

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Valutazione comparativa di procedure analitiche  
per il rilevamento di *Enterobacteriaceae*  
in acque marine costiere**

Lucia Bonadonna, Gianluca Chiaretti,  
Anna Maria Coccia e Maurizio Semproni

*Laboratorio di Igiene Ambientale*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**97/3**

Istituto Superiore di Sanità

**Valutazione comparativa di procedure analitiche per il rilevamento di *Enterobacteriaceae* in acque marine costiere.**

Lucia Bonadonna, Gianluca Chiaretti, Anna Maria Coccia e Maurizio Semproni

1997, 42 p. Rapporti ISTISAN 97/3

L'uso di procedure rapide e precise costituisce un fattore fondamentale per i controlli di valutazione della qualità delle acque. A questo scopo, in considerazione della necessità di migliorare i metodi per l'analisi microbiologica delle acque di balneazione, sono stati valutati i risultati di analisi effettuate confrontando substrati diversi per il rilevamento di coliformi totali e di *Escherichia coli*. I risultati ottenuti hanno evidenziato l'efficienza del substrato specificato nelle norme tecniche della normativa italiana relativa alle acque di balneazione, se si considerano solo le colonie rosse con riflesso verde metallico. D'altra parte, il substrato cromogeno di confronto ha fornito rese più alte, permettendo una più facile ed attendibile interpretazione dei risultati. Inoltre, questo substrato si è dimostrato più selettivo e specifico per entrambi i parametri ricercati.

*Parole chiave:* Acque marine, *Enterobacteriaceae*, Metodi microbiologici

Istituto Superiore di Sanità

**Comparative evaluation of analytical procedures for the recovery of *Enterobacteriaceae* in coastal marine waters.**

Lucia Bonadonna, Gianluca Chiaretti, Anna Maria Coccia and Maurizio Semproni

1997, 42 p. Rapporti ISTISAN 97/3 (in Italian)

The use of quick and reliable procedures is fundamental for water quality evaluation control. In order to improve the analytical methods for microbiological examination of bathing waters, a comparison of different substrates for the recovery of *Enterobacteriaceae* from coastal marine waters was carried out. The medium indicated in the Italian technical normative has shown a good selectivity when the red colonies with a green metallic surface sheen were counted, as stated in the Standard Methods. On the other hand, the chromogenic substrate used in this study resulted easy to read, selective and specific for both *Escherichia coli* and total coliforms.

*Key words:* *Enterobacteriaceae*, Marine waters, Microbiological methods

Questo lavoro è stato parzialmente svolto grazie al contributo del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST), convenzione n. 4/15 1-1 del 1° aprile 1993, Progetto esecutivo dell'ISS n. 580 "Salvaguardia del mare Adriatico".

## INDICE

IL CONTROLLO DELLE ACQUE DI BALNEAZIONE.....	1
TECNICHE DI ANALISI MICROBIOLOGICA.....	5
Tecnica della filtrazione su membrana (MF).....	5
Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN, Most Probable Number).....	6
PROBLEMATICHE RELATIVE AL RILEVAMENTO DEI COLIFORMI TOTALI E DI <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	9
MATERIALI E METODI .....	14
RISULTATI .....	16
DISCUSSIONE .....	35
CONCLUSIONI.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39

## IL CONTROLLO DELLE ACQUE DI BALNEAZIONE

Il controllo della qualità delle acque viene effettuato tramite la ricerca di microrganismi indicatori di contaminazione, storicamente utilizzati in alternativa a quella dei patogeni, agenti eziologici di malattie e responsabili dei rischi connessi con l'uso di acqua. Infatti la ricerca di microrganismi patogeni è spesso tecnicamente difficile a causa sia della sensibilità dei metodi e dei tempi di analisi, sia della necessità di prelevare e di concentrare grandi volumi di acqua. Infatti, l'agente patogeno è molto diluito nell'ambiente acquatico e le sue densità variano in base a diversi fattori, primo tra tutti il livello di endemicità delle malattie nella popolazione che diffonderà tanti più patogeni quanto più sarà numerosa.

Pertanto il rischio di contrarre malattie causate da agenti eziologici specifici (virus, batteri, protozoi, metazoi) a seguito dell'uso di un'acqua è in relazione al suo grado di fecalizzazione. Per questo motivo le analisi routinarie di controllo fanno riferimento a gruppi microbici di per sé non patogeni, ma indicatori del grado di fecalizzazione e in grado di esprimere l'esistenza o meno di una contaminazione microbica in tempi rapidi e con metodi facilmente applicabili.

Il migliore indicatore della qualità di un ambiente è quello le cui densità sono ben correlate con i rischi per la salute associati ad un dato tipo di contaminazione. Gli indicatori microbiologici sono stati quindi scelti tra quelli che, vivendo nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, entrano a far parte del ciclo di infezioni a trasmissione fecale-orale.

Un indicatore microbiologico di contaminazione, per essere definito tale, dovrebbe rispondere ad alcune caratteristiche:

- essere presente là dove è presente la fonte del patogeno;
- avere la capacità di rispondere in eguale misura, rispetto al patogeno, alle condizioni ambientali e sopravvivere almeno tanto a lungo quanto il patogeno stesso;
- essere facilmente isolabile con metodologie ripetibili, economiche e specificamente selettive.

La scelta degli indicatori è stata piuttosto controversa e solo nell'ultimo ventennio sono state stabilite normative internazionali dirette a definire parametri e standard per la verifica della qualità delle acque sulla base di sistemi integrati.

Per il controllo microbiologico i microrganismi selezionati a tale scopo sono quelli che si ritrovano nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo.

Indicatori storici di inquinamento sono i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi che fanno parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Tra questi, i coliformi totali, presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di  $10^9$  UFC/g (Tabella 1), sono batteri bastoncellari gram-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni e che si caratterizzano per la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas alla temperatura di  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  in 48 ore (APHA, 1992).

Negli anni più recenti è stata messa in dubbio la loro validità come indicatori di contaminazione. Infatti tra essi sono compresi germi ubiquitari, largamente diffusi nell'ambiente, che colonizzano acqua, aria e vegetazione. Possono sopravvivere in acque

Tabella 1. - Stima della flora batterica nelle feci umane.

Specie o gruppi	% di individui per grammo	Log densità
Batteri aerobi		
Cocchi (Gram positivi)		
Stafilococco, coagulase (-)	31-59	2-4
Stafilococco, coagulase (+)	10-93	0-0
<i>Streptococcus salivarius</i>	0-16	<1-5
<i>S. bovis</i>	0-0	<1
<i>S. equinus</i>	0-0,6	<1-4
<i>S. faecalis var. liquefaciens</i>	26	4-5
Enterococchi	74-76	5-6
Streptococchi fecali	100	5-6
Bacilli (Gram positivi)		
Corinebatteri aerobi	6-21	0-0
Micobatteri	43	0-2
Bacilli (Gram negativi)		
Coliformi totali	87-100	7-9
<i>Escherichia coli</i>	87-100	7-9
Coliformi intermedi	0-72	<1-6
<i>Enterobacter-Klebsiella</i>	0-98	<1-9
<i>K. pneumoniae</i>	26-30	6-8
Coliformi fecali	96-100	7-9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-15	3-5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,2-0,7	0-0
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0-2	0-0
<i>Proteus mirabilis</i>	5-53	6
Batteri anaerobi		
Bacilli (Gram positivi)		
<i>Lactobacillus bifidus</i>		8-9
<i>Clostridium perfringens</i>	13-35	6-7
<i>C. tetani</i>	1-35	0-0
Lactobacilli	66	7-10
<i>Actinomyces bifidus</i>	15-90	7-11
Bacilli (Gram negativi)		
<i>Bacterioides fragilis</i>	100	7-10
Spirilli		
<i>Borrellia refringens T. dentium</i>	18-28	0-0

contenenti anche basse concentrazioni di sostanza organica (Bigger, 1937) e si possono trovare associati ad insetti, alla vegetazione (Geldreich *et al.*, 1964), sui pesci (Geldreich, 1966), nel suolo e nell'acqua delle zone artiche (Boyd & Boyd, 1962).

Diversamente, il gruppo dei coliformi fecali a cui appartiene, in misura rilevante, *Escherichia coli* e che comprende anche i generi *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* ed alcuni coliformi mutanti dotati di idrolisi termostabile, è strettamente legato alla presenza di scarichi di origine fecale (Geldreich *et al.*, 1962).

Il termine "coliformi fecali" appare per la prima volta negli Stati Uniti nel 1960 con l'introduzione di un nuovo terreno di coltura (m-FC Agar) specifico per il loro rilevamento. Questo substrato ne permette lo sviluppo, con un solo passaggio alla temperatura di 44,5°C in 24 ore. Essi si ritrovano nel materiale fecale degli animali a sangue caldo in concentrazioni di  $10^4$ - $10^6$  organismi per grammo. Nell'ambiente acquatico il tempo di decadimento dei coliformi si differenzia marcatamente da quello dei patogeni non batterici: virus, miceti, cisti di protozoi ed uova di metazoi sono in grado di sopravvivere più a lungo dei coliformi. Ciò è particolarmente vero in acque salate o salmastre dove intervengono fenomeni di autodepurazione di natura fisica, chimica e biologica (antibiosi, antagonismo) o nelle acque clorate.

Il controllo delle acque di balneazione viene effettuato sulla base di indagini chimico-fisiche e microbiologiche.

Per quanto riguarda il controllo microbiologico le ricerche da effettuare si basano principalmente sul sistema di indicatori sopra individuati che, insieme agli streptococchi fecali, hanno il significato di segnalare l'avvenuto verificarsi di un evento, ad esempio una contaminazione di origine fecale.

I criteri di qualità sono stati fissati dal Consiglio delle Comunità Europee che, con la Direttiva n. 76/160 dell'8 dicembre 1975 (Direttiva del Consiglio, 8 dicembre 1975), ha definito i parametri da ricercare e fornito una indicazione sui metodi di analisi da utilizzare.

Nel 1982 la normativa italiana ha recepito la Direttiva Europea con il D.P.R. 470/82 (Decreto del Presidente della Repubblica, 8 giugno 1982, n. 470), sulla base del quale vengono attualmente effettuati i controlli di qualità delle acque di balneazione. Tra i parametri microbiologici da ricercare sono indicati anche i coliformi totali, coliformi fecali e le tecniche di analisi da utilizzare per il loro rilevamento: il metodo dei tubi multipli (MPN) e la tecnica della filtrazione su membrana (MF).

