

DETERIORAMENTO DI UN TESSUTO DI NAILON POLIAMIDICO DA *FUSARIUM SP.*

G. BAGGI, N. PACINI e C. SORLINI

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università degli Studi, Milano

Riassunto. — Dalle indagini microbiologiche condotte su campioni di nailon deteriorato per la presenza di macchie marroni, si è potuto rilevare che le alterazioni erano provocate da *Fusarium sp.* E' risultato inoltre che tale ifomicete cresce utilizzando l'emulsione oleosa usata nell'imbozzimatura dei filati e non i filati stessi. *Fusarium sp.* è risultato essere particolarmente sensibile a *Kathon 886*.

Summary — (Deterioration of a nylon polyamidic fabric by *Fusarium sp.*). Microbiological studies carried out on samples of nylon fabrics deteriorated by brown stains, have shown that the damage was caused by *Fusarium sp.*. This hyphomycete grows at the expense of the emulsion of oils used for yarn sizing and not at the expense of the yarns themselves. Among the biocides tested, *Kathon 886* was the most effective against *Fusarium sp.*

Introduzione

Numerose sono le ricerche condotte sulle alterazioni microbiche di fibre naturali quali cotone, lana, lino, iuta [1-3]; meno sviluppate sono invece le indagini sul deterioramento di filati di sintesi e relativi tessuti [4-6].

Scopo di questa ricerca è stato identificare il microrganismo responsabile di una alterazione che si è presentata sotto forma di piccole macchie scure su tessuto di nailon poliamidico durante lo stoccaggio. Si è inteso inoltre saggiare, su tale microrganismo, alcuni composti con attività biocida, scelti tra quelli di possibile impiego nell'industria tessile.

Materiali e metodi

E' stato preso in esame un tessuto di nailon poliamidico bianco con macchie marroni irregolarmente tondeggianti di diametro 0,5 - 2 mm.

Coltivazione. — Gli arricchimenti di eumiceti e schizomiceti venivano allestiti introducendo piccoli ritagli di tessuto alterato in beute da 500 ml contenenti rispettivamente 100 ml di Sabouraud Broth e Nutrient Broth Difco. Le beute seminate in doppio venivano incubate a 28° C sia in agitazione sia in coltura statica. Dopo tre giorni venivano eseguiti gli isolamenti degli eumiceti e degli schizomiceti mediante diluizioni successive in piastra utilizzando come terreni colturali rispettivamente Bacto-Malt Extract Broth (Difco) a pH 4,7 e Nutrient Broth (Difco) a pH 7 agarizzati. Le piastre venivano incubate a 28° C per 72 e 48 ore rispettivamente. La purezza dei ceppi isolati veniva controllata sulla base della morfologia delle colonie, osservate macroscopicamente dopo ripetuti piastramenti e delle ife osservate al microscopio a contrasto di fase, a immersione e allo stereomicroscopio.

Prove sull'attività deteriorante dei ceppi isolati. — Al fine di evidenziare i microrganismi responsabili delle alterazioni sul tessuto analizzato, tutti i ceppi isolati venivano saggiati su tessuto integro seguendo due metodiche:

a) sospensioni di cellule di schizomiceti e di spore di eumiceti (10^6 /ml) erano seminate in beute da 500 ml contenenti rispettivamente 100 ml di Nutrient Broth e Sabouraud Broth in presenza di piccoli ritagli di tessuto integro sterile e incubate per 15 giorni a 28° C;

b) le stesse sospensioni erano seminate per striscio sugli stessi terreni agarizzati, sui quali venivano posti ritagli di tessuto integro sterilizzato. L'incubazione veniva protratta per 30 giorni a 28° C. I ritagli di tessuto venivano prelevati per l'osservazione diretta a intervalli di 5 giorni.

Test di ammuffimento dei tessuti. — Una sospensione di $10^6 \pm 200.000$ spore/ml della muffa isolata veniva nebulizzata su strisce di tessuto integro e sterile fino ad inumidimento completo [7]. Il tessuto, posto in appositi contenitori, veniva incubato in "camera tropicale" con umidità relativa del 96-100% e temperatura di 28° C. I controlli venivano eseguiti prelevando dopo 14 - 28 gg

alcuni campioni di tessuto incubati; dopo rimozione della patina microbica formatasi durante l'incubazione, i ritagli di tessuto venivano sottoposti a ripetuti lavaggi e osservati sia macro- che microscopicamente (per evidenziare eventuali alterazioni comparse sul tessuto).

