

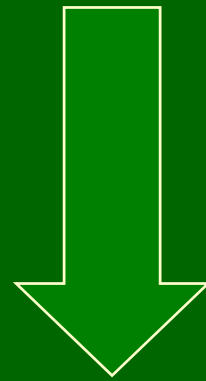
Problemi di alterazione microbiologica delle reti idriche: il fenomeno del biofilm

Simonetta Della Libera
e

Maurizio Semproni
(precari Iss dal 1991)

14 Novembre 2008

Scopo dei trattamenti di potabilizzazione delle acque



Immissione in rete di un prodotto a basso rischio per la salute pubblica

Nelle acque destinate al consumo umano il titolo microbico è generalmente basso:



Scarsi nutrienti



Presenza di biocidi

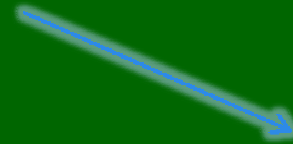
Cause di contaminazione:



Accidentali:

Incidenti durante la potabilizzazione

Rottura tubazioni



Moltiplicazione microbica

Eterotrofi (HPC, heterotrophic plate count)

Microrganismi resistenti ai processi di potabilizzazione
sviluppano capacità di adattamento attraverso



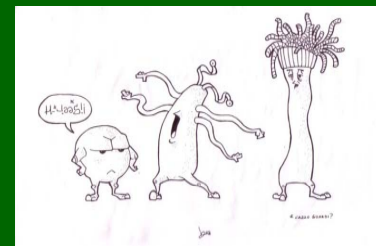
*Modificazioni genotipiche
e fenotipiche*

Flora microbica delle acque

Microrganismi di derivazione fecale

Opportunisti patogeni

Patogeni



Alterazioni metaboliche:

forme vitali non coltivabili (VNC)

Stato dormiente ma vitale, metabolicamente attive, ma non in grado di moltiplicarsi in condizioni standard di laboratorio

FUNZIONE:

Resistenza a fattori ambientali avversi

Legionella, Vibrio, E. coli, Campylobacter

microrganismi in grado di sopravvivere e
(eventualmente) moltiplicarsi danno origine a

BIOFILM

Aggregati cellulari che comprendono comunità
microbiche appartenenti alla stessa specie o a
specie diverse adesi a substrati organici o
inorganici

Batteri, virus, protozoi, ciliati, flagellati,
rotiferi, ecc

1684 Antonie Van Leeuwenhoek



osservò dei microrganismi sulla superficie dei denti



Dove si trova il biofilm?

- Placca dentale



- Strato melmoso sulla roccia bagnata da un ruscello

- Vaso da fiori

Effetti positivi

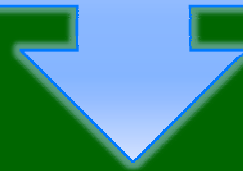
- **attività industriali** per la produzione di enzimi e di diversi metaboliti
- **depurazione** delle acque reflue



Effetti negativi

- Effetti sui monumenti, lapidi, siti archeologici

Cateteri urinari, lenti a contatto



Rischio per la salute



Vantaggi di organizzazione

- Collaborazione tra specie differenti e possibilità di degradare substrati complessi
- Si stabiliscono microambienti caratterizzati da gradienti fisici e chimici.
- La matrice può sequestrare nutrienti dall'ambiente e quindi i microrganismi possono sopravvivere in condizioni oligotrofiche

Vantaggi dell'aggregazione

- ✓ maggiori probabilità di sopravvivenza
- ✓ possibilità di moltiplicarsi
- ✓ effetto protettivo nei confronti dei disinfettanti

CARATTERISTICHE
Fisico-Chimiche-Microbiologiche

Caratteristiche strutturali

+

+

Parametri operativi del sistema

Proprietà superficie cellulare

=

Biofilm

Dove si forma

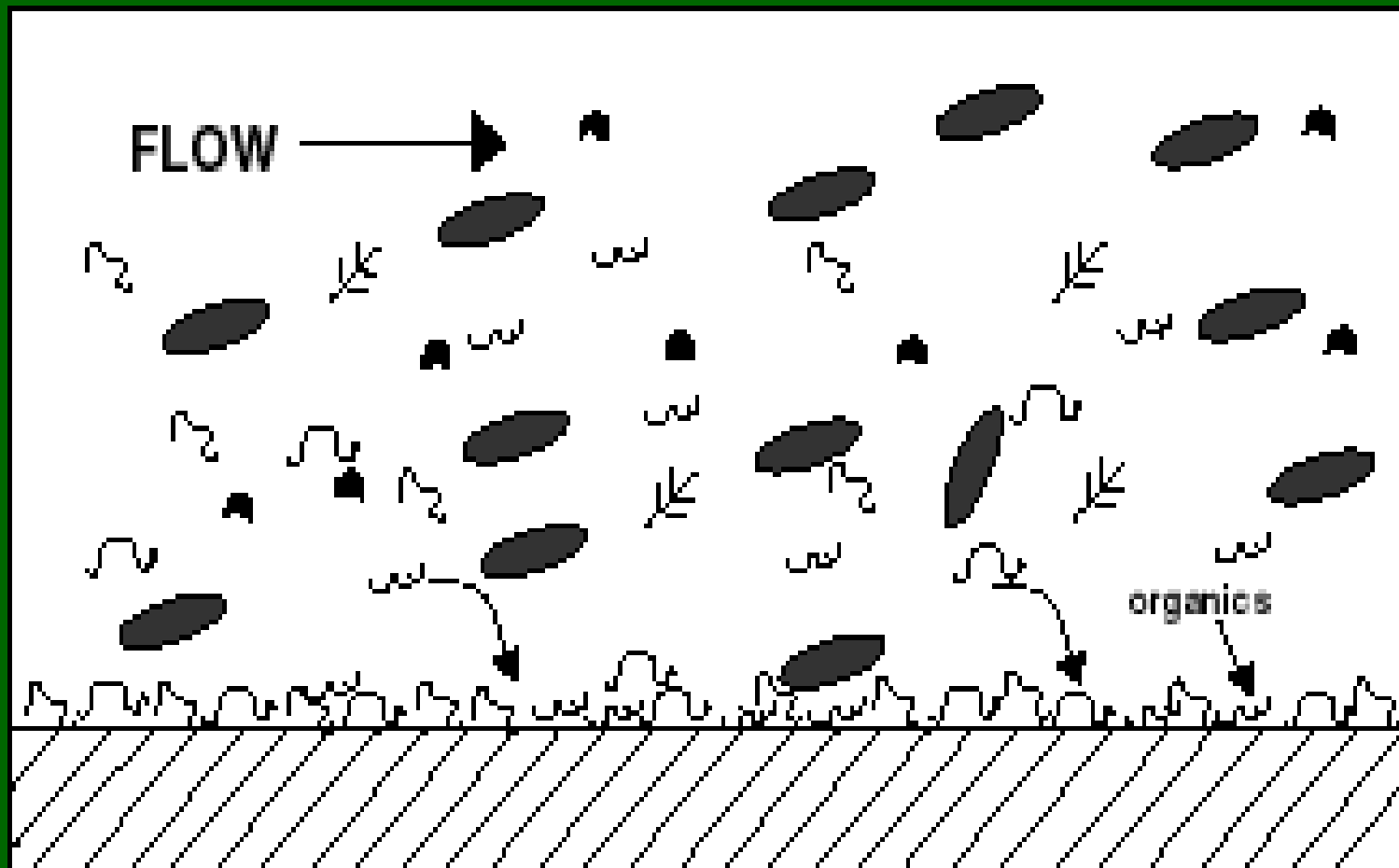
Tratti di rete con velocità ridotta di flusso
(diramazioni, curve, raccordi, valvole)

In condizioni di ristagno (bracci morti, tubi
delle utenze private, rubinetti, soffioni,
raccordi ecc..)