Da più parti e già da tempo sono stati tuttavia segnalati problemi relativi alla ricerca dei coliformi totali con le metodiche indicate nella normativa. In modo particolare, la tecnica della filtrazione su membrana comporta difficoltà legate all'uso del substrato indicato, l'm-Endo Agar. Il substrato costituisce infatti un punto critico nell'analisi delle acque, per problemi legati alla sua selettività, specificità ed all'interpretazione dei risultati. Spesso, il rilevamento delle colonie di coliformi su questo substrato comporta lo svolgimento, da parte degli operatori delegati al controllo, di una serie di esami aggiuntivi per la verifica e la conferma del risultato delle analisi, con aggravio dei costi ed allungamento dei tempi di risposta.

D'altra parte è da considerare che i test tradizionali utilizzati per il rilevamento dei microrganismi indicatori si basano sull'uso di substrati formulati 30-40 anni fa. E' pertanto necessario individuare procedure più rapide ed efficaci, anche alla luce delle nuove

conoscenze acquisite ed in considerazione della presenza di cellule stressate, di differenze fenotipiche e di caratteristiche intrinseche dei microrganismi isolati.

A questo scopo è stata effettuata una ricerca volta alla valutazione comparativa, anche su base statistica, per quanto riguarda sia l'aspetto qualitativo, sia quantitativo, del terreno m-Endo rispetto ad un terreno di più recente formulazione: il C-EC Agar che, oltre ad essere in grado di permettere la crescita dei coliformi totali alla temperatura di 37°C in 18-24 ore, permette anche lo sviluppo dei coliformi fecali e contemporaneamente di *Escherichia coli* alla temperatura di 44,5°C.

L'interesse per questa verifica è nato non solo dalla possibilità di una modifica e di un aggiornamento dei metodi di analisi della Normativa italiana sulle acque di balneazione in funzione della proposta di modifica della Direttiva Europea in discussione in sede di Commissione Europea, ma anche dalle indicazioni fornite durante la Seconda Conferenza Europea sull'Ambiente e la Salute tenutasi ad Helsinki nel 1994 (Second European Conference on Environment and Health, 1994). Tra le priorità della ricerca nel campo dell'inquinamento microbico delle acque è stata, in questa occasione, evidenziata l'importanza di approntare metodi di analisi più validi e di più semplice ed economico uso per la ricerca degli indicatori microbici di contaminazione delle acque.

## TECNICHE DI ANALISI MICROBIOLOGICA

L'analisi microbiologica delle acque marine prevede l'utilizzo di una serie di tecniche a conteggio diretto (MF) e a matrice statistica (MPN).

Sono riportate, di seguito, le caratteristiche ed i limiti di ciascuna tecnica ed i casi in cui il loro utilizzo è consigliato per ottenere la massima resa.

### Tecnica della filtrazione su membrana (MF)

La tecnica della filtrazione su membrana costituisce una metodologia altamente riproducibile (APHA, 1992) e può essere utilizzata per analizzare volumi di campione relativamente grandi.

Tale procedura permette di contare i microrganismi presenti in un campione di acqua che hanno formato colonie sulla superficie di una membrana posta su terreno di coltura.

Poiché non è possibile determinare se una colonia individuale sia stata formata da una o più cellule batteriche, il numero di colonie ottenuto si riporta come "Unità Formante Colonie" (UFC). Il valore ottenuto viene riferito, generalmente, a 100 mL di campione analizzato (Bonadonna & Villa, 1994) accettando che una cellula batterica produca una colonia e che la conta riporti direttamente il numero di batteri presente.

Il metodo delle membrane filtranti consente una buona precisione nel conteggio dei microrganismi presenti in un campione poiché, come detto in precedenza, si può verificare direttamente sulla membrana il numero di colonie che si sono sviluppate. E', inoltre, un test poco dispendioso e veloce da effettuare (si ha la risposta dell'analisi entro 24 ore circa).

L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. E' necessario, infatti, che tale numero sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie, sulla membrana, che sia compreso tra 20 e 80 e non superiore alle 200 (APHA, 1992) fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato. Entro questo ambito più alto è il numero delle colonie, più alta è la precisione.

Il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato si ottiene dalla seguente equazione:

$$\text{UFC}/100 \text{ mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonie contate}}{\text{mL di campione filtrati}} \times 100$$

Se l'esame è svolto in doppio, in triplo, ecc. il risultato si ottiene calcolando la media aritmetica del numero di colonie contate su ciascuna membrana e riportando il valore numerico ottenuto al volume di 100 mL. Inoltre, nel calcolo deve essere considerata l'eventuale diluizione effettuata.

La procedura standard di filtrazione prevede l'utilizzo di membrane costituite da diversi tipi di materiali. Nei laboratori di analisi sono di norma impiegate quelle di acetato

di cellulosa, misto di esteri di cellulosa e nitrato di cellulosa (Farber, 1986). In tutti i casi queste membrane possiedono pori di  $0,45 \mu\text{m}$  di diametro.

I materiali impiegati nel confezionamento delle membrane devono garantire l'assenza di sostanze chimiche che possano inibire la crescita e lo sviluppo dei batteri. Devono permettere una soddisfacente velocità di filtrazione (entro 5 minuti) e non devono avere una significativa influenza sul pH del terreno ( $\pm 0,2$  unità di pH).

Operando in condizioni di asepsi le membrane vengono poste sulla base di un supporto filtrante e ad esso viene successivamente fissato, con apposita pinza, il bicchiere (di vetro pirex, di acciaio inossidabile o di policarbonato) nel quale verrà versato il volume di campione da analizzare.

La filtrazione avviene tramite una pompa da vuoto o una pompa ad acqua mantenendo pressioni negative comprese tra i 34 e i 51 KPa.

Una volta effettuata la filtrazione le membrane vengono sollevate dal supporto della rampa filtrante mediante una pinzetta sterile ed adagiate direttamente sui terreni preventivamente preparati. E' indispensabile evitare di toccare, con la punta delle pinzette, la zona di membrana che è stata a diretto contatto con il campione e sulla quale, poi, si svilupperanno le colonie batteriche.

Questa tecnica è controindicata quando si devono analizzare campioni di acqua ad elevata torbidità. Il film dovuto alla sospensione, che si deposita sulla membrana, rende difficoltosa e non precisa la lettura dei risultati. Inoltre è facile che, quando la torbidità del campione è elevata si abbia un intasamento dei pori della membrana che rende impossibile la filtrazione.

Per acque reflue, sedimenti e fanghi è quindi consigliata la tecnica dei tubi multipli (MPN).

### Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN, Most Probable Number)

La tecnica dei tubi multipli è un metodo fondato sulla elaborazione statistica di dati positivi e negativi ricavati da più semine in opportuni terreni colturali liquidi.

Il risultato finale può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dalla Tabella 2 i cui valori si basano sulla formula di Thomas (APHA, 1992):

$$\text{MPN}/100 \text{ mL} = \frac{P \times 100}{\sqrt{NT}}$$

dove P rappresenta il numero di tubi positivi, N il volume del campione nei tubi negativi e T il volume totale del campione misurato in tutti i tubi.

La tecnica dell'MPN è da preferire quando il campione ha un elevato contenuto in sospensioni solide. Tuttavia presenta alcuni limiti: la risposta dell'analisi richiede tempo (dalle 48 alle 96 ore), è costosa e laboriosa in quanto necessita di una elevata quantità di materiale da laboratorio e soprattutto manca di precisione nei risultati poiché è un metodo statistico (Bonadonna & Villa, 1994). La precisione aumenta all'aumentare del numero dei tubi inoculati. Confronti analitici effettuati in ambito europeo hanno confermato la

**Tabella 2.** - *Indice MPN e limite fiduciario al 95% per varie combinazioni dei risultati positivi, quando i tubi vengono inoculati con diluizioni di 10 mL, 1,0 mL, 0,1 mL.*

Combinazioni positive	Diluizione nei tubi		
	3		
	MPN index /100 mL	Limite di fiducia al 95%	
Limite inferiore		Limite superiore	
0-0-0	<3		
0-0-1	3	<0,5	9
0-1-0	3	<0,5	13
0-2-0	0		
1-0-0	4	<0,5	20
1-0-1	7	1	21
1-1-0	7	1	23
1-1-1	11	3	36
1-2-0	11	3	36
2-0-0	9	1	36
2-0-1	14	3	37
2-1-0	15	3	44
2-1-1	20	7	89
2-2-0	21	4	47
2-2-1	28	10	150
2-3-0	0		
3-0-0	23	4	120
3-0-1	39	7	130
3-0-2	64	15	380
3-1-0	43	7	210
3-1-1	75	14	230
3-1-2	120	30	380
3-2-0	93	15	380
3-2-1	150	30	440
3-2-2	210	35	470
3-3-0	240	36	1300
3-3-1	460	71	2400
3-3-2	1100	150	4800
3-3-3	> 2400		

mancanza di precisione dei risultati delle analisi svolte con 3 o 5 tubi (BCR Information, 1995).

Per l'analisi di campioni di acqua per la ricerca dei coliformi totali, i campioni da analizzare possono venire inoculati in tre serie di 5 provettoni contenenti, con le campanelle di Durham, il terreno Brodo lattosato.

Effettuato l'inoculo, i provettoni si pongono ad incubare a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  per 24+24 ore. Al termine delle prime  $24 \pm 2$  ore essi si esaminano per verificare la presenza di gas. In assenza di questo si reincubano per ulteriori 24 ore.

La presenza di gas costituisce una reazione positiva presuntiva. Si annotano i risultati ottenuti indicando il numero dei positivi e dei negativi.

Gli inoculi risultati positivi si sottopongono ad una prova di conferma. Tale prova consiste nell'inoculare, sterilmente, un'ansata ovvero 0,1 mL di brodocoltura da un tubo positivo ad uno corrispondente contenente, con le campanelle di Durham, il terreno Brodo lattosato bile verde brillante. I tubi si incubano a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  per  $48 \pm 3$  ore.

Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi totali. Si annotano i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tabella 2, si calcola il valore dell'indice MPN per 100 mL di campione.

## PROBLEMATICHE RELATIVE AL RILEVAMENTO DEI COLIFORMI TOTALI E DI *ESCHERICHIA COLI*

Nell'ambito della tutela della salute in relazione alla qualità dell'ambiente, è importante avere strumenti efficaci per la determinazione ed il conteggio dei microrganismi nell'ambiente. Molti sforzi, in questo senso, vengono fatti per lo sviluppo, la messa a punto e la standardizzazione delle tecniche utilizzate nei laboratori di analisi per ottenere risultati affidabili, ripetibili ed accurati.