Biocidi saggiati. — Sono stati saggiati i seguenti biocidi: 10% di α -(p-tolil)-dodecil-trimetilammonio-ossimetil-solfato, Desogen (Ciba Geigy); 100% di 6-acetossi-2,4-dimetil-*m*-diossano, Giv-Gard DXN (Givaudan Corp.); 10,1% di 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one e 3,8% di 2-metil-4-isotiazolin-3-one, Kathon 886 MW (Rohm & Haas); 97% di 2,4-diclorobenzil alcool, Myacide TF (Boots Comp.); 100% di 2-(idrossimetil) amino etanolo, Troysan 174 (Troy Chem. Corp.); 40% di 3-iodio-2-propinil butil carbammato, Troysan Polyphase Anti-Mildew (Troy Chem. Corp.).

Prove di crescita in presenza di emulsione oleosa. — Il ceppo deteriorante è stato seminato in terreno liquido minerale di Raymond e Davis [8] cui veniva aggiunta come unica fonte di carbonio e di energia l'emulsione oleosa utilizzata nell'imbozzimatura dei filati, all'1%. L'emulsione oleosa in acqua, nella quale era presente a scopo batteriostatico lo 0,005-0,05% di 2-(ossimetil) aminoetanolo, era costituita per il 10-20% da oli di cui 55-65% era olio di cocco ed il 20-35% olio di ricino polioossietilene idrogenato, e per il 7-15% di polioossietilene tridecilsolfato di potassio. Le brodocolture venivano incubate in agitazione alternativa (RPM 84 x min.) a 28°C per 48-72 ore.

Sensibilità della muffa isolata ai biocidi saggiati. — La determinazione dell'attività è stata valutata mediante il metodo della Concentrazione Minima Inibente (CMI) in terreno di Sabouraud agarizzato al 15%. Le soluzioni all'1% di Desogen, Giv-Gard, Myacide TF e Troysan 174 venivano preparate in acqua distillata, quelle di Kathon 886 MW e Troysan Polyphase in polietilenglicol 200. Le successive diluizioni venivano allestite sempre in acqua distillata ed inglobate nel terreno di prova. Le piastre venivano seminate in superficie mediante ansa calibrata (4 mm) con una sospensione contenente 10^6 spore/ml ed incubate per 3 gg.

Microscopio elettronico. — I campioni sono stati fissati con vapori di O_3O_4 all'1%, ricoperti con un sottile strato di oro palladio ed esaminati con un microscopio elettronico a scansione modello n. S250, Cambridge Scientific Instruments, London, a 20-30 kV (il voltaggio indica il potenziale elettrico applicato alla corrente del fascio, che scandisce l'immagine osservata). La pellicola utilizzata era Trix-X-120 film (Eastman Kodak, Rochester, N.Y.).

Risultati

Un preliminare esame eseguito al microscopio a contrasto di fase del tessuto deteriorato ha messo in eviden-

za la presenza di ife e di bastoncini in corrispondenza delle macchie scure che alteravano il tessuto stesso. Dalle colture di arricchimento approntate con campioni di tessuto alterato sono stati isolati in coltura pura un ceppo di lievito, due ceppi di ifomiceti e due di cubatteri Gram-negativi. Tali microrganismi risultavano assenti nei controlli eseguiti con tessuto integro. Al fine di evidenziare i microrganismi responsabili delle alterazioni, tutti i ceppi isolati sono stati incubati in presenza di tessuto integro, in terreno di Sabouraud e Nutrient Broth sia liquido che agarizzato, come descritto nei metodi. Soltanto i ritagli prelevati dalle colture di uno dei due ifomiceti saggiati presentavano le tipiche macchie presenti sul tessuto deteriorato durante lo stoccaggio. L'osservazione allo stereomicroscopio evidenziava in corrispondenza delle macchie la presenza di ife fungine intrecciate con le fibre tessili che apparivano alterate nel colore.

Ad ulteriore conferma dell'attività deteriorante della muffa isolata è stata allestita la prova di ammuffimento in "camera tropicale". Dopo 14 giorni di incubazione i tessuti non presentavano ancora alterazioni evidenti che venivano invece rilevate al secondo controllo dopo 28 giorni.

Identificazione della muffa isolata. — Il micelio vegetativo della muffa presenta una colorazione rosso-violacea. Dall'osservazione al microscopio a contrasto di fase e a scansione, le ife conidiofere appaiono semplici o ramificate in modo irregolare e i conidi di tre tipi diversi: macronidi pluricellulari, dalla tipica forma a scarpetta, leggermente ricurvi, con estremità appuntite; microconidi unicellulari ovali, isolati o in brevi catenelle; conidi bi-tricellulari ovali o leggermente ricurvi (Fig. 1).