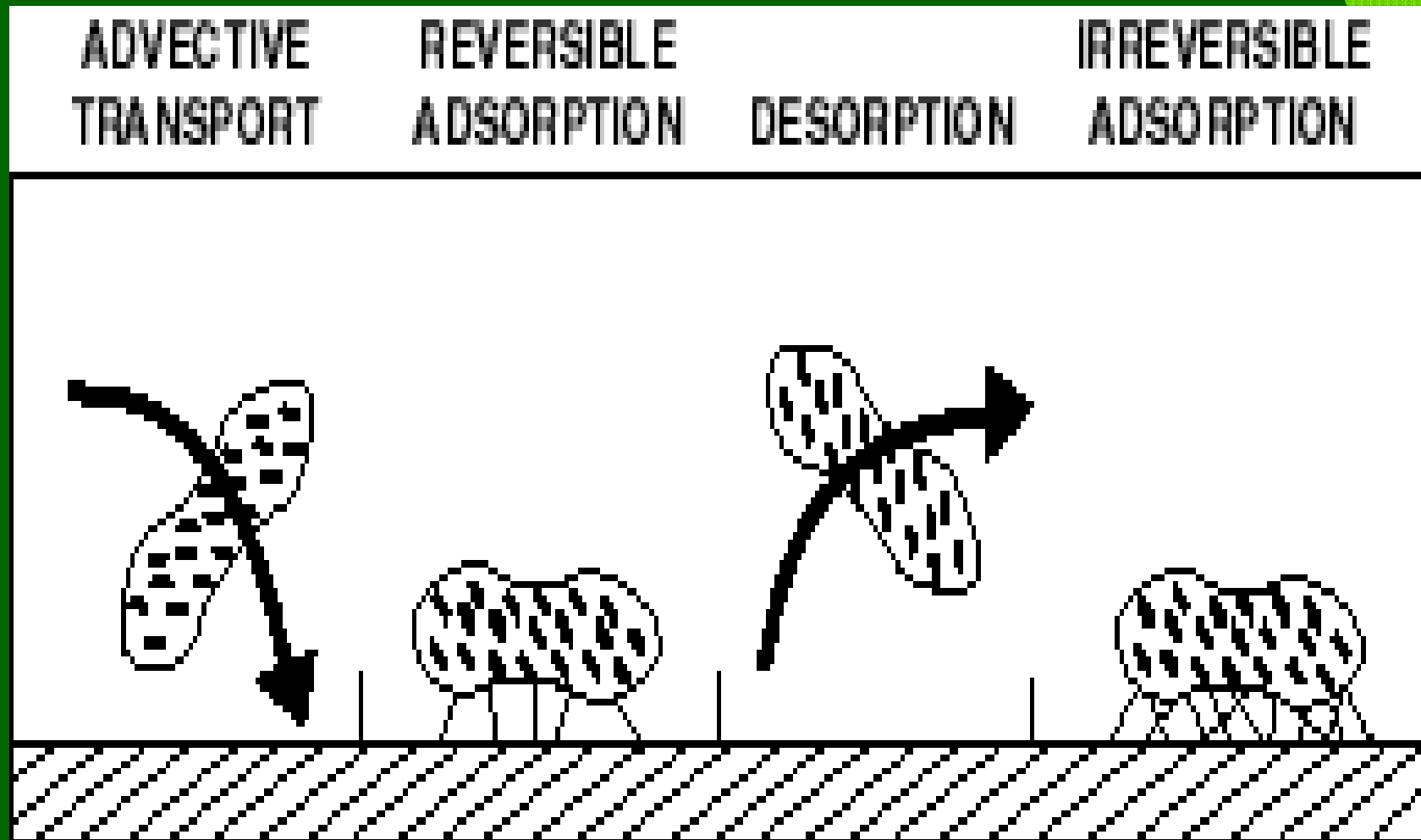


In condizioni di dinamicità del sistema si
staccano e giungono ai rubinetti

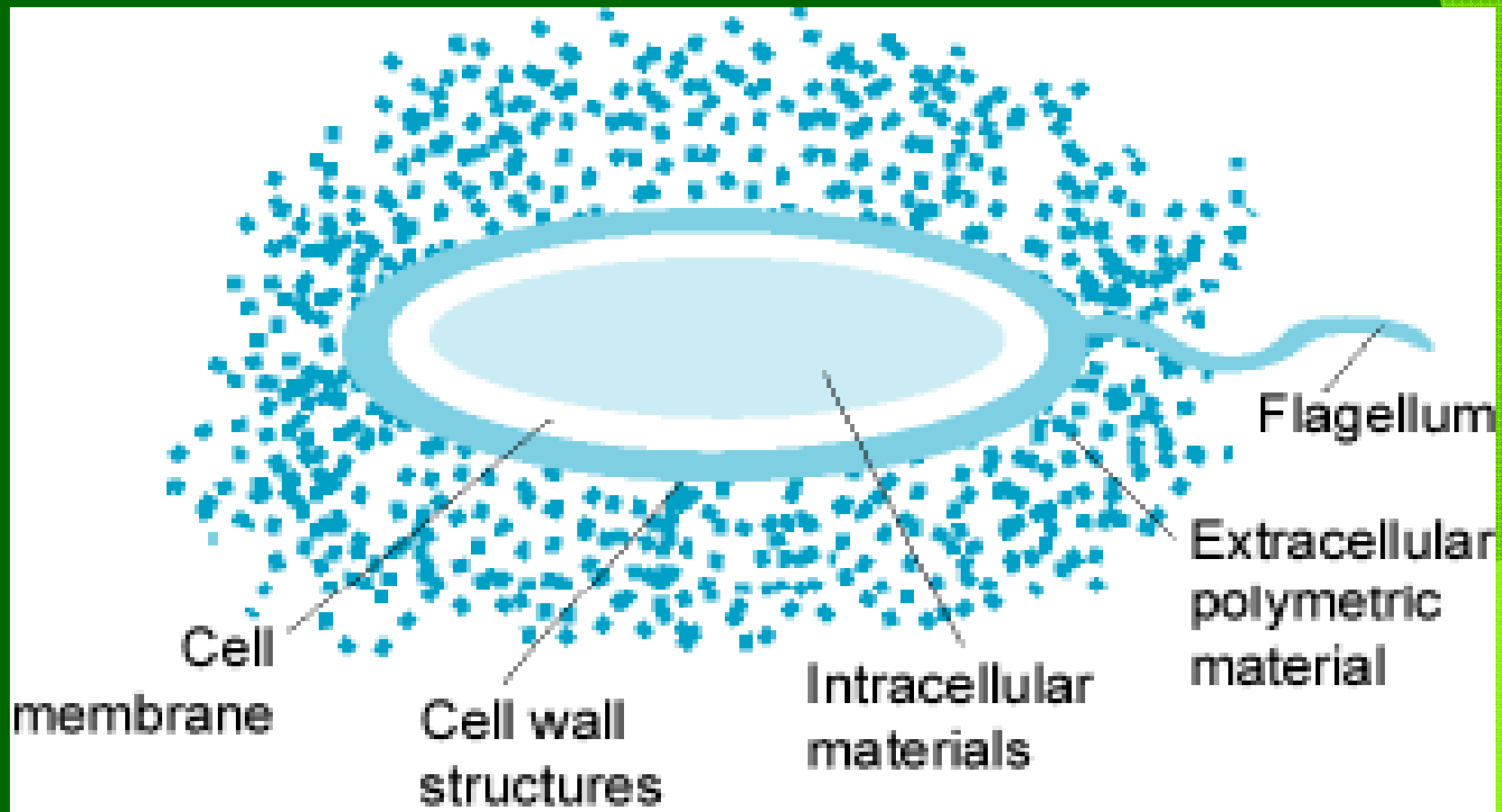
Trasporto molecole organiche



Formazione e Adesione



Sviluppo di (EPS)