In tempi brevi esiste la possibilità di una modifica della normativa italiana sulle acque di balneazione (D.P.R. 470/82) in relazione alla proposta di Direttiva Europea in discussione già da due anni in sede di Commissione dell'Unione Europea.

In essa si prevede, oltre alla eliminazione di alcuni parametri e all'aggiunta di altri, anche l'aggiornamento ed il miglioramento delle tecniche di analisi.

In questo ambito la nostra ricerca si è orientata alla valutazione comparativa tra il substrato utilizzato attualmente per la ricerca dei coliformi totali, secondo la normativa italiana, ed uno alternativo che permette di ottenere risultati sia per i coliformi sia per *Escherichia coli*.

I terreni di coltura per il rilevamento dei coliformi totali, tutt'ora riportati anche negli Standard Methods (APHA, 1992), si basano sulla possibilità che questi organismi hanno di fermentare il lattosio alla temperatura di  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Tuttavia, soprattutto il terreno da utilizzarsi con la tecnica delle membrane filtranti (m-Endo) è spesso risultato poco idoneo al rilevamento dei coliformi totali che dovrebbero, su di esso, essere riconosciuti come colonie rosse con riflesso verde-metallico. E' stato più volte osservato che anche colonie cosiddette atipiche (rosse o rosa) possono essere formate da coliformi e può risultare difficile l'individuazione di quelle tipiche con sfumature metalliche. Inoltre, a complicare la lettura dei risultati, è stato segnalato che anche microrganismi diversi da quelli ricercati possono formare colonie tipiche rosse con riflesso verde-metallico e che m-Endo, contenente desossicolato e lauril solfato, è in grado di inibire la crescita anche del 70% dei coliformi danneggiati (Bonadonna & Villa, 1993).

D'altra parte *Escherichia coli*, indicatore primario di contaminazione fecale, appartenente anch'esso alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* e rilevabile con le metodologie utilizzate per la ricerca dei coliformi fecali, non è inserito tra i parametri di legge per il controllo della qualità delle acque di balneazione. Tuttavia, nell'ambito della proposta di Direttiva elaborata dalla Commissione Europea, *Escherichia coli* è stato invece proposto tra i parametri da ricercare per il controllo delle acque di balneazione.

La sua ricerca, attualmente, non viene svolta di routine nel controllo della qualità igienico-sanitaria delle acque; inoltre le più comuni metodologie di analisi richiedono tempi lunghi (da 96 ore a 5 giorni), prove di conferma e di identificazione. Infatti i substrati da utilizzare per la sua ricerca non sono specificatamente indicati per la sua selezione, bensì sono stati formulati per il rilevamento di tutto il gruppo a cui *Escherichia coli* appartiene: i coliformi fecali.

Da alcuni anni, per la ricerca dei coliformi totali e di *Escherichia coli*, è stata posta grande enfasi nella formulazione di una nuova serie di substrati, le cui caratteristiche sono una elevata specificità ed una notevole rapidità di risposta. La selezione e la crescita dei microrganismi sui nuovi substrati non si verifica più solo sulla base della fermentazione del lattosio, bensì sulla loro capacità di svolgere specifiche attività enzimatiche.

L'utilizzazione di certe attività enzimatiche specifiche, tra i microrganismi indicatori, può rappresentare una alternativa interessante in rapporto alle tecniche colturali classiche.

I primi ricercatori che hanno segnalato la possibilità di sfruttare attività enzimatiche specifiche per la crescita dei microrganismi furono Buehler e collaboratori (Buehler *et al.*, 1951) che evidenziarono l'esistenza dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi in *Escherichia coli*. L'attività dell'enzima fu evidenziata con l'utilizzo dell'umbelliferone (7-idrossicumarina) che, con i suoi composti coniugati, sembra essere un metabolita delle cumarine nei conigli (Mead *et al.*, 1955).

Tuttavia fu solo verso la fine degli anni '70 che Kilian e Bulow dimostrarono la specificità della  $\beta$ -glucuronidasi per *Escherichia coli* (Kilian & Bulow, 1976 e 1979).

In natura, questo enzima viene utilizzato dai batteri per la decomposizione delle sostanze intercellulari del tessuto connettivo dell'ospite nel quale albergano.

Numerosi studi svolti negli anni '80 hanno confermato che l'enzima  $\beta$ -glucuronidasi è presente in *Escherichia coli* con una media superiore al 90% (Feng & Hartman, 1982; Edberg & Trepeta, 1983; Hansen & Yourassowsky, 1984; Perez & Berrocal, 1986; Restaino *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1990; Kampfer *et al.*, 1991; Manafi & Rotter, 1991; Sahran & Foster, 1991). Nella Tabella 3 sono riassunti i valori esatti della presenza dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi in *Escherichia coli* secondo gli autori sopra citati.

**Tabella 3.** - Presenza dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi in *Escherichia coli*, secondo i diversi autori.

Autori	Percentuale
Feng & Hartman, 1982	96,00%
Edberg & Trepeta, 1983	94,00%
Hansen & Yourassowsky, 1984	94,43%
Perez <i>et al.</i> , 1986	95,50%
Restaino <i>et al.</i> , 1990	95,00%
Rice <i>et al.</i> , 1990	95,5%-99,5%
Manafi & Rotter, 1991	98,00%
Sahran & Foster, 1991	>96,00%

Risultati contrastanti sono stati presentati da Chang secondo cui solo il 34% di *Escherichia coli* risulta essere  $\beta$ -glucuronidasi-positivo (Chang *et al.*, 1989).

La maggior parte degli studi, comunque, sembra dimostrare che solo una piccola percentuale di *Escherichia coli* è fenotipicamente  $\beta$ -glucuronidasi-negativa. Anche gli *E. coli* patogeni, sierotipo O157:H7, appartengono a questa categoria (Doyle & Schoeni, 1984). Inoltre tutti gli organismi appartenenti al genere *Escherichia*, a parte *E. coli*, sono fenotipicamente  $\beta$ -glucuronidasi-negativi (Kampfer *et al.*, 1991; Rice *et al.*, 1991), con l'eccezione di *E. vernalis* (Holt *et al.*, 1989; Cleuziat & Robert-Baudoy, 1990), che si è dimostrato essere  $\beta$ -glucuronidasi-positivo.

In percentuale relativamente bassa l'enzima  $\beta$ -glucuronidasi è anche presente in altri organismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Si ritrova, infatti, nel 40-67% di *Shigella* (Kilian & Bulow, 1979; Feng & Hartman, 1982; Cleuziat & Robert-Budoy, 1990), nel 17-29% di *Salmonella* spp. (LeMinor, 1979; Feng & Hartman, 1982), in una piccola percentuale di *Yersinia* (Petzel & Hartman, 1985; Kampfer *et al.*, 1991; Manafi & Rotter, 1991) e soltanto occasionalmente in *Enterobacter*, *Edwardsia* ed *Hafnia* spp. (Perez *et al.*, 1986; Sharpe *et al.*, 1989; Kampfer *et al.*, 1991; Manafi & Rotter, 1991).

Altri batteri Gram-negativi che producono l'enzima  $\beta$ -glucuronidasi si trovano tra i flavobatteri (Petzel & Hartman, 1985) e tra *Bacterioides* (Dahlen & Linde, 1973).

Con i terreni di coltura più classici, come pure con i substrati di più recente formulazione, è possibile mettere in evidenza la presenza dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi nei batteri, incorporando  $\beta$ -glucuronidi e  $\beta$ -galatturonidi cromogeni e fluorogeni che, idrolizzati dall'attività enzimatica, rilasciano dei fattori colorati o fluorescenti facilmente rilevabili.

In particolare per l'evidenziazione dei coliformi e di *Escherichia coli*, quattro sono le sostanze più comunemente incluse nella composizione dei substrati che sfruttano l'attività glucuronidasica e le loro caratteristiche sono riassunte nella Tabella 4.

La fenolfaleina- $\beta$ -D-glucuronide (PHEG), è stata per prima utilizzata nella determinazione della  $\beta$ -glucuronidasi in *E. coli* (Buehler, 1951). Essa non veniva aggiunta direttamente tra i componenti del terreno di coltura, ma utilizzata come test di verifica nel brodo colturale, poiché vira al giallo in presenza di  $\beta$ -glucuronidasi.

Analogamente il p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucuronide (PNPG) rilascia, dopo idrolisi da parte della  $\beta$ -glucuronidasi, il p-nitrofenolo che è di colore giallo e può essere usato sia in mezzi colturali liquidi sia agarizzati (Kilian & Bulow, 1976 e 1979).

Il 5-Br-4-Cl-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-GLUC) dopo idrolisi da parte dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi rilascia indolo, che viene rapidamente ossidato dando un composto insolubile di colore blu (Ley *et al.*, 1988). Pertanto, tra gli enterobatteri, i coliformi che possiedono l'enzima  $\beta$ -galattosidasi, idrolizzano il composto crescendo sul substrato come colonie verdi-blu.

Tra i più sensibili composti atti a rilevare la presenza della  $\beta$ -glucuronidasi viene utilizzato il 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG). Questa molecola, derivata dalle cumarine, viene idrolizzata dall'enzima  $\beta$ -glucuronidasi e la sostanza rilasciata è il 4-metilumbelliferone, di colore blu-verde e fluorescente ai raggi ultravioletti (lunghezza d'onda pari a 366 nm) (Farber, 1986; Rippey, 1987). Per ottenere una buona resa nella fluorescenza, i valori di pH del terreno devono essere neutri o leggermente alcalini

**Tabella 4.** - *Substrati utilizzati per la determinazione della  $\beta$ -D-glucuronidasi.*

Substrati	Prodotti di idrolisi	Colori	pH Ottimale	Terreni utilizzati		
				MPN	Agar	Diffusione in agar
PHEG	Fenolftaleina	Rosso	Alcalino	NA	NA	NA
PNPG	p-Nitrofenolo	Giallo	7,6-8,5>10	Si	Si	Pos.
X-GLUC	Indolo-Indigo	Blu	Alcalino	No	Si	Neg.
IBDG	Indolo-Indigo	Blu	Alcalino	No	Si	Neg.
MUG	4-Metilumbelliferone	Blu fluorescente	10,3	Si	Si	Pos.