In base alle caratteristiche morfologiche rilevate sia all'osservazione diretta che all'osservazione microscopica è stato possibile ascrivere la muffa isolata al genere *Fusarium* [9].

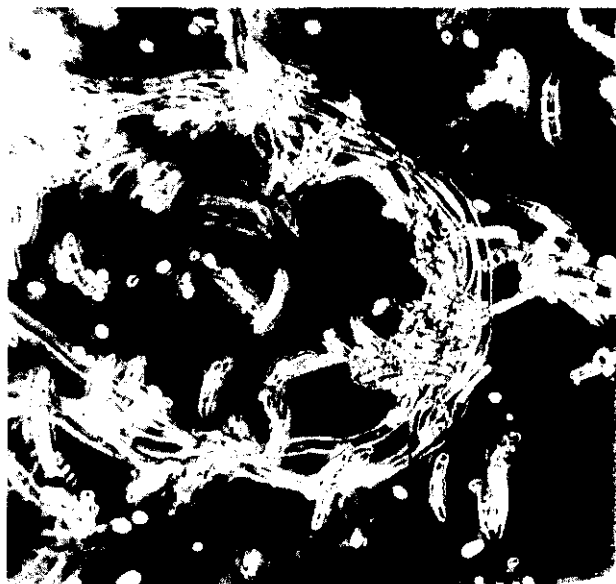


Fig. 1. — Iife di *Fusarium* sp. con macro- e microconidi (osservazione al microscopio a contrasto di fase 200x)

Prove di crescita della muffa isolata in presenza di emulsione oleosa. — Poiché *Fusarium sp.* è risultato capace di crescere in terreno minerale cui veniva aggiunta come unica fonte di carbonio e di energia l'emulsione oleosa utilizzata nell'imbozzimatura dei filati, si può ragionevolmente ipotizzare che lo sviluppo di tale muffa sui filati avvenga a spese dell'emulsione oleosa che li ricopre.

Determinazione CMI di biocidi. — Sono stati saggiati *in vitro* su *Fusarium sp.* sei biocidi scelti tra quelli più comunemente usati nelle lavorazioni industriali. I risultati ottenuti sono riassunti nella Tab. 1.

La muffa è risultata essere particolarmente sensibile all'attività biocida del Kathon 886 MW; sensibile sia pure in misura minore, al Troysan polyphase e scarsamente sensibile agli altri biocidi e precisamente in ordine decrescente a Desogen, Giv-Gard DXN, Myacide TF e Troysan 174.

Tabella 1. — Concentrazioni minime inibenti (CMI) dei biocidi saggiati su *Fusarium sp.*

Biocida	CMI in ppm	
	Prodotto commerciale	Principio attivo
Desogen	5000	500
Giv-Gard DXN	500	5
Kathon 886 MW	5	0,7
Myacide TF	3000	2910
Troysan 174	7000	7000
Troysan poliphase	100	40

Discussione

Nel corso delle ricerche è stata isolata come responsabile delle alterazioni prodotte su tessuto sintetico di nailon poliamidico una muffa identificata come *Fusarium sp.* (Fig. 1); tale eumicete, annoverato tra quelli ricorrenti nel deterioramento delle fibre naturali [10], non è mai stato descritto come responsabile nelle alterazioni delle fibre sintetiche.

Al microscopio ottico le fibre del tessuto appaiono modificate nel colore ma non danneggiate nella loro integrità. La conferma è stata fornita dal microscopio a scansione che ha consentito di evidenziare la presenza

delle ife solo sulla superficie delle fibre (Fig. 2). Inoltre, dalle prove di crescita eseguite, si è rilevato che *Fusarium sp.* è capace di svilupparsi in presenza della emulsione oleosa, utilizzata nella lavorazione dei filati, come unica fonte di carbonio e di energia. Si può quindi ritenere che lo sviluppo della muffa avvenga a spese delle sostanze oleose e non della fibra.

