

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 χ^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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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, β -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- β -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 β -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 β -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- β -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 β -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 β -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- β -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- β -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.