NA = La sostanza non può essere aggiunta direttamente al terreno

PHEG = Fenolftaleina-beta-D-glucuronide

PNPG = p-Nitrofenol-beta-D-glucuronide

X-GLUC = 5-Br-4-Cl-3-indolil-beta-D-glucuronide

IBDG = Indoxil-beta-D-glucuronide

MUG = 4-Metilumbelliferil-beta-D-glucuronide

(Freier, 1987). In associazione con l'o-nitrophenil- $\beta$ -D-galattopiranoside (ONPG) fa parte dei composti di un substrato recentemente approvato dalla U.S. Environmental Protection Agency (EPA) per l'enumerazione dei coliformi nelle acque (Federal Register, 1989). Il MUG può essere utilizzato sia in terreni liquidi sia in terreni agarizzati (Feng & Hartman, 1982) e le concentrazioni ottimali di MUG proposte per i diversi tipi di terreni sono riassunte nella Tabella 5.

Il MUG può essere inserito direttamente nel terreno di coltura durante la sua preparazione e può essere sterilizzato in autoclave (Rippey, 1987) poichè rimane stabile alla temperatura di 121°C e alla pressione di 15 psi per 15 minuti. In aggiunta, non varia la selettività del terreno o la capacità di fermentazione del lattosio (Trepeta, 1984) che è una delle caratteristiche fondamentali dei coliformi.

I dati che derivano dall'utilizzo del MUG nei tests microbiologici sono il risultato di una appropriata combinazione di temperatura di incubazione, agenti selettivi e substrati che conferiscono al terreno la sua particolare selettività (Sahran & Foster, 1991). L'alterazione di uno di questi fattori riduce la selettività del terreno permettendo, in questo modo, lo sviluppo di microrganismi interferenti.

Le temperature di incubazione, per la migliore resa nella ricerca di *Escherichia coli* variano tra i 37 e i 44,5°C. Temperature elevate (44,5°C) sono necessarie perchè costituiscono un fattore selettivo impedendo lo sviluppo di flora batterica concorrente. E' il caso, per esempio di *Pseudomonas* spp. che può interferire nella corretta lettura del test (Rippey, 1987), poichè sottoposto ai raggi UV presenta una fluorescenza naturale.

**Tabella 5.** - Concentrazioni del MUG per diversi tipi di terreni.

Terreni	Concentrazioni MUG (mg/mL)	Riferimenti bibliografici
Brodo lattosato bile verde brillante	50	Glaeser & Hangst, 1986
E. coli broth	50	Rippey, 1987
Brodo lauril solfato	50	Massenti, 1981
	100	Feng & Hartman, 1982
MacConkey agar	150	Trepeta & Hedberg, 1984
Violet red bile agar	200	Feng & Hartman, 1982

## MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati campioni di acqua di mare prelevati in due località differenti. Una serie di prelievi è stata effettuata con cadenza mensile lungo le coste del Mare Adriatico (Marche), l'altra, lungo le coste tirreniche (Lazio).

Tutte le operazioni di prelievo e di trasporto dei campioni sono state svolte seguendo le specifiche norme tecniche.

I campioni di acqua sono stati trasportati in laboratorio in contenitori refrigerati e analizzati entro le 24 ore dal prelievo.

I campioni prelevati lungo la costa adriatica sono stati analizzati ricercando, quali indicatori di contaminazione fecale delle acque marine, i coliformi totali, utilizzando per una valutazione quali- e quantitativa due terreni colturali, l'm-Endo, indicato nella normativa italiana e il substrato cromogeno C-EC Agar. Inoltre sono state evidenziate con questo stesso terreno anche le colonie di *Escherichia coli*.

I campioni prelevati lungo la costa tirrenica sono stati esaminati ricercando, con la metodica alternativa che utilizza il substrato cromogeno, *Escherichia coli*, indicatore primario di contaminazione fecale.

Il parametro coliformi totali, indicato nella normativa italiana (D.P.R. n. 470/82) con il valore limite di 2000 coliformi totali /100 mL, viene utilizzato, insieme ai coliformi fecali e agli streptococchi fecali, per la definizione della qualità delle acque di balneazione.

L'analisi è stata eseguita utilizzando il metodo della filtrazione su membrana e impiegando terreni agarizzati, uno dei quali (m-Endo) è quello stabilito e specificato per i controlli di legge sulle acque di balneazione.

**Procedura.** Volumi diversi di campione sono stati filtrati attraverso una membrana di nitrato di cellulosa (Millipore) con pori di 0,45  $\mu\text{m}$  di diametro.

Il protocollo di ricerca ha previsto l'utilizzo di due tipi di terreni specifici per la ricerca dei coliformi: m-Endo Agar LES (Difco) e C-EC Agar (Biolife).

Le membrane poste sui terreni colturali sono state mantenute in termostato alla temperatura idonea per la ricerca dei coliformi totali per un periodo di incubazione di 24 ore.

Al termine dell'incubazione sono state contate le colonie tipiche di coliformi totali sul terreno m-Endo (rosse con riflessi verde-metallico) e le colonie atipiche (rosse).

Sul terreno C-EC-Agar sono state contate le colonie di colore blu-verde

Tra le colonie cresciute su C-EC è possibile distinguere tra i coliformi, *E. coli*, che produce colonie blu-verdi fluorescenti se esposte ad una luce di lunghezza d'onda pari a 366 nm. Le colonie di *E. coli* appaiono fluorescenti, su questo substrato, per la produzione del 4-metilumbelliferone.

Colonie tipiche (rosse con riflessi verde-metallico) e atipiche (rosse e rosa) sul substrato m-Endo, secondo la definizione fornita dagli Standard Methods (APHA, 1992), nonché blu-verdi e blu-verdi fluorescenti sul substrato C-EC sono state, quindi, isolate per procedere alle prove di conferma e di identificazione.

L'isolamento è stato effettuato su Tryptic Soy Agar, terreno non selettivo, adatto alla crescita di tutti i microrganismi.

Alcune colonie del terreno C-EC-Agar, che all'osservazione apparivano blu-verdi fluorescenti, sono state isolate sul terreno Tryptic Soy Agar addizionato con 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) per confermare la presenza della fluorescenza.

Tutte le colonie isolate sono state sottoposte alla colorazione di Gram. La tecnica di colorazione ricalca le normali procedure standard (APHA, 1992).

Per discriminare ulteriormente i microrganismi isolati è stata utilizzata la prova della citocromossidasi. La risposta alla reazione, ottenibile entro un minuto è data dalla eventuale comparsa di colore viola nel caso di positività del test. Viceversa la reazione negativa è data dalla mancanza di sviluppo di colore. I coliformi sono ossidasi negativi.

Si è, poi, proceduto alla identificazione a livello di specie degli organismi isolati.

L'identificazione dei microrganismi selezionati è stata effettuata con il sistema biochimico automatico Auto Microbic System associato alle Card GNI che permette di effettuare l'identificazione di un ceppo batterico sulla base di 30 reazioni biochimiche miniaturizzate (Bondi, 1992).

L'inoculo e l'identificazione vengono svolti in maniera automatica dallo strumento, con il vantaggio di eliminare così gli errori di manualità e di lettura, tipici degli schemi tradizionali. Per ottenere la risposta di identificazione, il completamento delle reazioni biochimiche deve verificarsi tra un minimo di 4 ed un massimo di 18 ore.

L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata effettuata utilizzando il test di Student (t-test) per il confronto fra le medie del numero di colonie batteriche cresciute su ogni piastra per ciascun terreno. L'eventuale differenza tra le rese dei due terreni è stata calcolata tramite il test  $\chi^2$  con la correzione di Yates per campioni con un solo grado di libertà. Infine la possibile correlazione tra i risultati dati dai due terreni è stata calcolata mediante il coefficiente di Pearson (Fowler & Cohen, 1993).

## RISULTATI

I risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche dei campioni di acque marine prelevati lungo le coste del Mare Adriatico sono riassunti in Tabella 6 dove è riportato il numero delle colonie di coliformi totali contate su ciascuno dei due substrati utilizzati.

In Tabella 7 è riportato il numero di colonie di coliformi totali riferito a 100 mL per ciascun campione esaminato. Il conteggio delle colonie cresciute su ciascun substrato è stato effettuato sulla base delle caratteristiche morfologiche delle colonie tipiche per ciascuno dei due terreni colturali utilizzati: colonie rosse con riflesso verde-metallico sul substrato m-Endo e colonie verdi-blu sul substrato C-EC.

I risultati hanno evidenziato che il substrato C-EC ha fornito rese più alte, pari al 33% in più, rispetto al substrato m-Endo limitatamente al solo conteggio delle colonie tipiche cresciute sui due terreni. Tuttavia il calcolo del T-test ( $t = 0,46$  con 38 gradi di libertà) ha evidenziato che le medie non sono statisticamente differenti e d'altra parte, utilizzando il coefficiente di Pearson (0,97 con 18 gradi di libertà) è stato calcolato che la correlazione è significativamente differente da zero (Figura 1).

Dal totale delle colonie cresciute su ciascun substrato sono state isolate le colonie per procedere alle prove biochimiche di conferma e di identificazione.

In Tabella 8 è riportato il numero di colonie isolate, per ciascun prelievo, distinguendole in base alla loro morfologia sui due terreni colturali utilizzati e considerando, quindi, le colonie tipiche (rosse con riflesso metallico) ed atipiche (rosse rosa) sul substrato m-Endo e le colonie verdi-blu (coliformi totali) e verdi-blu fluorescenti (*Escherichia coli*) sul substrato C-EC.

La selezione delle colonie isolate, effettuata tramite la colorazione di Gram ha permesso di verificare che il 100% delle colonie isolate erano bastoncini gram-negativi. Pertanto tutte le colonie sono state saggiate con il test della citocromossidasi.

Per le colonie selezionate su terreno m-Endo, la prova della citocromossidasi ha fornito i seguenti risultati: 65 colonie con riflesso metallico erano per il 100% ossidasi-negative; su 66 colonie rosse-rosa 21 (il 32%) erano ossidasi negative mentre il 68% era ossidasi positivo, risultato che esclude, quindi, 45 delle colonie isolate dal gruppo delle *Enterobacteriaceae* a cui appartengono i coliformi.

Analogamente, la reazione della citocromossidasi, effettuata sulle colonie selezionate ed isolate dal substrato C-EC, ha evidenziato che le colonie verdi-blu e le verdi-blu fluorescenti erano tutte ossidasi-negative.

Si è comunque proceduto, per tutte le colonie isolate, alle prove di identificazione tramite reazione biochimiche per la verifica della appartenenza alla specie.

In Tabella 9 sono riportate le specie identificate delle 65 colonie tipiche (rosse con riflesso verde-metallico) isolate dal substrato m-Endo.

Tutte le specie identificate, tranne una: *Pseudomonas cepacea*, appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Nella Tabella 10 è riportato il numero percentuale sul numero totale delle colonie esaminate. Tra le colonie identificate risulta isolata in percentuale più elevata la specie *Escherichia coli* (43,08%) che, con le altre specie appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

**Tabella 6.** - Numero di colonie tipiche di coliformi totali contate sui due terreni colturali utilizzati. Il numero è relativo a ciascuno dei campioni effettuati.