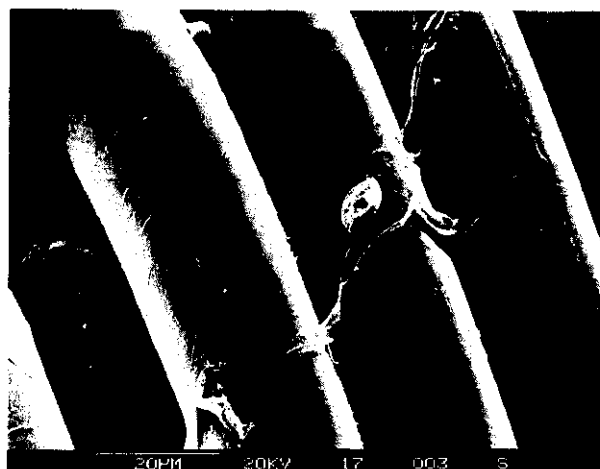


Fig. 2. — Fibre di nailon con ife di *Fusarium sp.* (osservazione al microscopio a scansione)

Queste osservazioni concordano con quanto riportato da altri Autori [10, 11] sulla non biodegradabilità delle fibre sintetiche, la cui struttura non trova riscontro nelle sostanze organiche naturali, benché, da altre ricerche [12, 13], risulterebbe invece che i polimeri sintetici possano subire l'attacco microbico.

Fusarium sp. è risultato essere particolarmente sensibile a 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one+2-metil-4-isotiazolin-3-one e, sia pure in misura minore, al 3-iodio-2-propinil butil carbammato. Tali prodotti tuttavia, a causa dei loro effetti allergici irritanti e sulla pelle e sugli occhi, possono essere utilizzati su scala industriale solo con grandi precauzioni. Per contro tra gli altri biocidi saggiati l' α -(p-tolil)-dodecil-trimetilammonio-ossimetilsolfato, pur avendo un'attività inferiore nei confronti della muffa deteriorante, presenta il vantaggio di non essere tossico per l'uomo.

Si ringraziano i dottori P. Sardi e S. Quaroni per l'assistenza al microscopio elettronico.

BIBLIOGRAFIA

1. TURNER, J. N. 1967. *The microbiology of fabricated materials*. J. & A. Churchill Ltd., London.
2. BERTRABET, S. M. 1976. Cellulosolysis of cotton fibre in Indian environment and cellulase enzyme. *Sci. Ind. Res.* 35: 152-162.

Ricevuto il 5 settembre 1983.

Accettato il 23 dicembre 1983.

3. CHOI, W. Y., HAGGETT, K. D., & DUNN, N. W. 1978. Isolation of a cotton wool degrading strain of *Cellulomonas*: mutants with altered ability to degrade cotton wool. *Aust. J. Biol. Sci.* 31: 553-564.
4. HOSOYA, H., MIYAZAKI, N., SUGISAKI, Y., TOKANASHI, E., TSURUFUJI, M., YAMASAKI, M. & TAMURA, G. 1978. Bacterial degradation of synthetic polymers and oligomers with special reference to the case of polyethylene glycol. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1545-1552.
5. KAPLAN, D. L., HARTENSTEIN, R. & SUTTER, J. 1979. Biodegradation of polystyrene, polymethyl metacrylate, and phenol formaldehyde. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 551-553.
6. IKURA, Y. & HORIKOSHI, K. 1977. Isolation and some properties of alkalophilic bacteria utilizing rayon waste. *Agric. Biol. Chem.* 41: 1373-1377.
7. SUI, R. G. H. 1951. *Microbial decomposition of cellulose*. Waverley Press, Baltimore.
8. RAYMOND, R. L. & DAVIS, J. B. 1960. Alkane utilization and lipid formation by *Nocardia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 8: 329-334.
9. BARNETT, H. L. 1960. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
10. HIGGINS, I. J. & BURNS, R. G. 1975. *The chemistry and microbiology of pollution*. Academic Press, London.
11. ALEXANDER, M. 1980. Microbial metabolism of chemicals of environmental concern. *ASM News* 46: 35-38.
12. RUBAN, G. I. & RENTOVA, Z. A. 1976. Microscopic fungi destroying plastic. *Mikol. Fitopatol.* 10: 190-195.