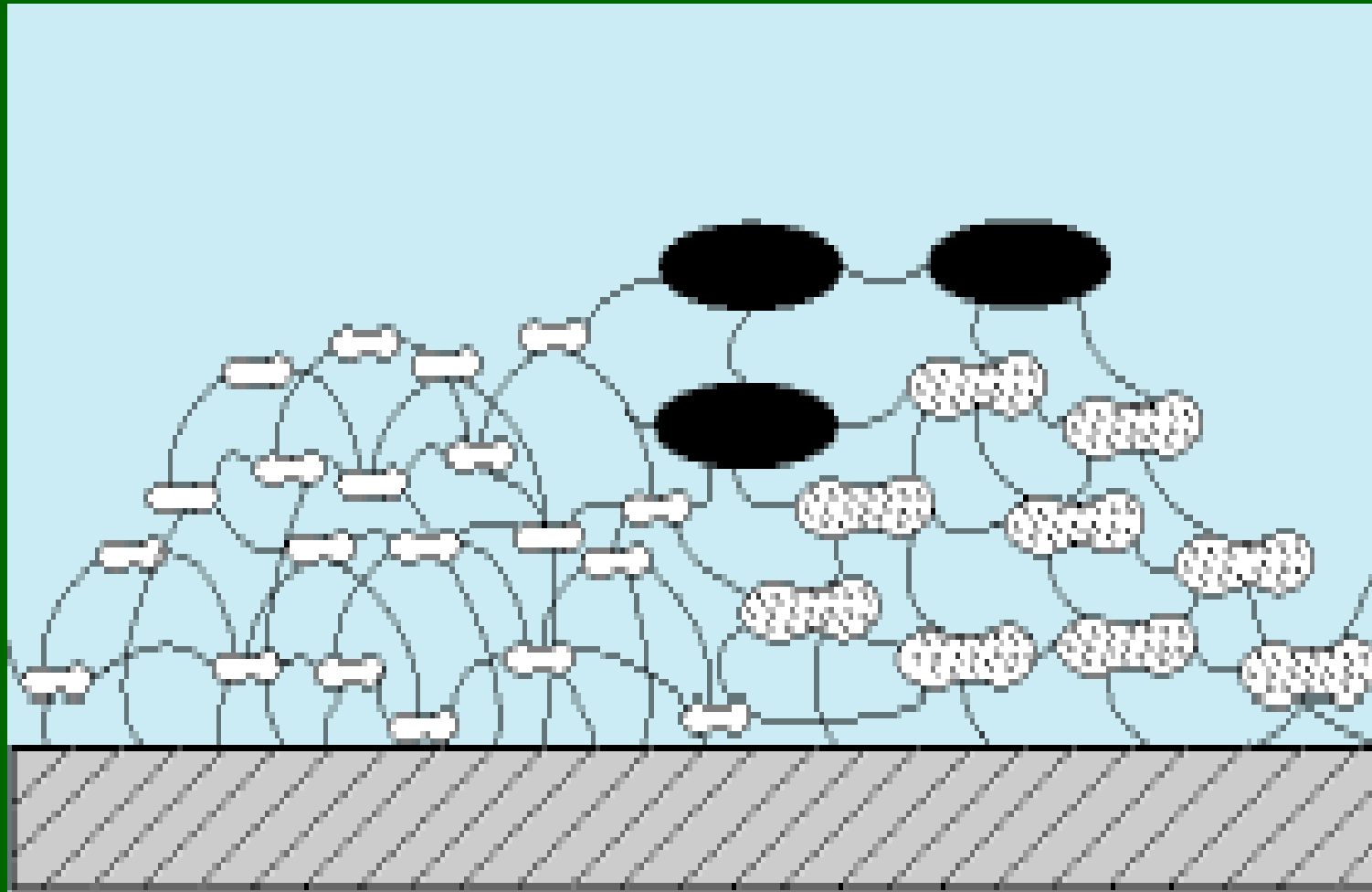
Che cosa sono gli ESP

Sono polisaccaridi e proteine

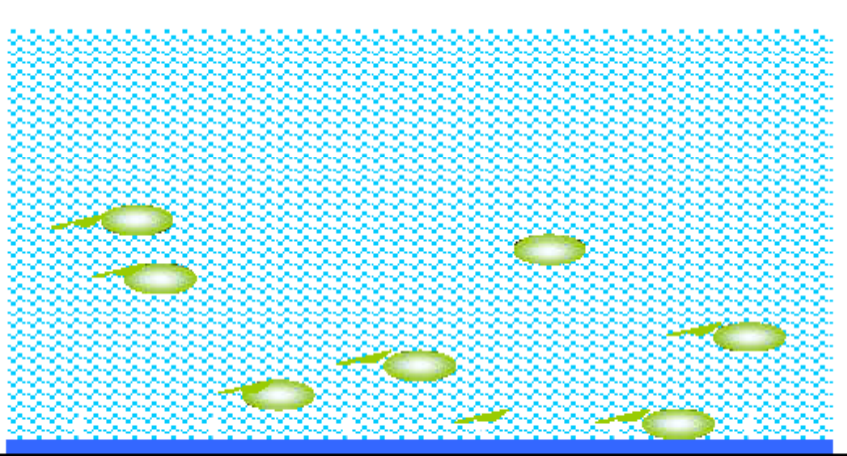
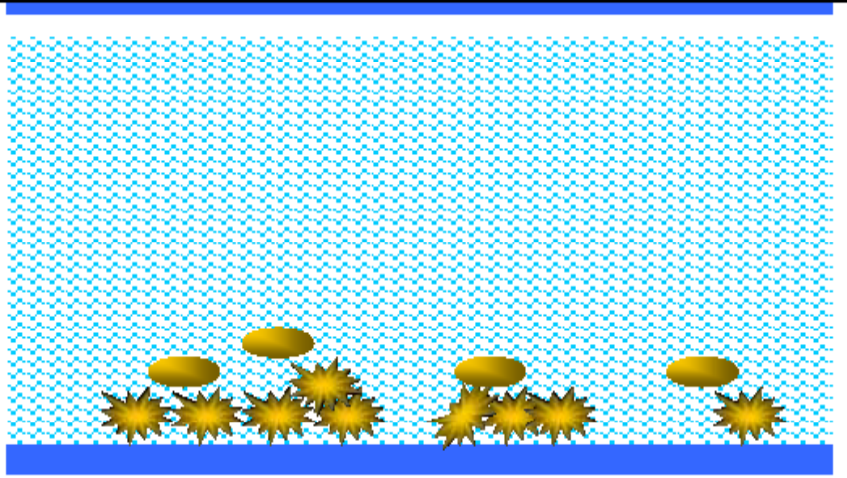


Formano matrici altamente idratate

Formazione di aggregati microbici

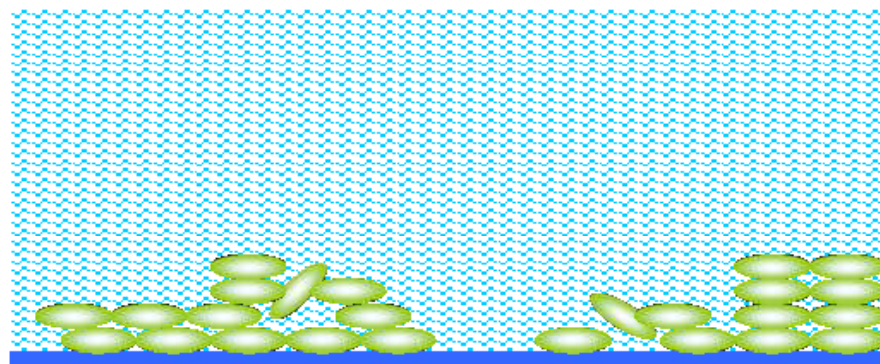


Riassumendo:

	TEMPO	DESCRIZIONE DEL FENOMENO	
1	secondi minuti		Attrazione elettrostatica dei colonizzatori primari (con carica negativa), sulle superfici caricate positivamente. Adesione di tipo reversibile.
			Potenziamento delle adesine ; adesione irreversibile dei batteri sulla superficie. Cattura di altre cellule batteriche (colonizzatori secondari).

3

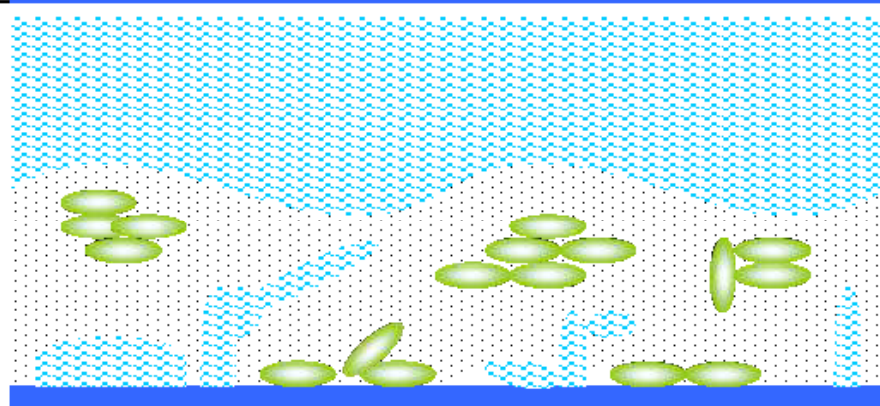
ore
giorni



Crescita dei batteri.

4

ore
giorni



Formazione della **ma-
trice** per produzione di
esopolisaccaridi; avvio
della organizzazione dei
cell cluster.
Completamento della
struttura del biofilm, con
formazione dei canali alla
base.

5

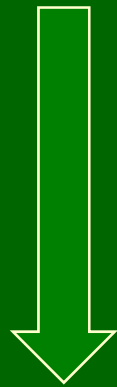
giorni
mesi



Consolidamento dello
sviluppo della matrice,
adesione esterna di altri
batteri e di particelle di
sostanze di varia natura.
Aumento dello spessore
del biofilm con struttura
alveolare.

I batteri non sono in grado di "Cantare o Ballare"

- Possono scambiarsi informazioni rilasciando nell'ambiente una serie di "messaggi"



"Autoinduttori"