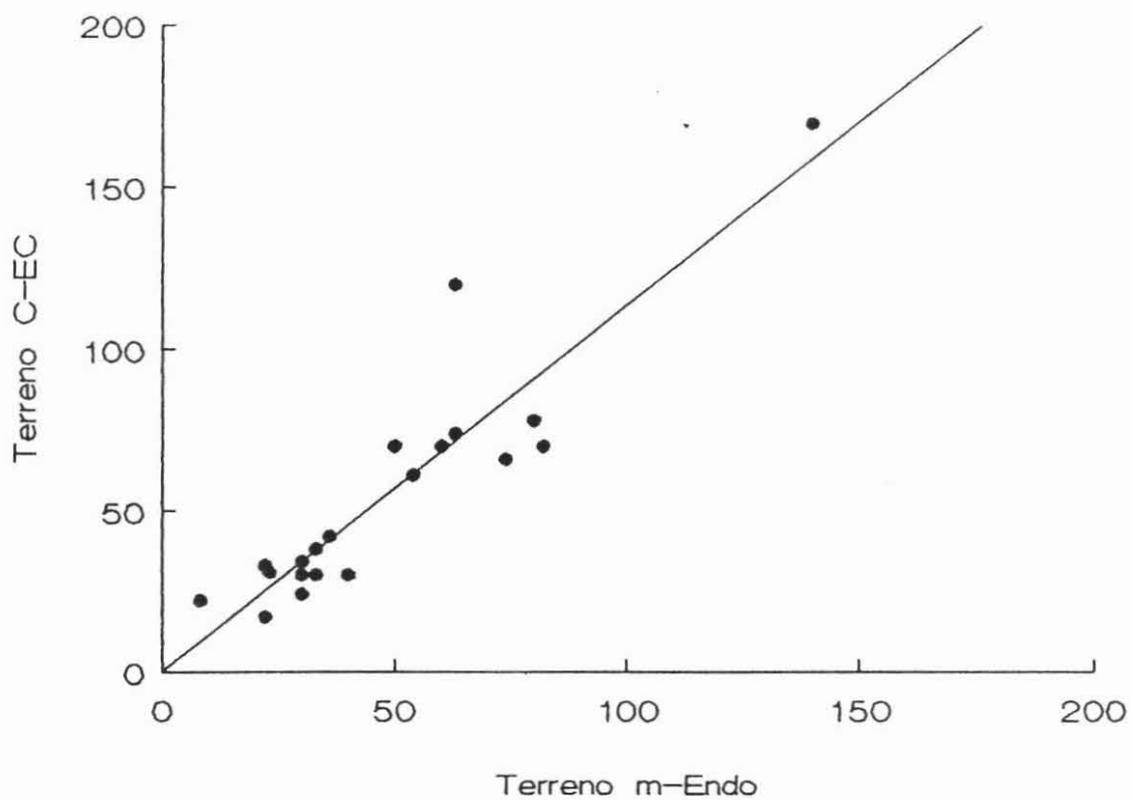
n° Prelievo	Numero di coliformi totali	
	Terreno m-Endo colonie rosso-met.	Terreno C-EC colonie verdi-blu
1	22	17
2	8	22
3	74	66
4	80	78
5	33	38
6	60	70
7	140	170
8	30	24
9	50	70
10	40	30
11	63	120
12	30	30
13	82	70
14	30	34
15	63	74
16	36	42
17	22	33
18	33	30
19	54	61
20	23	31

**Tabella 7.** - Risultati delle analisi microbiologiche, svolte per la ricerca dei coliformi totali ed effettuate su 20 campioni di acqua di mare prelevati lungo la costa adriatica, utilizzando due terreni di isolamento. Il numero è riferito a 100 mL di campione.

n° Prelievo	Coliformi totali UFC/100 mL	
	Substrato m-Endo	Substrato C-EC
1	22	17
2	8	22
3	74	66
4	80	78
5	3300	3800
6	600	700
7	14500	17200
8	300	240
9	5000	7000
10	40	30
11	6300	12000
12	30	30
13	820	700
14	300	340
15	630	740
16	360	420
17	220	330
18	330	300
19	540	610
20	2300	3100
Tot. n° colonie	35754	47723
Media	1787,7	2386,1
Mediana	345	380
Deviazione st.	34747	4596,8

UFC = Unità Formante Colonia

Deviazione st. = Deviazione standard



**Figura 1.** - Grafico del coefficiente di correlazione calcolato sul numero delle colonie contate sul substrato C-EC Agar rispetto al substrato m-Endo Agar.

**Tabella 8.** - Numero di colonie di coliformi totali e di *Escherichia coli* isolate dai due terreni colturali m-Endo Agar e C-EC Agar. Il numero di colonie isolate è riferito a ogni prelievo effettuato.

n° Prelievo	Substrato m-Endo Agar		Substrato C-EC Agar	
	Numero colonie isolate			
	Rosse-met.	Rosse-rosa	Verdi-blu	Verdi-blu fluo.
1	2	2	1	1
2	1	1	2	2
3	4	4	4	4
4	4	4	4	4
5	5	5	4	4
6	2	2	2	2
7	6	6	4	4
8	1	1	2	2
9	4	4	4	5
10	2	2	2	0
11	3	3	5	5
12	0	1	1	1
13	5	5	3	3
14	6	6	4	4
15	4	4	5	5
16	3	3	2	2
17	1	1	3	3
18	2	2	1	1
19	6	6	4	4
20	4	4	4	5
Tot.	65	66	61	61

Rosse-met- = Rosse con riflesso verde-metallico

Verdi-blu fluo. = Verdi-blu fluorescenti

**Tabella 9.** - Risultati delle prove di identificazione biochimica delle colonie rosse con riflesso verde-metallico isolate dal terreno m-Endo Agar

Numero prelievo	Numero colonie identificate	Specie
1	2	<i>Escherichia coli</i>
2	1	<i>Escherichia coli</i>
3	3	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Enterobacter aerogenes</i>
4	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
5	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	1	<i>Hafnia alvei</i>
6	2	<i>Escherichia coli</i>
7	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>
	1	<i>Escherichia hermannii</i>
	1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
8	1	<i>Escherichia coli</i>
9	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	1	<i>Hafnia alvei</i>
	1	<i>Morganella morganii</i>
10	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
11	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Enterobacter aerogenes</i>
12	0	
13	1	<i>Hafnia alvei</i>
	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

(Continua)

Tabella 9. - (Segue).

Numero prelievo	Numero colonie isolate	Specie
14	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Enterobacter sakazakii</i>
	1	<i>Citrobacter diversus</i>
	1	<i>Escherichia hermanii</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
15	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	1	<i>Hafnia alvei</i>
	1	<i>Serratia marcescens</i>
16	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Enterobacter aerogenes</i>
17	1	<i>Escherichia coli</i>
18	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
19	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Citrobacter diversus</i>
	1	<i>Pseudomonas cepacea</i>
	1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
20	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Escherichia hermanii</i>

**Tabella 10.** - Percentuali sul totale delle specie identificate relative alle colonie rosse con riflesso verde-metallico, isolate dal terreno m-Endo Agar.

Specie	Numero colonie identificate	% sul totale delle colonie identificate
<i>Escherichia coli</i>	28	43,08 %
<i>Escherichia hermanii</i>	4	6,15 %
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	6,15 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	6,15 %
<i>Enterobacter agglomerans</i>	4	6,15 %
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	1,54 %
<i>Citrobacter freundii</i>	2	3,08 %
<i>Citrobacter diversus</i>	2	3,08 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	9,23 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	4,62 %
<i>Hafnia alvei</i>	4	6,15 %
<i>Morganella morganii</i>	1	1,54 %
<i>Serratia marcescens</i>	1	1,54 %
<i>Pseudomonas cepacea</i>	1	1,54 %
Totale	65	100%

Allo stesso modo, in Tabella 11 è riportato l'elenco delle specie identificate riferite alle colonie atipiche (rosse-rosa) cresciute sul substrato m-Endo. La percentuale calcolata per ciascuna specie è riportata in Tabella 12. In questo caso si evidenzia che il 50% dei generi identificati appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, l'altro 50% fa parte della famiglia delle *Vibrionaceae* e delle *Pseudomonadaceae*.

Il 70% delle colonie rosse-rosa isolate dal substrato m-Endo non sono quindi microrganismi del gruppo dei classici enterobatteri, bensì sono batteri ambientali, spesso autoctoni dell'ambiente marino (es. *Vibrio*).

Per quanto riguarda le colonie selezionate sul substrato C-EC relativamente a quelle tipiche verdi-blu, i risultati ottenuti dall'identificazione sono riportati in Tabella 13. La percentuale calcolata per ciascuna specie identificata è riportata nella Tabella 14.

Tra le specie isolate, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, prevale con una percentuale del 24,6%, *Klebsiella pneumoniae*, seguita da *Citrobacter freundii* (19,7%) ed *Enterobacter cloacae* (18,0%), microrganismi inclusi nel gruppo dei coliformi.

Nella Tabella 15 sono riportati i risultati delle prove di identificazione biochimica effettuate sulle colonie verdi-blu fluorescenti selezionate ed isolate sul substrato C-EC. I valori percentuali ottenuti per ciascuna specie identificata sono riassunti nella Tabella 16. La specie identificata in percentuale più elevata è *Escherichia coli* con il 77,0% degli isolati; tuttavia tra le colonie identificate sono stati anche messi in evidenza microrganismi appartenenti al genere *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*.

Nella Tabella 17 sono riportati i valori numerici e le percentuali calcolate relativamente a tutte le colonie identificate sui due terreni colturali utilizzati. La distinzione tra le colonie identificate è presentata in base alla diversa appartenenza al gruppo delle *Enterobacteriaceae*, che comprende i coliformi, ovvero al gruppo delle non-*Enterobacteriaceae* che comprende le *Vibrionaceae* (*Vibrio* ed *Aeromonas*) e le *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*).

In base ai risultati ottenuti il substrato C-EC si è dimostrato altamente specifico per la ricerca delle *Enterobacteriaceae*, a differenza del substrato m-Endo su cui, le colonie atipiche (rosse-rosa) sono in alta percentuale (82%) rappresentate da microrganismi diversi da quelli del gruppo delle *Enterobacteriaceae*; anche quelle tipiche (rosse con riflesso verde-metallico) sono costituite, per l'1,5%, da microrganismi diversi da quelli ricercati.