MIDDLE MOLECULES EVALUATION IN CHRONIC RENAL FAILURE DURING CONSERVATIVE TREATMENT

G. SEVERINI (a), S. CARTA (a), M. TACCONE-GALLUCCI (b), V. MAZZARELLA (c), A. IACONA (c),
G. MELONI (c) e C. U. CASCIANI (b)

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Istituto Tipizzazione Tissutale e Problemi della Dialisi, CNR, L'Aquila
(c) V Patologia Chirurgica, Policlinico Umberto I, Roma

Summary. — *The aim of this study is to detect the presence of middle molecules fraction and their possible connection with varying degrees of glomerular damage. Twenty four patients with chronic renal failure and ten normal control subjects were studied. The patients were divided into three groups according to serum creatinine levels. Chromatographic patterns show that the middle molecules peaks were present in the second group of patients with serum creatinine levels of 3.2-4.8 mg/dl. Using a single gel filtration with Biogel P₂ an excellent reproducibility of middle molecules range in all patients of each group was also found. The results suggest that in renal failure the middle molecule peaks appear when serum creatinine levels are higher than 3 mg/dl.*

Riassunto (Studio delle medio-molecole in pazienti con insufficienza renale cronica durante trattamento conservativo). — *Scopo del lavoro è stato quello di valutare qualitativamente, mediante una singola gel-filtrazione su colonna di Biogel P₂, la presenza di medio-molecole e la loro possibile correlazione con i livelli di creatinemia in pazienti con insufficienza renale cronica dovuta a varie patologie. Sono stati studiati 24 pazienti, divisi in tre gruppi, e 10 soggetti normali come controllo. I risultati hanno posto in evidenza come le medio-molecole appaiano già in pazienti con creatinina superiore a 3 mg/dl.*

Introduction

The middle molecules hypothesis [1] was developed in order to explain the clinical observation that patients on peritoneal dialysis did not develop neuropathy as readily as haemodialysis patients in spite of having a much lower weekly clearance of small molecules, such as urea and creatinine.

Several studies have shown that UV-absorbing solutes in the middle molecules range accumulate in severely uremic patients [2-5]. It has been demonstrated that such uremic patients, e.g. with pericarditis neuropathy, malnutrition and severe fluid retention, tend to have

high middle molecule peaks in spite of adequate dialysis. Instead patients free from uremic symptoms have low middle molecule peaks [6-7]. Bergstrom [8] suggested that the middle molecules production rate is probably lower in most dialysis patients than in non dialysed uremics, except when complications arise.

The aim of this study is to detect the presence of middle molecule fractions and their possible connection with varying degrees of glomerular damage (in patients with chronic renal failure of different aetiology and at varying creatinine concentration), using a single gel filtration with Biogel P₂.

Materials and methods

Twenty four patients (12 males and 12 females) with chronic renal failure of varying aetiology and 10 normal controls subjects were studied. Fasting serum samples were collected at -80°C for creatinine and middle molecules determinations. Creatinine was detected automatically with Technicon Autoanalyzer. The middle molecules fraction was separated on a column 0.9 x 200 cm using Biogel P₂. The serum was preliminarily subjected to ultrafiltration using an Amicon centriflo membrane (UM5), which has a molecular cut-off at approximately 5000 to prevent overloading of the column with protein which interferes with the system. After equilibration of the column with 0.005 M ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) pH 7.2, 0.5 ml of filtered plasma was added to the top of the column. The column was then eluted with the same buffer. The running time for a complete separation was 36 hrs. The absorption was measured at 206 nm and 280 nm simultaneously using a Uvicord 3 UV.

Results

Table I reports clinical data of 24 patients. The patients, similar in age and primary pathology, were divided into three groups according to serum creatinine

Table 1. — *Clinical data*

Group	Pt	Age/sex	Cr mg/dl	Diagnosis	Protein pos diet
I	FL	69/M	2.9	Vascular nephropathy	+
	CS	40/M	1.6	" "	-
	SM	58/F	1.8	" "	-
	RT	62/F	2.2	" "	+
	SC	59/M	2.7	" "	+
	RC	22/F	2.7	Chronic glomerulonephritis	+
	SR	32/M	1.7	" "	-
	CM	22/F	1.8	Systemic disease	-
II	MT	62/M	3.4	Vascular nephropathy	+
	RC	48/F	3.7	" "	+
	ST	38/F	4.1	" "	+
	RV	58/F	3.9	Chronic pyelonephritis	+
	NC	60/M	3.2	" "	+
	RD	46/F	4.5	" "	+
	GV	60/F	3.8	" "	+
	GL	26/F	4.8	Chronic glomerulonephritis	+
	SV	42/F	4.1	" "	+
	GC	65/M	3.4	Systemic disease	+
III	VS	33/F	7.0	Vascular nephropathy	+
	SN	58/M	9.0	" "	+
	TR	71/M	6.4	Chronic pyelonephritis	+
	SC	23/F	6.1	" "	+
	MM	38/F	6.9	Chronic glomerulonephritis	+
	RL	27/M	7.8	" "	+

levels. Except for four patients of the first group (serum creatinine levels < 2.0 mg/dl) all patients were on a low protein and low phosphorous diet. No patients showed either altered metabolic state or intercurrent pathology.