“Quorum sensing”



Sistema complesso di comunicazione “cellula-cellula”



Diversi mediatori chimici :

Batteri Gram- Acil omoserina Lattoni (AHLs)

Batteri Gram+ Peptide ribosomiale induttore (AIP) “peptide feromone”

Ordine delle successioni microbiche
dipende:

Fattori fisico-chimici
legati alle proprietà del mezzo

Fattori biologici
(predazione/competizione)

Successione primaria

Microrganismi in grado di aderire (glicocalice o appendici) *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus*

Successione secondaria

Microrganismi che utilizzano sottoprodotti metabolici dei colonizzatori primari Lieviti, funghi, forme filamentose, microalghe

Cell cluster

Stabilizzazione delle specie presenza di un'ampia varietà di microrganismi in simbiosi tra loro.

Batteri potenzialmente patogeni di origine fecale

Campylobacter
Helicobacter pylori
E. coli

Specie ambientali

Pseudomonas
Legionella
MAC (*Mycobacterium avium* Complex)

Batteri opportunisti patogeni in grado di moltiplicarsi

Aeromonas (Indicatore di potenzialità di crescita del biofilm: Valore guida 200 UFC/100 mL in NL)

Virus (*Rotavirus e Calicivirus*)

Protozoi (*Giardia, Criptosporidium, amebe*)

Legionella

Microrganismo di origine ambientale
con habitat naturale nelle acque

(acque superficiali, acque stagnanti, biofilm,
impianti di condizionamento dell'aria)