I confronti dei risultati delle prove di identificazione di tutte le colonie selezionate, calcolati con il test del  $\chi^2$  con la correzione di Yates, considerando come riferimento i microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* hanno messo in evidenza che:

a) Sul terreno C-EC i microrganismi che hanno formato colonie verdi-blu fluorescenti appartenevano per il 100% alle *Enterobacteriaceae*, rispetto al numero dei microrganismi cresciuti come colonie rosse con riflesso verde-metallico sul terreno m-Endo (98% *Enterobacteriaceae*); tuttavia la differenza tra i risultati ottenuti non è statisticamente significativa;

b) Sul terreno C-EC, i microrganismi che hanno formato colonie verdi-blu appartengono per il 100% alle *Enterobacteriaceae*, rispetto al numero dei microrganismi cresciuti come

**Tabella 11.** - Risultati delle prove di identificazione biochimica delle colonie rosse-rosa isolate dal terreno m-Endo Agar.

Numero prelievo	Numero colonie identificate	Specie
1	1	<i>Hafnia alvei</i>
	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Pseudomonas putida</i>
	1	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	1	<i>Pseudomonas cepacea</i>
	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	1	<i>Escherichia hermannii</i>
	1	<i>Aeromonas salmonicida</i>
	1	<i>Escherichia coli</i>
5	1	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	1	<i>Pseudomonas putida</i>
	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Morganella morganii</i>
	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	1	<i>Vibrio damsela</i>
	1	<i>Escherichia coli</i>
7	1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Vibrio fluvialis</i>
	1	<i>Pseudomonas cepacea</i>
8	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
9	1	<i>Aeromonas salmonicida</i>
	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
11	1	<i>Vibrio fluvialis</i>
	1	<i>Pseudomonas versicularis</i>
	1	<i>Hafnia alvei</i>
12	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>

(Continua)

Tabella 11. - (Segue).

Numero prelievo	Numero colonie identificate	Specie
13	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Vibrio fluvialis</i>
	1	<i>Proteus vulgaris</i>
	1	<i>Pseudomonas putida</i>
	1	<i>Serratia spp.</i>
14	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
15	1	<i>Pseudomonas cepacea</i>
	2	<i>Aeromonas salmonicida</i>
	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
16	1	<i>Citrobacter freundii</i>
	1	<i>Vibrio fluvialis</i>
	1	<i>Pseudomonas spp.</i>
17	1	<i>Proteus mirabilis</i>
	1	<i>Aeromonas salmonicida</i>
	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
18	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Morganella morganii</i>
	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
19	1	<i>Vibrio damsela</i>
	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Vibrio metschnikovii</i>
	1	<i>Pseudomonas putida</i>
20	1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	1	<i>Vibrio metschnikovii</i>
	1	<i>Pseudomonas putida</i>

**Tabella 12.** - Percentuali sul totale delle specie identificate relative alle colonie rosse-rosa isolate dal terreno m-Endo Agar.

Specie	Numero colonie identificate	% sul totale delle colonie identificate
<i>Hafnia alvei</i>	2	3,03 %
<i>Aeromonas hydrophila</i>	20	30,30 %
<i>Aeromonas salmonicida</i>	5	7,57 %
<i>Pseudomonas putida</i>	4	6,06 %
<i>Pseudomonas cepacea</i>	3	4,54 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	3,03 %
<i>Pseudomonas versicularis</i>	1	1,51 %
<i>Pseudomonas spp.</i>	1	1,51 %
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	3,03 %
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	1,51 %
<i>Escherichia hermannii</i>	1	1,51 %
<i>Escherichia coli</i>	4	6,06 %
<i>Morganella morganii</i>	2	3,03 %
<i>Vibrio damsela</i>	2	3,03 %
<i>Vibrio fluvialis</i>	4	6,06 %
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	3,03 %
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1,51 %
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	1,51 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,51 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	3,03 %
<i>Citrobacter freundii</i>	2	3,03 %
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1,51 %
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,51 %
<i>Serratia spp.</i>	1	1,51 %
Totale	66	100%

**Tabella 13.** - Risultati delle prove di identificazione biochimica delle colonie verdi-blu isolate dal terreno C-EC Agar.

Numero prelievo	Numero colonie identificate	Specie
1	1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
2	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Citrobacter diversus</i>
3	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>
4	2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Hafnia alvei</i>
5	1	<i>Hafnia alvei</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Proteus vulgaris</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	2	<i>Citrobacter freundii</i>
7	1	<i>Serratia marcescens</i>
	2	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	1	<i>Citrobacter freundii</i>
	1	<i>Enterobacter agglomerans</i>
9	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>Citrobacter freundii</i>
10	0	
11	1	<i>Escherichia coli</i>
	2	<i>Enterobacter cloacae</i>
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
13	1	<i>Morganella morganii</i>
	2	<i>Citrobacter diversus</i>
14	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>Citrobacter freundii</i>
15	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>

(Continua)

Tabella 13. - (Segue).

Numero prelievo	Numero colonie identificate	Specie
16	2	<i>Enterobacter aerogenes</i>
17	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>
	1	<i>Proteus vulgaris</i>
18	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Enterobacter sakazakii</i>
	2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
19	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>
	2	<i>Serratia marcescens</i>
20	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Enterobacter sakazakii</i>
	2	<i>Klebsiella oxytoca</i>

Tabella 14. - Percentuale sul totale delle specie identificate relative alle colonie verdi-blu isolate dal terreno C-EC Agar.

Specie	Numero colonie identificate	% sul totale delle colonie identificate
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	3,28 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	18,03 %
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	6,55 %
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	1,64 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	24,60 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	6,55 %
<i>Citrobacter diversus</i>	3	4,92 %
<i>Citrobacter freundii</i>	12	19,67 %
<i>Hafnia alvei</i>	2	3,28 %
<i>Proteus vulgaris</i>	2	3,28 %
<i>Serratia marcescens</i>	3	4,92 %
<i>Escherichia coli</i>	1	1,64 %
<i>Morganella morganii</i>	1	1,64 %
Totale	61	100%

**Tabella 15.** - Risultati delle prove di identificazione biochimica delle colonie verdi-blu fluorescenti isolate dal terreno C-EC Agar.

Numero prelievo	Numero colonie identificate	Specie
1	1	<i>Escherichia coli</i>
2	2	<i>Escherichia coli</i>
3	3	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Escherichia hermannii</i>
4	4	<i>Escherichia coli</i>
5	3	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	2	<i>Escherichia coli</i>
7	2	<i>Escherichia coli</i>
	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	2	<i>Escherichia coli</i>
9	4	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Escherichia hermannii</i>
10	0	
11	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	1	<i>Citrobacter freundii</i>
12	1	<i>Escherichia coli</i>
13	3	<i>Escherichia coli</i>
14	3	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Escherichia hermannii</i>
15	4	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
16	2	<i>Escherichia coli</i>
17	3	<i>Escherichia coli</i>
18	1	<i>Escherichia coli</i>
19	3	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
20	2	<i>Escherichia coli</i>
	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>

**Tabella 16.** - Percentuali sul totale delle specie identificate relative alle colonie verdi-blu fluorescenti isolate dal terreno C-EC Agar.

Specie	Numero colonie identificate	% sul totale delle colonie identificate
<i>Escherichia coli</i>	47	77,05 %
<i>Escherichia hermannii</i>	3	4,92 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	9,84 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	3,20 %
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,64 %
Non identificate	2	3,28 %
Totale	61	100%

**Tabella 17.** - Valori riassuntivi delle prove di identificazione ottenute per le diverse tipologie di colonie isolate dai due terreni utilizzati.

Morfologia colonie	Enterobatt.	%	non Enterobatt.	%	Totale colonie
Terreno C-EC Agar					
V-B-Fluo	61	100%	0		61
V-B	61	100%	0		61
Terreno m-Endo Agar					
Rosso-met.	64	98,50%	1	1,50%	65
Rosso-rosa	12	18,20%	54	82%	66

Enterobatt. = Enterobatteriacee

non Enterobatt. = Organismi non appartenenti alle Enterobatteriacee

V-B-Fluo = Colonie verdi-blu fluorescenti

V-B = Colonie verdi-blu

Rosso-met. = Colonie rosse con riflessi verde-metallico

colonie rosse-metalliche sul terreno m-Endo (98% *Enterobacteriaceae*); la differenza tra i risultati ottenuti non è statisticamente significativa;

c) Sul terreno C-EC, i microrganismi che hanno formato colonie verdi-blu fluorescenti appartenevano per il 100% alle *Enterobacteriaceae*, rispetto al numero dei microrganismi cresciuti come colonie rosse-rosa sul terreno m-Endo (18% *Enterobacteriaceae*); la differenza tra i risultati ottenuti è statisticamente significativa;

d) Sul terreno C-EC, i microrganismi che hanno formato colonie verdi-blu appartengono per il 100% alle *Enterobacteriaceae*, rispetto al numero dei microrganismi cresciuti come colonie rosse-rosa (18% *Enterobacteriaceae*), la differenza tra i risultati ottenuti è statisticamente significativa.

Vengono riportati anche i valori numerici e percentuali calcolati sui risultati delle identificazioni, ottenuti rispetto alla sola individuazione della specie di *Escherichia coli* (Tabella 18). La specie ricercata è stata identificata, come d'altronde era atteso, in percentuale più elevata, nel 77% dei casi, tra le colonie selezionate sul substrato C-EC con la caratteristica fluorescenza. Tuttavia, circa nel 20% dei casi, le stesse colonie hanno fornito dati falsi positivi (FP), dovuti probabilmente ad una diffusione della fluorescenza nella piastra di isolamento, che ha interessato anche colonie non fluorescenti, ovvero alla sovrapposizione di colonie di specie diverse.

In Tabella 19 sono stati riportati i risultati delle identificazioni delle colonie verdi-blu fluorescenti isolate dal substrato C-EC utilizzato per l'analisi di 11 campioni di acqua di mare prelevati lungo le coste tirreniche. Per la selezione delle colonie è stato seguito lo stesso schema riferito per le colonie isolate dai campionamenti effettuati lungo le coste adriatiche.

Il substrato utilizzato in questo caso è stato il C-EC Agar, sul quale sono state individuate ed isolate 30 colonie verdi-blu fluorescenti. I risultati riportati in Tabella 19 evidenziano che su di un totale di 29 colonie identificate (una è risultata non identificata), il 95% appartiene alla specie *Escherichia coli* e il 3,4% (una colonia) è prodotta da *Citrobacter freundii*.