Fig. 1 shows the serum chromatographic patterns within the middle molecular range of a control group and three groups of patients. The patterns of all groups present a good reproducibility and omogeneity making it possible to show a single chromatographic pattern for each group. Group 1 (creatinine 1.5-3 mg/dl) presents only two peaks with no significant difference from the control group. In patients of group 2 (creatinine 3.2-4.2 mg/dl) there are more than two distinct peaks not detected in the control group. Group 3 (creatinine 6 mg/dl) exhibits a more complex pattern with many peaks within the middle molecular range, furthermore the amplitude of all the peaks is significantly higher than that of the other groups and of the control.

Discussion

Few studies have been done on the correlation between middle molecules concentration and chronic renal failure during conservative treatment. Bergstrom [8, 9] showed that the areas of the middle molecules peaks vary among patients independently of the plasma urea and creatinine concentration, and reached the conclusion that the middle molecules do not passively increase when the renal function decreases. In particular, measurable plasma peaks were only found when

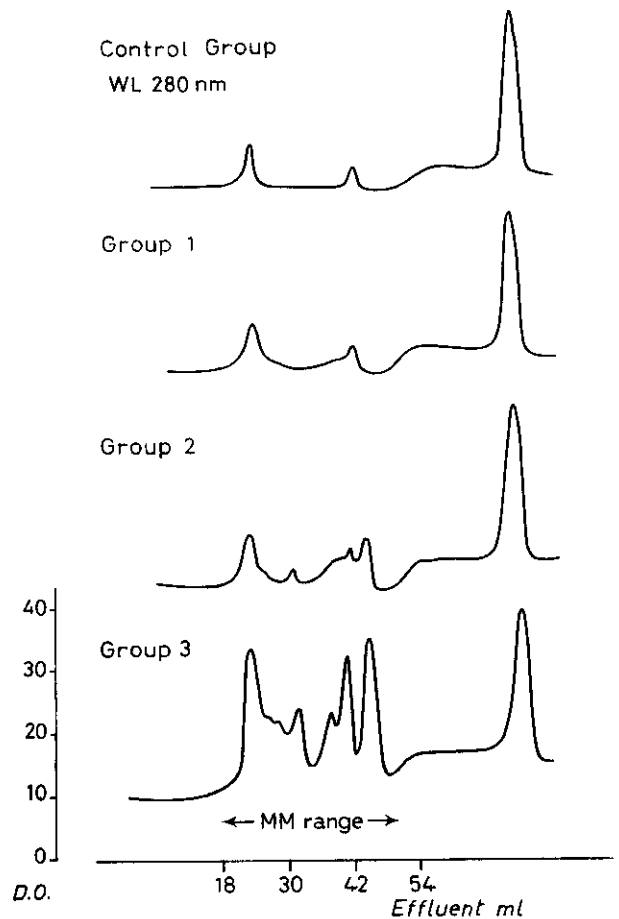


Fig. 1. — Serum chromatographic patterns within the middle molecular range of a control group and three groups of patients

plasma creatinine concentration was above 5 mg/dl.

In this study chromatographic patterns show that the middle molecules peaks were also present in patients with serum creatinine levels of 3.2-4.8 mg/dl. Moreover using a single gel filtration with Biogel P₂ an excellent reproducibility of the middle molecules range in all patients of each group was also found. The three groups are omogeneous for age, clinical condition and absence of intercurrent pathology or hypercatabolic state. Therefore the results suggest that

in chronic renal failure, the middle molecules peaks appear when serum creatinine levels are higher than 3 mg/dl, according to renal function decrease. These results are consistent with a recent study by J. Boudet and Coll. [10]. In chronic renal failure experimentally induced in male wistar rats, the authors concluded that the integrated absorbance of middle molecular fractions determined by gel chromatography on sephadex G 15 at 254 nm, was correlated with plasma creatinine concentration.

Ricevuto il 14 settembre 1983.

Accettato il 23 settembre 1983.