Patogeno emergente

sopravvive bene in acque calde e fredde
e in presenza di amebe

Condizioni che favoriscono la proliferazione di *Legionella*

- $20^{\circ}\text{C} < T^{\circ}\text{C acqua} < 45^{\circ}\text{C}$
- $> 45^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ condizioni di non sopravvivenza (VNC)
- $> 60^{\circ}\text{C}$ è uccisa
- La presenza di sedimenti, fanghi, scorie, materiali organici e amebe e protozoi ciliati può agire come sorgente di nutrimento
- Il biofilm all'interno del sistema idrico svolge sempre un ruolo importante nel dare rifugio e produrre condizioni favorevoli per la ricrescita
- Effetto barriera nei confronti dei biocidi usati per la bonifica, altrimenti efficaci quando questi organismi sono sospesi nell'acqua
- Colonizza più facilmente in certi tipi di materiale di rivestimento delle reti, raccorderia ed accessori idrica

Precauzioni generali per evitare la proliferazione di *Legionella* nelle reti idriche

- Temperatura dell'acqua (fattore per il controllo del rischio);
- Evitare la stagnazione dell'acqua;
- Tenere il sistema pulito per evitare l'accumulo di sedimenti, incrostazioni, ecc.;
- Manutenzioni periodiche ed utilizzo di appropriati sistemi di bonifica (iperclorazione e temperature elevate)

All'interno del biofilm: sviluppo popolazione anaerobia, ambiente anossico

	STRUTTURA	FENOMENO	CONSEGUENZA
ZONA AEROBICA		<p>Cessione di particelle di biofilm nel mezzo circostante.</p> <p>Assorbimento dei cationi bivalenti sulla superficie della matrice.</p> <p>Scambio ionico di molecole nutritive con carica negativa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diffusione in altri luoghi di pezzi di cell cluster in grado di sviluppare nuovo biofilm. ▪ Formazione di nuclei cristallini che danno origine alle incrostazioni. ▪ Arricchimento di sostanze nutritive rispetto al liquido circostante.
		<p>Cell cluster prevalentemente aerobico.</p> <p>Formazione di canali nella matrice.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento dello spessore del biofilm con occlusioni delle tubazioni. ▪ Caduta dell'efficienza di scambio termico. ▪ Insediamento di microrganismi patogeni. ▪ Blocco della diffusione e della attività delle molecole dei disinfettanti.
ZONA ANAEROBICA		<p>Cell cluster prevalentemente anaerobico.</p> <p>Formazione di celle elettrolitiche.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avviamento dei fenomeni di corrosione a carico del metallo.

BIOCORROSIONE

Batteri responsabili della corrosione:

Ferrobatteri: *Sphaerotilus*, *Crenothrix*, *Leptothrix*,
Gallionella ferruginea

Solfobatteri : *Desulfovibrio*, *Desulfatomaculum*,
Desulfosarcina, *Desulfonema*, *Desulfolubus*

Tiobacilli: *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*.

Batteri eterotrofi: *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus pumulis*, *Serratia indica*, *Pseudomonas*

RISULTATO DELLA CORROSIONE

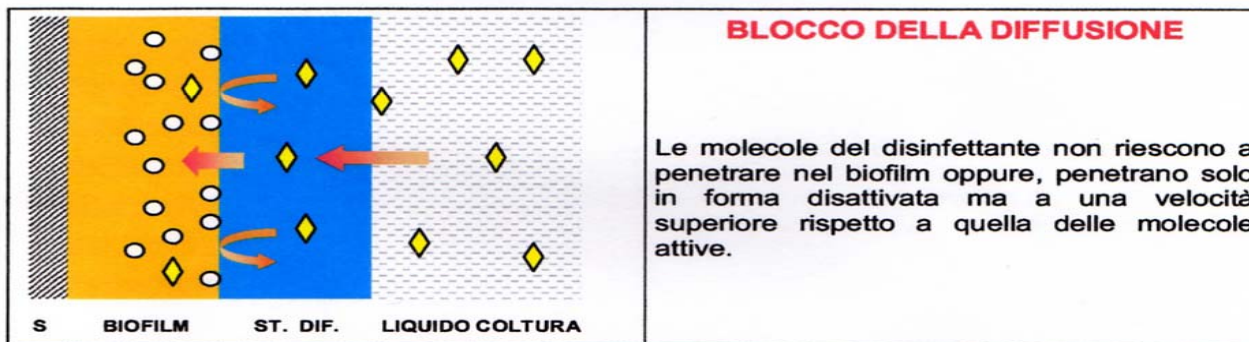
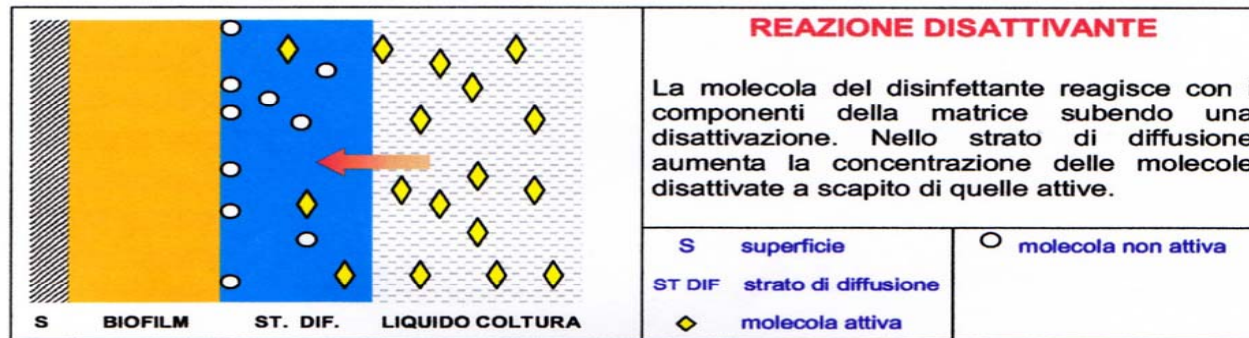
- Deterioramento delle tubature
- Variazione delle qualità organolettiche dell'acqua per la produzione di COLORAZIONI, ODORI e SAPORI SGRADREVOLI
- Variazione della qualità chimica dell'acqua dovuta al rilascio di metaboliti microbici e di metalli



Ridotta capacità della rete idraulica, con possibile occlusione del lume delle tubature

Rifiuto dell'acqua da parte dell'utenza

Capacità del biofilm di disattivare i principi attivi presenti nei disinfettanti:



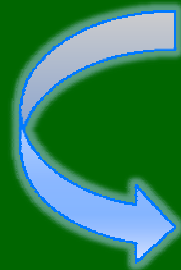
1) Riduzione della concentrazione della sostanza attiva

2) Impossibilità di penetrazione della s.a di penetrare nello spessore del biofilm

3) Maturazione di uno stato fisiologico di resistenza di almeno una frazione della popolazione

L'adesione e lo sviluppo dei biofilm dipenderà:

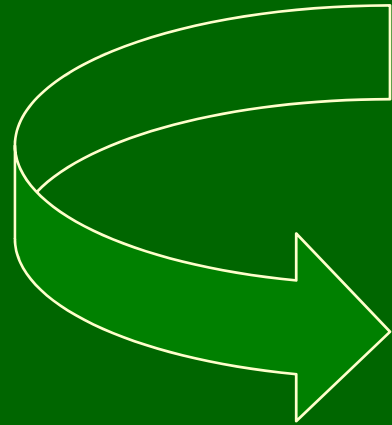
- ✓ dai livelli di BDOC dell'acqua
- ✓ dai livelli dei nutrienti
- ✓ età del biofilm
- ✓ tipo di superficie
- ✓ quantità di materiale extracellulare presente



Necessarie

concentrazioni di cloro libero più alte di quelle consentite

Clorammine



Ipoclorito

- 1) Si mantiene più a lungo come disinfettante residuo nel sistema di distribuzione.
- 2) Può penetrare più efficacemente nel biofilm quindi controllare la crescita microbica.