**Tabella 18.** - Risultati delle prove di identificazione, relativamente alla ricerca di *Escherichia coli*, considerando le quattro tipologie di colonie isolate dai due terreni utilizzati.

Morfologia colonie	<i>Escherichia coli</i>	%	Non <i>Escherichia coli</i>	%
Terreno C-EC Agar				
V-B-Fluo	47 (P)	77,05%	12 (FP)	19,60%
V-B	1 (FN)	1,64%	60 (N)	98,36%
Terreno m-Endo Agar				
Rosse-met.	28 (P)	43,08%	37 (FP)	56,92%
Rosse-rosa	4 (FN)	6,06%	62 (N)	93,94%

V-B-Fluo = colonie verdi-blu fluorescenti

V-B = colonie verdi blu

Rosse-met. = Colonie rosse con riflessi verde-metallico

P = Positivi

N = Negativi

FP = Falsi positivi

FN = Falsi negativi

Tabella 19. - Risultati delle prove di identificazione delle colonie verdi-blu fluorescenti isolate dal terreno C-EC Agar. L'analisi è stata effettuata sui campioni di acqua di mare prelevati lungo le coste tirreniche.

Numero prelievo	Numero colonie identificate	Specie
1	8	<i>Escherichia coli</i>
	1	Non identificato
2	1	<i>Citrobacter freundii</i>
3	3	<i>Escherichia coli</i>
4	2	<i>Escherichia coli</i>
5	2	<i>Escherichia coli</i>
6	4	<i>Escherichia coli</i>
7	1	<i>Escherichia coli</i>
8	2	<i>Escherichia coli</i>
9	3	<i>Escherichia coli</i>
10	2	<i>Escherichia coli</i>
11	1	<i>Escherichia coli</i>
Tot.	30	

## DISCUSSIONE

Gli organismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali sono ancora considerati, nell'ambito della legislazione europea e di conseguenza in quella italiana, come un punto di riferimento per la valutazione della qualità delle acque. Tuttavia, in relazione alla modifica attualmente in corso della Direttiva europea sulla determinazione della qualità delle acque di balneazione, che comporterà anche un aggiornamento delle metodologie di analisi, è risultato opportuno procedere ad una valutazione qualitativa e quantitativa di due substrati colturali per la ricerca dei coliformi totali e di *Escherichia coli*, quest'ultimo come parametro che si intende introdurre con la nuova direttiva.

Recentemente il Ministero della Sanità, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità, ha inviato agli operatori degli organi periferici (PPMMPP, UUSSLL) un questionario relativo ai metodi analitici per la ricerca dei coliformi totali nelle acque di balneazione.

Dall'elaborazione delle risposte è emerso un quadro piuttosto uniforme da cui risulta che l'85% dei laboratori utilizza il metodo della filtrazione su membrana, contro il 15% che impiega quello dei tubi multipli. Tuttavia solo il 5% degli operatori adibiti ai controlli considera questa tecnica applicabile, di routine, all'analisi microbiologica delle acque per la ricerca dei coliformi totali.

Per quanto riguarda il metodo della filtrazione su membrana, risultano evidenti i limiti del terreno m-Endo, substrato indicato nelle norme tecniche della legislazione. In quasi tutti i laboratori interpellati la lettura dei risultati viene effettuata considerando sia le colonie rosse, sia quelle con riflesso verde-metallico. La scarsa selettività del substrato e le difficoltà di interpretazione dei risultati costringe il 76% dei laboratori ad effettuare prove biochimiche di conferma sulle colonie dubbie, generalmente quelle rosse senza riflesso verde-metallico. Nel 30% dei casi si giunge anche alla identificazione a livello di specie, dei microrganismi isolati, utilizzando microkit di prove biochimiche.

Dalle esperienze maturate e da quelle di coloro che hanno risposto al questionario appare chiaro che il terreno m-Endo non è un substrato idoneo per il rilevamento dei coliformi totali, sia per quanto riguarda l'isolamento dei microrganismi ricercati, sia per le difficoltà che si manifestano nella lettura dei risultati.

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di acque marine, prelevati lungo le coste del mare Adriatico, hanno evidenziato che dal punto di vista quantitativo, i due substrati utilizzati nella presente ricerca, ad una prima valutazione sono comparabili. Infatti, sebbene il substrato C-EC abbia fornito conte più alte (33% in più) rispetto all'm-Endo, la correlazione tra i risultati ottenuti dalla conta delle colonie tipiche su ciascuno dei due terreni si appresta all'unità (coefficiente di Pearson = 0,97; vedi Tabella 6).

Difficoltà nella identificazione delle colonie tipiche e quindi nell'interpretazione dei risultati delle analisi effettuate per la ricerca dei coliformi totali sul substrato m-Endo sono state più volte e ripetutamente segnalate.

Oltretutto ulteriori problemi nascono proprio dalle norme tecniche indicate nella normativa italiana. Infatti, mentre la normativa relativa al controllo della qualità delle acque di balneazione (D.P.R. n. 470/82) stabilisce che sull'm-Endo i coliformi totali devono apparire come "colonie rosse con riflesso verde-metallico", la normativa relativa al

controllo della qualità delle acque destinate al consumo umano (D.P.R. n. 236/88) stabilisce che gli stessi microrganismi siano individuati, sullo stesso terreno colturale, come "colonie rosse".

Gli Standard Methods (APHA,1992) riportano che i coliformi totali cresciuti sul terreno m-Endo formano colonie tipiche rosse con riflesso verde-metallico "typical, pink to dark red with a green metallic surface sheen".

Dai risultati ottenuti dalla nostra ricerca è stato verificato che, nei campioni di acqua di mare analizzati, le colonie rosse-rosa (atipiche) erano formate per il 70% da microrganismi diversi dai coliformi (Tabella 11 e Tabella 12). Infatti solo il 30% degli organismi isolati apparteneva alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, mentre il restante 70% era costituito da microrganismi inclusi nei generi *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*.

Risultati analoghi sono stati riportati da diversi Autori (Bonadonna & Villa, 1993; Bonadonna, 1994; Di Girolamo, 1992; Manupella *et al.*, 1992).

Difficile resta, comunque, l'individuazione della morfologia tipica delle colonie di coliformi. Infatti, anche nel corso della presente ricerca, in alcuni casi è risultato indaginoso il riconoscimento della tipica lucentezza metallica; colonie selezionate ed isolate, ma che erano classificate come "dubbie" a causa della poco chiara tipologia, spesso si sono rivelate appartenenti al genere *Enterobacter*. Tuttavia, proprio per la difficoltà nel riconoscimento della morfologia, è possibile che colonie formate da questo microrganismo possano sfuggire all'individuazione e non essere quindi comprese nel conteggio totale dei coliformi.

Nel tentativo di ridurre gli inconvenienti legati all'uso del terreno m-Endo per la ricerca dei coliformi totali nelle acque, si potrebbero usare alcuni accorgimenti tecnici che potrebbero facilitare, almeno in parte, la lettura dei risultati. Il terreno m-Endo andrebbe preparato al momento dell'uso riscaldandolo a bagnomaria per pochi minuti, ma verificando con attenzione che tutti gli ingredienti si siano disciolti. Inoltre, dovrebbe essere mantenuto al riparo dalla luce, sia dopo la preparazione, sia fino al momento della lettura dei risultati.

Il confronto effettuato tra i risultati delle identificazioni delle colonie tipiche isolate su ciascuno dei due terreni utilizzati ha messo in evidenza che il substrato cromogeno (C-EC) è in grado di selezionare esclusivamente, come colonie tipiche verdi-blu, i microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (100% delle colonie isolate ed identificate). Analogamente, anche il terreno di più vecchia formulazione (m-Endo) permette la crescita, relativamente alle colonie tipiche, degli organismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (98% delle colonie isolate ed identificate).

Diversi sono, invece, i risultati se si considerano anche le colonie rosse-rosa sull'm-Endo che sono rappresentate da coliformi solo nel 18% dei casi.

Per quanto riguarda la ricerca di *Escherichia coli*, risultati diversi sono stati ottenuti dal confronto effettuato utilizzando il substrato cromogeno C-EC per l'analisi dei campioni di acqua di mare prelevati lungo l'Adriatico e lungo il Tirreno.

Dai risultati delle identificazioni delle colonie tipiche (verdi-blu fluorescenti), nel caso dei campioni prelevati in Adriatico, solo il 77% delle colonie è risultato appartenere alla specie *Escherichia coli*, con alcuni falsi positivi (20%). Nel caso dell'analisi dei

campioni prelevati nel Tirreno, solo una colonia su 29 identificate è risultata non essere formata da *Escherichia coli*.

E' probabile che si sia verificato il caso che la fluorescenza, caratteristica che contraddistingue *Escherichia coli* dai coliformi sul substrato cromogeno, si sia diffusa sul terreno colturale contribuendo a confondere il risultato della lettura. Per ovviare a questi inconvenienti, a differenza di quanto indicato dai produttori del terreno colturale, è consigliabile effettuare la lettura dei risultati delle analisi dopo 18-20 ore di incubazione dei campioni. Si evita così che, con il passare del tempo, la fluorescenza diffonda alle colonie contigue dalle colonie con questa caratteristica.

## CONCLUSIONI

In fase di recepimento della Direttiva Europea, la legislazione italiana, anche sulla base di valutazioni tecniche, dovrà fornire le metodologie analitiche per il controllo delle acque di balneazione, nel pieno rispetto delle indicazioni presenti nella direttiva stessa.

La scelta di un metodo di analisi comporta una serie di considerazioni che comprendono, oltre ad una valutazione strettamente tecnico-scientifica, anche una valutazione dei costi relativi al suo utilizzo.

Ormai da una decina di anni, si stanno affermando, per il rilevamento dei coliformi, metodi di analisi più rapidi e specifici (Bonadonna & Volterra, 1992; Covert *et al.*, 1989). Si tratta di metodiche che utilizzano substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni e che si basano sullo sfruttamento di attività enzimatiche specifiche. I dati riportati in letteratura sembrano confermare, da parte di questi substrati alternativi, una maggiore efficienza, selettività e specificità rispetto a quelli tradizionali (Augoustinos *et al.*, 1993).

Confronti tra il terreno classico (m-Endo) e quello a base di cromogeno, effettuati su acque a diverso grado di contaminazione (Bonadonna & Villa, 1993), permettono di considerare la possibilità che i substrati di più recente formulazione possano costituire una alternativa interessante per la ricerca dei coliformi totali nelle acque. In questo ambito si può anche osservare che l'uso di questi substrati potrebbe risultare vantaggioso nel limitare i costi aggiuntivi necessari ad effettuare prove di conferma o di identificazione delle colonie sospette, nonché nel ridurre i tempi di esecuzione e risposta delle analisi.