REFERENCES

1. BABB, A. L., FARREL, P. C., UVELLI, D. A. & SCRIBNER, B. H. 1972. Hemodialyzer evaluation by examination of solute molecular spectra. *Trans. Am. Artif. Int. Organs* 18: 98-103.
2. DALL'AGLIO, P., BUZIO, C., CAMBI, V., ARISI, L. & MIGONE, L. 1972. La rétention de moyennes molécules dans le sérum urémique. *Proc. Eur. Dial. Transplant Assoc.* 9: 409-504.
3. FURST, P., ZIMMERMAN, L. & BERGSTROM, J. 1976. Determination of endogenous middle molecules in normal and uremic body fluids. *Clin. Nephrol.* 5: 178-184.
4. GAJDOS, M. & DZURIK, R. 1973. Erythrocyte glycolysis in uremia: dynamic balance caused by the opposite action of various factors. *Int. Urol. Nephrol.* 5: 331-336.
5. MAN, N. K., TERLAIN, B., PARIS, J., WERNER, G., SAUSSE, A. & FUNK-BRENTANO, J. L. 1973. An approach to "middle molecules" identification in artificial kidney dialysate, with reference to neurophaty prevention. *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs* 19: 320-328.
6. BERGSTROM, J. & FURST, P. 1976. Uremic middle molecules. *Clin. Nephrol.* 5: 143-151.
7. MIGONE, L., DALL'AGLIO, P. & BUZIO, C. 1975. Middle molecules in uremic serum, urine and dialysis fluid. *Clin. Nephrol.* 3: 82-89.
8. ASABA, H., BERGSTROM J., FURST P., OULES R. & ZIMMERMAN, L. 1977. Accumulation and excretion of middle molecules. *Proc. Eur. Dial. Transplant Assoc.* 14: 481-488.
9. BERGSTROM, J. & FURST, P. 1978. Uremic toxins. In: *Replacement of renal function by dialysis*. Martinus Nijhoff Medical Division, The Hague. pp. 334-339.
10. BOUDET, J., MAN, N. K., CUEILLE, G., LEGRAIN, Y. & FUNK-BRENTANO, J. L. 1981. Relation between plasma concentration of middle molecular weight fraction and plasma creatinine in experimental chronic renal failure. *J. Art. Organs* 4: 334-341.

INDAGINI MICROBIOLOGICHE SU UN IMPIANTO DI DEPURAZIONE

L. VOLTERRA (a), F. AULICINO (a), G. A. ZAPPONI (b) e A. M. D'ANGELO (a)*

(a) Laboratorio di Igiene del Territorio; (b) Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Riassunto. — Coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali e batteri totali sono stati rilevati nei liquami di un impianto di depurazione a fanghi attivati. Si è evidenziato un diverso comportamento degli indicatori microbici di inquinamento fecale in ambiente diverso dal loro habitat naturale: si è confermata per gli streptococchi fecali una persistenza, in ambiente acquoso, più elevata di quella dimostrata dai coliformi fecali. L'abbattimento microbico è stato determinato sia nell'acqua all'uscita dell'impianto, sia nei liquami dell'entrata e dello stadio intermedio.

Summary (Microbiological analysis in a treatment plant). — Total coliforms, faecal coliforms, faecal streptococci and total plate counts were enumerated in wastewater of an activated sludge treatment plant. The microbial decays were determined either at the exit of the treatment plant or on water samples collected at the entrance and at the intermediate stage. The microbiological indicators of faecal pollution, have showed different behaviours in an environment different from their natural habitat: in fact, faecal streptococci have confirmed a higher resistance (than that typical of faecal coliforms in an aqueous environment).

Introduzione

Sono state effettuate, nell'arco di tre-quattro mesi, diverse serie di prelievi presso un impianto di depurazione, convogliante le acque di scarico di una zona di Roma.

L'impianto, oggetto della presente indagine, prevede un ciclo di trattamento per i fanghi ed uno per i liquami. Questi ultimi seguono le seguenti fasi: 1) trattamento preliminare: grigliatura, triturazione e dissabbiatura; 2) sedimentazione primaria; 3) aerazione; 4) sedimentazione finale; 5) clorazione dell'effluente (limitata solo nei casi di emergenza e previo controllo in laboratorio del contenuto di fenoli dell'effluente).

* Ospite del Laboratorio di Igiene del Territorio.

I campioni esaminati sono stati prelevati in entrata e in uscita dell'impianto di trattamento, nonché dopo la sedimentazione primaria. Gli scopi dell'indagine sono stati i seguenti:

a) rilevare quantitativamente, in un liquame di provenienza prevalentemente umana, i microrganismi indicatori di inquinamento fecale;

b) determinare l'abbattimento microbico nei vari punti di prelievo, per rilevare possibili differenze, tra i parametri microbiologici esaminati, nella resistenza alle fasi successive che fanno parte di un trattamento di depurazione;

c) valutare le condizioni igienico-sanitarie dell'effluente sversato.