Disinfettanti e materiali

Cloro efficace più efficace su:
vetro e ferro galvanizzato



Rispetto al PVC

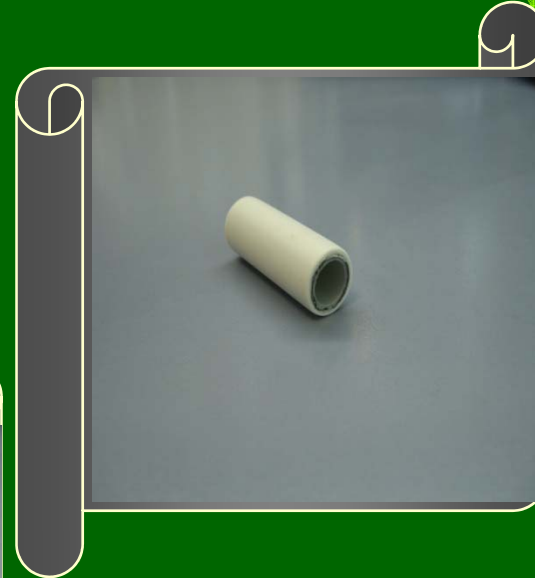
Biossido di cloro più efficace su:
PVC, acciaio e rame

OBIETTIVO DELLA RICERCA

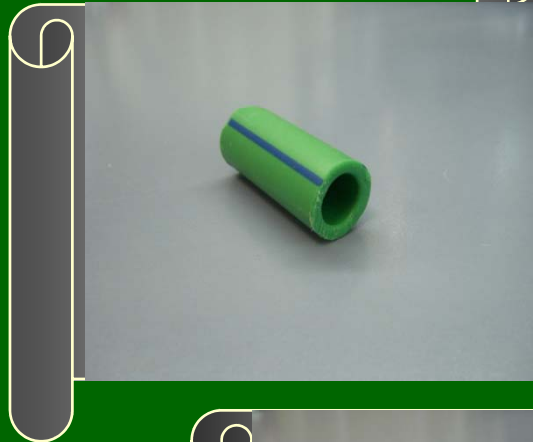
- seguire nel tempo l'evoluzione dei fenomeni di formazione di biofilm, attraverso la quantificazione di microrganismi sviluppati su materiali, a contatto con acqua, che possono essere utilizzati per la produzione di condutture per il trasporto delle acque destinate al consumo umano
- le indagini microbiologiche sui materiali sono state effettuate in ambiente statico e in ambiente dinamico al fine di simulare quello che può verificarsi nelle tubature degli impianti idrici in condizione di stagnazione e di flusso dell'acqua nei tubi

Materiali utilizzati nello studio

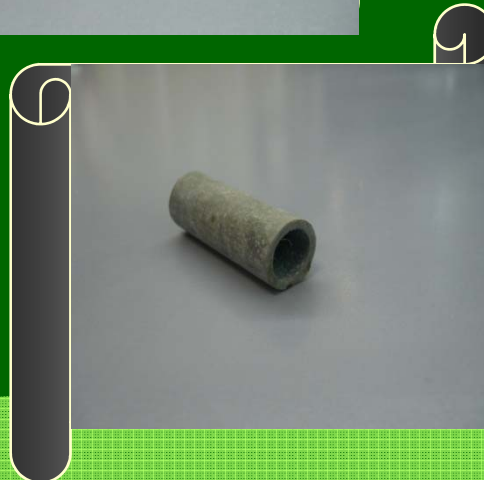
- Polietilene reticolato (PE-Xb)



- Polipropilene (PP-R)