I risultati ottenuti nella presente ricerca confermano l'alta specificità del substrato cromogeno che produce colonie tipiche (verdi-blu) ben distinguibili per i coliformi totali.

E' probabile, d'altra parte, che anche rispetto agli indicatori "coliformi fecali" questo substrato possa essere utilizzato con vantaggio.

Una certa difficoltà nella lettura dei risultati è stata invece riscontrata per la ricerca di *Escherichia coli* su questo terreno; tuttavia la soluzione a questo inconveniente può essere fornita riducendo i tempi di incubazione dei campioni analizzati.

Il substrato m-Endo, ancora utilizzato per legge nei controlli delle acque, si è rivelato sì specifico, ma limitatamente alle colonie tipiche (rosse con riflesso verde-metallico). Il conteggio delle colonie rosse-rosa (atipiche) comporta errori di valutazione per l'alta frequenza di colonie non appartenenti al gruppo dei coliformi. L'eventuale selezione delle colonie dubbie, d'altra parte, implica lo svolgimento di prove di conferma e di identificazione con aggravio dei costi delle analisi e l'allungamento dei tempi di risposta.

L'uso di procedure più rapide e precise, che permettano invece di ottenere risultati più attendibili e in minor tempo, costituisce un fattore fondamentale quando da un controllo dipende una decisione di intervento ambientale, soprattutto se di interesse sanitario.

## BIBLIOGRAFIA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. *APHA-AWWA-WPCF Washington DC*, 1992.

AUGOUSTINOS M.T., GRABOW N.A., GENTHE B. KFIR R. An improved membrane filtration method for enumeration of fecal coliforms and *Escherichia coli* by a fluorogenic  $\beta$ -glucuronidase assay. *Water Scientific Technology* 1993, 3-4: 267-273.

BCR INFORMATION. Sea water microbiology performance of methods for the microbiological examination of bathing water. *Part II. EUR 16613 EN, European Commission*, 1995.

BIGGER J.W. The growth of coliform bacilli in water. *Journal of Pathologica Bacteriology* 1937, 44: 167-211.

BOYD W.L. & BOYD J.W. Viability of Thermophiles and coliforms bacteria in arctic soils and waters. *Canadian Journal of Microbiology* 1962, 8: 189-192.

BONADONNA L. Coliformi totali sul substrato m-Endo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche. *Tecnica Sanitaria* 1994, 32: 151-159.

BONADONNA L. & VILLA L. Un substrato cromogeno per l'isolamento dei coliformi totali nelle acque: il C-EC-MF *Metodi analitici per le acque. Notiziario dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR* 1993, 13: 3-7

BONADONNA L. & VILLA L. Metodi microbiologici. *Metodi analitici per le acque. Quaderno 100 n. 2. Istituto Ricerca sulle Acque, C.N.R. (Ed.). Istituto poligrafico e zecca dello stato Roma* 1994.

BONADONNA L. & VOLTERRA L. Un metodo rapido per l'analisi dell'acqua: il test Autoanalysis Colilert. *Biologi Italiani* 1992, 10: 14-17.

BONDI M., MESSI P., MANICARDI G., MANICARDI M., CASSINADRI M., TARTONI P.L., TAMPIERI A. Controllo su isolamenti ed identificazioni batteriche. *Tecnica sanitaria* 1992, 30: 133-147.

BUHLER H.J., KATZMAN P.A. & DOISY F.A. Studies on  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1951, 76: 672-676.

CHANG G.V., BRILL J. & LUM R. Proportion of  $\beta$ -D-glucuronidase-Negative *Escherichia coli* in Human fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, 55: 335-339.

CLEUZIAT P. & ROBERT-BAUDOY J. Specific detection of *Escherichia coli* and *Shigella* species using fragments of genes coding for  $\beta$ -glucuronidase. *Fems Microbiology Letters* 1990, 72: 315-322.

COVERT T.C., SHADIX L.C., RICE E.W., HAINES J.R. & FREYBERG R.W. Evaluation of Autoanalysis Colilert for detection and enumeration of total coliforms. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, 55: 2443-2449.

DAHLEN G. & LINDE A. Screening plate method for detection of bacterial  $\beta$ -glucuronidase. *Applied Microbiology* 1973, 26: 863-866.

DI GIROLAMO I. Il terreno m-Endo e la colimetria. *Atti del seminario "Aspetti microbiologici e tossicologici delle acque" Assessorato alla Sanità, Regione Piemonte. Torino 31 Gennaio 1992.*

DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA, 24 MAGGIO 1988 n° 236. Attuazione della Direttiva CEE n. 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della legge 16 Aprile 1987, n. 183. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 152 del 30 Giugno 1988.*

DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA, 8 GIUGNO 1982 n° 470. Attuazione della direttiva (CEE) n. 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana del 27 7 1982, n. 203.*

DIRETTIVA DEL CONSIGLIO, 8 DICEMBRE 1975 concernente la qualità delle acque di balneazione, 76/160/CEE. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee del 5 Febbraio 1976, n. L 31/1.*

DOYLE M.P. & SCHOENI J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* 1984, 48: 855-856.

EDBERG S.C. & TREPETA M.J. Rapid and economical identification and antimicrobial susceptibility test methodology for urinary tract pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 1983, 18: 1287-1291.

FARBER J.H.V. Potential use of membrane filters and a fluorogenic reagent-based solid medium for the enumeration of *Escherichia coli* in foods. *Canadian Institute of Food Scientific Technologie* 1986, 1: 34-37.

FENG P.C.S. & HARTMAN P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 1982, 43: 1320-1329.

FOWLER J. & COHEN L. Statistica per ornitologi e naturalisti. *Franco Muzio Editore* 1993.

FREIER T.A., & HARTMAN P.A. Improved membrane filtration media for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from sewage and surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* 1987, 53: 1246-1250.

GELDREICH E.E. Sanitary significance of fecal coliforms in the environment. *U.S. Dept. of the Interior, FWPCA Publ. WP-20-3* 1966.

GELDREICH E.E., BORDNER R.H., HUFF C.B., CLARK H.F. & KABLER P.W. Type distribution of coliform bacteria in the feces of warm-blooded animals. *Journal of Water Pollution Control Federation* 1962, 34: 295.

GELDREICH E.E., KENNER B.A. & KABLER P.W. Occurrence of coliforms, fecal coliforms and streptococci on vegetation and insects. *Applied Microbiology* 1964, 42: 63-69.

HANSEN W. & YOURASSOWSKY E. Detection of  $\beta$ -Glucuronidase in lactose-fermenting members of the family Enterobacteriaceae and its presence in bacterial urine. *Journal of Clinical Microbiology* 1984, 20: 1177-1179.

HOLT S.M., HARTMAN P.A. & KASPAR C.W. Enzyme-capture assay for rapid detection of *Escherichia coli* in oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, 55: 229-232.

KAMPFER P., RAUHOFF D. & DOTT W. Glicosidase profiles of members of the family Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29: 2877-2879.

KILIAN M. & BULOW P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae I. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica (Section B)* 1976, 84: 245-251.

KILIAN M. & BULOW P. Rapid identification of Enterobacteriaceae II. Use of a  $\beta$ -glucuronidase-detection agar medium (PGUA) for the identification of *Escherichia coli* in primary cultures of urine samples. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica (section B)* 1979, 87: 271-276.

LE MINOR L. Tetrathionate-reductase,  $\beta$ -glucuronidase and ONPG-Test in the genus *Salmonella*. *Zentralblatt für Bacteriologie Parasitenkunde Infektions-Krankheiten und Hygiene Abteilung Originale A*. 1979, 243: 321-325.

LEY A.N., BOWERS R.J. & WOLFE S. Indoxyl- $\beta$ -D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental samples. *Canadian Journal of Microbiology* 1988, 34: 690-693.

MANAFI M. & ROTTER M.L. A new plate medium for rapid presuntive identification and differentiation of Enterobacteriaceae. *International Journal of Food Microbiology* 1991, 14: 127-134.

MANUPELLA A., PEDE V., RICCI N., DI PARDO L., SPINELLI R., TOLLIS E. Validità del terreno m-Endo Les nella rilevazione della colimetria totale nelle acque potabili. *Tecnica Sanitaria* 1992, 30: 347-352.

MEAD J.A.R., SMITH J.N. & WILLIAMS R.T. The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of  $\beta$ -glucuronidase. *Biochemical Journal* 1955, 61: 569-574.

NATIONAL PRIMARY DRINKING WATER REGULATION. Analytical techniques; coliform bacteria. *Federal Register* 1992, 57: 24744-24747.

PEREZ J.L. & HARTMAN P.A. Evaluation of commercial  $\beta$ -glucuronidase test for the rapid and economical identification of *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology* 1986, 61: 541-545.

PEREZ J.L. & HARTMAN P.A. Monensin-based medium for total gram-negative bacteria and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 1985, 49: 925-933.

RESTAINO L., FRAMPTON E.W. & LYON R.H. Use of the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-gluc) for enumerating *Escherichia coli* in 24 h. for ground beef. *Journal of Food Protection* 1990, 53: 508-510.

RICE E.W., ALLEN M.J., BRENNER D.J. & EDBERG S.C. Assay for  $\beta$ -glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking-water analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 1991, 57: 592-593.

RIPPEY S.R., CHANDLER L.A. & WATKINS W.D. Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shellfish. *Journal of Food Protection* 1987, 50: 685-690.

SAHRAN H.R. & FOSTER H.A. A rapid fluorogenic method for the detection of *Escherichia coli* by the production of  $\beta$ -glucuronidase. *Journal of Applied Bacteriology* 1991, 70: 394-400.

SECOND EUROPEAN CONFERENCE ON ENVIRONMENT AND HEALTH. Declaration on action for environment and health in Europe. *WHO, ICP/CEH 212 Rev. 1. Helsinki, 20-22 June 1994.*

SHARPE A.N., PARRINGTON L.J., DIOTTE M.P. & PETERKIN P.I. Evaluation of indoxyl- $\beta$ -D-glucuronidase and hydrophobic grid membrane filters for electronic enumeration of *Escherichia coli*. *Food Microbiology* 1989, 6: 267-280.

TREPETA R.W. & EDBERG S.C. Methylumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 1984, 19: 172-174.

*Direttore reggente dell'Istituto Superiore di Sanità  
e Responsabile scientifico: Aurelia Sargentini*

*Direttore responsabile: Vilma Alberani*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali  
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988*

*Roma, marzo 1997 (n. 1) 2° Suppl.*