloro 10 volte maggiore rispetto a tubazioni di altro materiale (5).

Attualmente, le informazioni relative all'influenza sull'attività microbica da parte di materiali utilizzati negli impianti acquedottistici sono disponibili per un numero limitato di composti. È tuttavia significativa l'ipotesi che i microrganismi presenti, selezionati anche in funzione della loro resistenza ai trattamenti di disinfezione e adattati a condizioni di oligotrofia e deplezione di nutrienti, abbiano sviluppato particolari caratteristiche di sopravvivenza e vengano ulteriormente selezionati in base alla disponibilità di sostanze e sottoprodotti presenti.

Disinfezione delle acque

Nelle acque clorate, l'adesione dei microrganismi alle particelle e alle superfici inerti ne facilita la sopravvivenza poiché ne riduce l'esposizione fisica all'azione ossidante dei disinfettanti. Pertanto, malgrado la presenza nelle acque in rete di una frazione residua di disinfettante, la formazione del biofilm si verifica costantemente ed è noto che alcuni biocidi aumentano il contenuto di nutrienti, ossidando le sostanze organiche più stabili e rendendole più disponibili per i microrganismi.

Per prevenire la ricrescita batterica in rete e la formazione di biofilm sarebbero necessarie concentrazioni di cloro libero ben più elevate di quelle consentite (0,2 mg/L). Infatti, si ritiene che, in generale, la tolleranza ai biocidi dei microrganismi costituenti i biofilm è di 2-3 ordini di grandezza

maggiore rispetto alle cellule *free-living*. Anche lo slime di polisaccaridi secreto da alcuni ceppi batterici del biofilm ha una funzione protettiva verso i trattamenti di disinfezione. È stato comunque osservato che l'azione dei disinfettanti sul biofilm può significativamente variare in funzione dei diversi materiali su cui il biofilm si è prodotto. Il cloro, ad esempio, è più efficace se il biofilm si trova su superfici di bottiglie in vetro e su superfici di ferro galvanizzato rispetto a biofilm cresciuti su PVC. D'altra parte, il biossi-

do di cloro ha un effetto più marcato sui microrganismi di biofilm prodotti su PVC, acciaio e rame rispetto a una disinfezione attuata con raggi ultravioletti (6).

Nella valutazione dell'efficacia dei trattamenti di disinfezione finalizzati al controllo dei fenomeni di biofouling devono essere considerati diversi fattori, spesso tra loro interconnessi. Ad esempio, nel caso specifico in cui per la disinfezione venga utilizzato sodio ipoclorito, può verificarsi che, in presenza di sostanza organica, si formino composti organoalogenati; in più il cloro, oltre a determinare sapori e odori sgradevoli, può amplificare i fenomeni di corrosione pur avendo un effetto limitato sui microrganismi. Viene comunque ridotto rapidamente nei sistemi di distribuzione e gli stessi materiali componenti le strutture della rete giocano un ruolo importante nell'abbattimento delle sue concentrazioni.

Misure preventive

La presenza e la persistenza di diverse specie microbiche in biofilm anche esposti all'azione di disinfettanti possono costituire un punto critico nelle procedure di controllo della qualità delle acque potabili. Molti organismi, tra cui anche i patogeni, aggregati e successivamente rilasciati nel flusso d'acqua possono giungere ai rubinetti dei consumatori. Da ciò deriva l'opportunità di controllare e minimizzare l'attività microbica nei sistemi di distribuzione dell'acqua, con un processo che può essere condotto solo mediante una combinazione di misure preventive.

Anche se non esistono criteri globali applicabili a tutti i sistemi, in generale le strategie di controllo dovrebbero principalmente considerare le possibili relazioni tra le densità microbiche e i parametri gestionali e di manutenzione degli impianti.

A fini preventivi, alcuni interventi, che potrebbero garantire condizioni di buona manutenzione degli impianti e caratteristiche di buona qualità dell'acqua, possono essere facilmente eseguiti anche dalle utenze private con l'eliminazione periodica delle incrostazioni e del sedimento dai diffusori delle docce e dai rompigitto dei rubinetti e con la rimozione dei depositi dagli scaldabagni. È anche opportuno verificare che non vengano a crearsi condizioni di limitazione di flusso dell'acqua o di tubature con assenza di flusso o flusso intermitten-



te in casi di eventuali modifiche apportate all'impianto, di nuove installazioni o di lavori di manutenzione esterni agli impianti domestici. Inoltre, è sempre una buona abitudine quella di far fluire l'acqua dai rubinetti, per qualche minuto, prima di consumarla, non solo dopo periodi prolungati di mancato utilizzo, ma anche dopo il periodo notturno. Infatti, negli intervalli di inattività degli impianti domestici si realizzano condizioni di stagnamento di acqua nei tubi che promuovono sia la concentrazione di composti di natura chimica sia quei meccanismi di aggregazione e adesione microbica che caratterizzano i biofilm. ■

Riferimenti bibliografici

1. Italia. Decreto 4 aprile 2004, n. 174. Regolamento concernente i materiali e gli oggetti che possono essere utilizzati negli impianti fissi di captazione, trattamento, adduzione e distribuzione delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale Serie generale* n. 166 (Suppl. ordinario del 17 luglio 2002).
2. Van Delden C. *Virulence factors in P. aeruginosa*. In: *Pseudomonas, genomics, life style and molecular architecture*. Ramos JL (Ed.). Granada: CSIC; 2004.
3. McFeters GA. *Biofilm development and its consequences*. In: *Microbial adhesion and aggregation*. Marshall KC (Ed.). Berlin: Springer-Verlag; 1984.
4. Geldreich EE. *Microbial quality of water supply in distribution systems*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc; 1996.
5. Fletcher M. *Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies*. In: *Bacterial adhesion*. Fletcher M. (Ed.). New York: Wiley-Liss; 1996.
6. Wingender J, Gobe S, Fiedler S and Flemming HC. *The effect of extracellular polysaccharides on the resistance of Pseudomonas aeruginosa to chlorine and hydrogen peroxide*. In: *Biofilms in the aquatic environment*. Keevil CW, Godfree A, Holt D and Dow C (Ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1999.