- Acciaio zincato

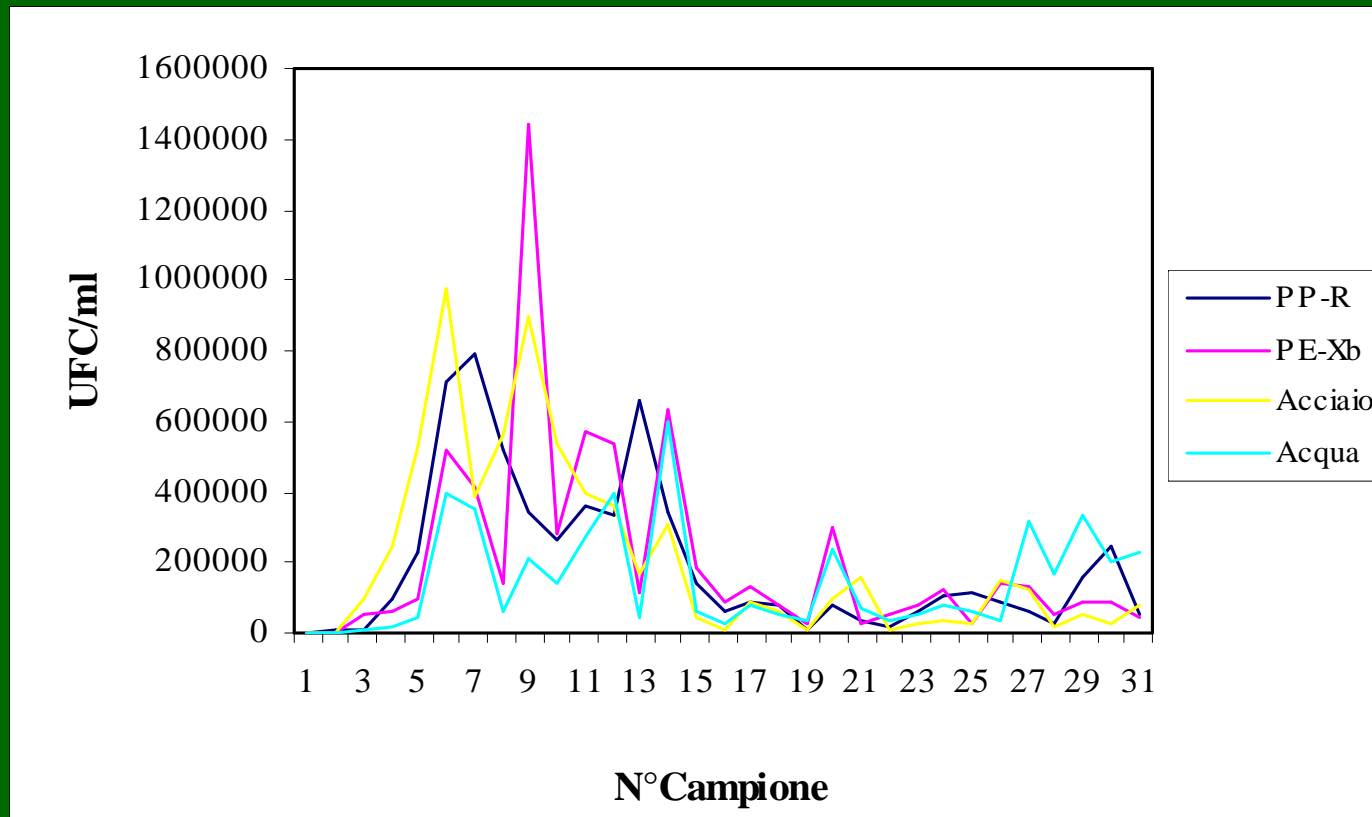


indagini microbiologiche sui materiali selezionati



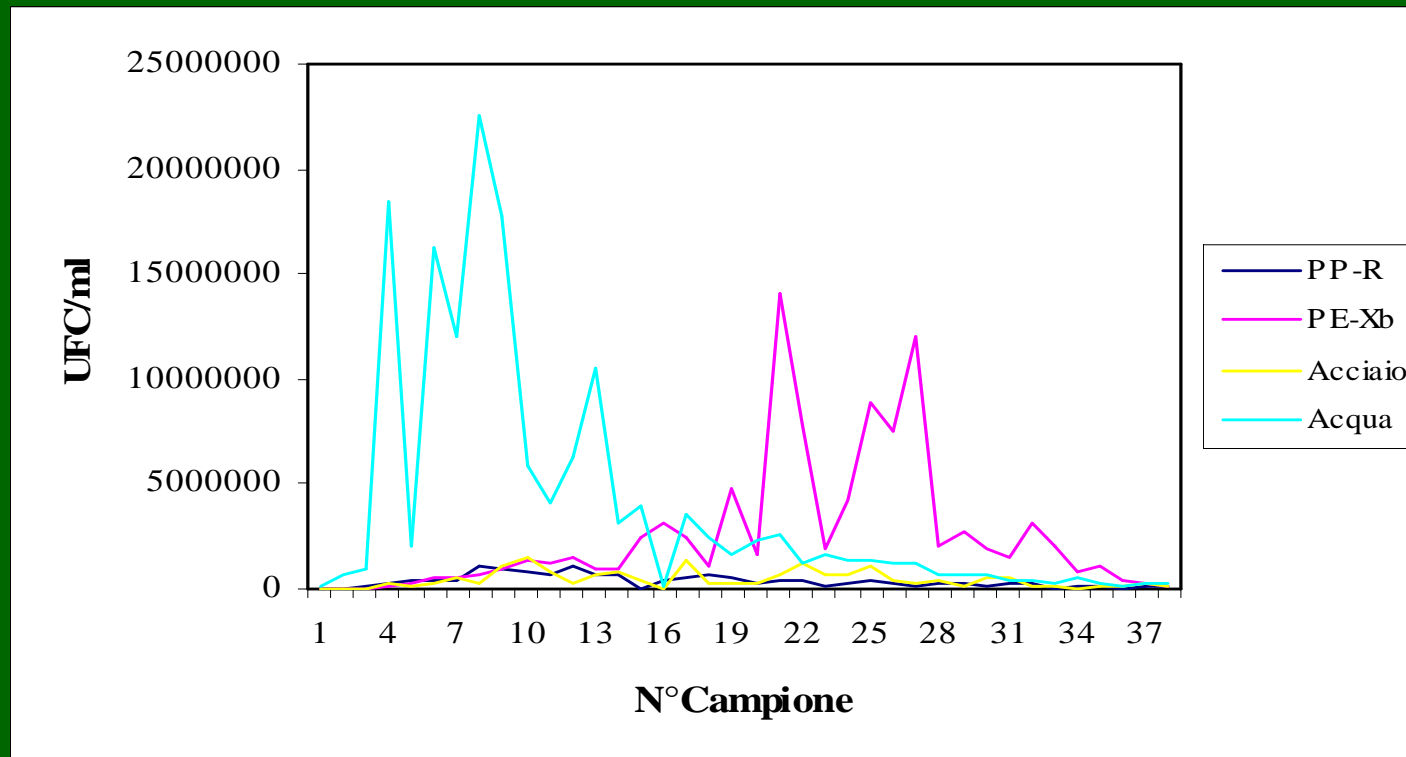
- PE-Xb, PP-R e acciaio mantenuti in condizioni di stagnazione – determinazione del parametro conteggio delle colonie a 22°C **(I prova)**
- PE-Xb, PP-R e acciaio mantenuti in condizioni di stagnazione – determinazione quantitativa delle specie *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* **(II prova)**
- PE-Xb con condizioni di flusso dell'acqua nel tubo – determinazione del parametro conteggio delle colonie a 22°C **(III prova)**

Conteggio delle colonie a 22°C in ambiente statico



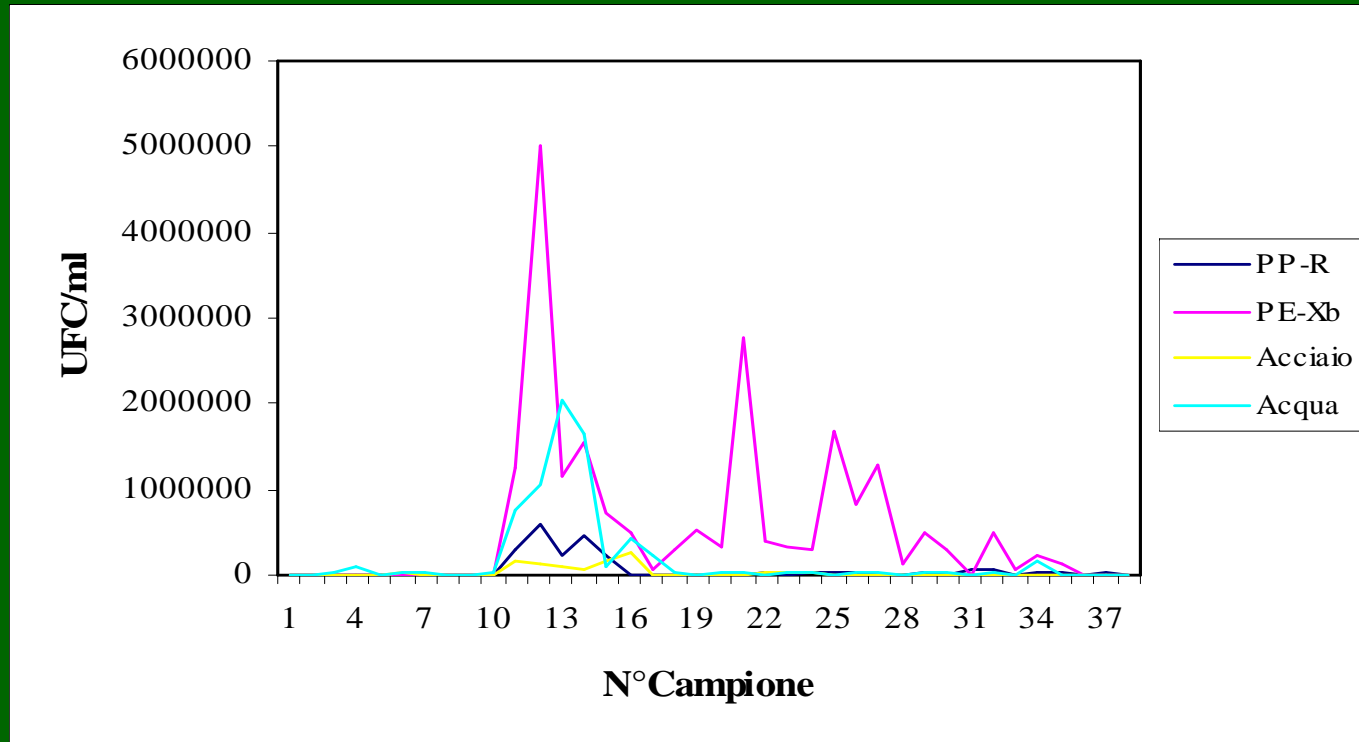
Andamento delle concentrazioni del parametro conteggio delle colonie a 22°C sui materiali selezionati e nei campioni di acqua

Isolamento di *S. maltophilia* in ambiente statico



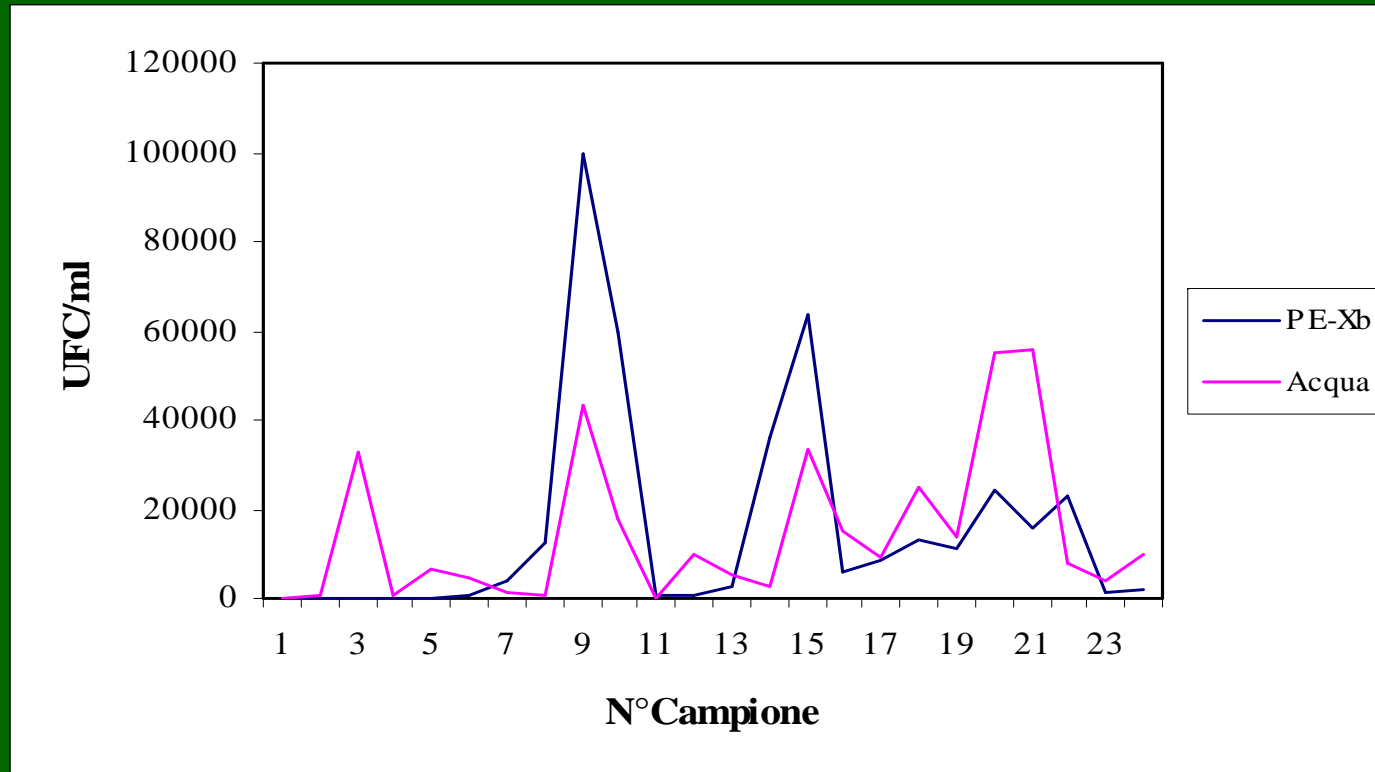
Andamento delle concentrazioni di *S. maltophilia* nei tre materiali selezionati e nei campioni di acqua

Isolamento di *P. aeruginosa* in ambiente statico



Andamento delle concentrazioni di *P. aeruginosa* sui tre materiali selezionate e nei campioni di acqua

Conteggio delle colonie a 22°C in ambiente dinamico



Andamento delle concentrazioni del parametro conteggio delle colonie a 22°C sul materiale in PE-Xb e nei campioni di acqua

Conclusioni 1

- ❑ La formazione del biofilm è un processo rapido
- ❑ E' in grado di svilupparsi su tutti i materiali testati
- ❑ Le concentrazioni microbiche rilevate nel biofilm sono più alte rispetto a quelle nell'acqua
- ❑ PE-Xb ha mostrato di sostenere in maggior misura, rispetto agli altri materiali selezionati, lo sviluppo del biofilm, caratteristica evidenziabile in base al rilevamento di concentrazioni microbiche più alte
- ❑ *S. maltophilia* si è dimostrato un colonizzatore migliore rispetto a *P. aeruginosa*

Conclusioni 2

- ❑ Condizioni di stagnazione dell'acqua hanno consentito di raggiungere concentrazioni più elevate rispetto ad acqua periodicamente fatta fluire nel tubo
- ❑ Importanza di controllare l'attività microbica nei sistemi di distribuzione dell'acqua, considerando sia l'uso di nuovi materiali (PE-Xb) che possono, rispetto ad altri, sostenere condizioni più favorevoli allo sviluppo di biofilm microbici, sia i tempi ridotti in cui si può formare il biofilm all'interno dei tubi (nel nostro caso, a partire dalla prima settimana di studio)

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: eliminazione periodica delle incrostazioni e del sedimento dai diffusori delle docce e dai rompigitto dei rubinetti

Buona abitudine : far fluire acqua dai rubinetti, per qualche minuto, prima di consumarla, non solo dopo periodi prolungati di mancato utilizzo, ma anche dopo il periodo notturno durante il quale, negli 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





Grazie per l'attenzione