Materiali e metodi

I campioni, raccolti in bottiglie sterili, sono stati trasportati in laboratorio con frigoriferi portatili ed esaminati, per i parametri sotto citati, dopo circa due ore dal prelievo. I microrganismi sono stati enumerati secondo il metodo di Miles Misra [1]. I terreni, le temperature ed i tempi di incubazione per ciascun microrganismo sono stati i seguenti:

Coliformi totali:	MacConkey agar (Oxoid CM 115) 37°C per 18-24 h.
Coliformi fecali:	MacConkey agar (Oxoid CM 115) 44°C per 18-24 h.
Streptococchi fecali:	m-Enterococcus agar (Difco 0746-01) 44°C per 18-24 h.
Conta batterica totale:	Plate Count agar (Oxoid CM 325) 22°C per una settimana.

Tutte le diluizioni sono state effettuate utilizzando tampone fosfato sterile pH 7,2 [2].

Risultati

Le tabelle 1-3 e 4 riportano i valori rilevati rispettivamente per i coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali e conta batterica totale. In tali tabelle

sono anche riportate le medie geometriche dei valori rilevati, insieme ai limiti di confidenza di tali medie, valutati in base all'ipotesi di distribuzione statistica log-normale dei dati (consistente con i dati stessi) [3].

In Tab. 5 sono riportate le percentuali di abbattimento batterico ai diversi punti di campionamento, sia relativamente ai valori medi sia relativamente ai valori singoli.

In Tab. 6 sono elencati i valori esponenti i rapporti tra coliformi fecali e streptococchi fecali, calcolati solo per il liquame in entrata. I dati così ottenuti mostrano come i liquami convogliati nell'impianto studiato

siano di origine prevalentemente umana. E' noto come il rapporto coliformi fecali/streptococchi fecali sia maggiore di 4 nelle feci umane e nei rifiuti domestici [4]. Tale rapporto diviene inferiore a 0,7 nel caso di inquinamento di origine animale (animali di allevamento, cani, gatti, roditori) o nel caso di apporto di acque piovane che dilavano le superfici stradali dove sono abbondanti gli escrementi animali [5].

Nel liquame in entrata all'impianto i microrganismi più numerosi sono gli eterotrofi, rilevabili con la conta batterica totale ($10^7 \cdot 10^{11} / 100$ ml di liquame), seguiti, in ordine decrescente, dai coliformi totali ($10^6 \cdot 10^8 / 100$

Tabella 1. — Coliformi totali ($n/100$ ml $\times 10^{-4}$) enumerati nel liquame: all'entrata (E), all'uscita della vasca di sedimentazione primaria (I) e all'uscita dell'impianto di depurazione (U)

Campione N°	E	I	U
1	7.250	4.700	480
2	10.000	6.480	1.000
3	1.050	1.570	200
4	3.210	7.090	100
5	20.000	580	840
6	4.790	1.400	490
7	30.000	20.000	2.070
8	7.070	6.670	450
9	9.200	10.000	90
10	8.670	10.000	210
11	3.870	3.500	2
12	2.520	520	45
13	760	920	19
Media geometrica	$5,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$
Limiti di confidenza	$(2,8 \times 10^3 \div 1,0 \times 10^4)$	$(1,6 \times 10^3 \div 6,8 \times 10^3)$	$(5,6 \times 10^1 \div 5,4 \times 10^2)$

Tabella 2. — Coliformi fecali ($n/100$ ml $\times 10^{-4}$) enumerati nel liquame: all'entrata (E), all'uscita della vasca di sedimentazione primaria (I), e all'uscita dell'impianto di depurazione (U)

Campione N°	E	I	U
1	620	500	30
2	530	380	30
3	130	390	20
4	1.290	510	40
5	410	50	40
6	1.920	1.930	840
7	3.210	1.810	200
8	1.130	880	140
9	620	650	20
10	2.000	1.540	30
11	1.170	900	40
12	210	260	7
13	530	1.150	10
Media geometrica	$7,5 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$	$4,2 \times 10^1$
Limiti di confidenza	$(4,3 \times 10^2 \div 1,3 \times 10^3)$	$(3,3 \times 10^2 \div 1,1 \times 10^3)$	$(1,9 \times 10^1 \div 9,0 \times 10^1)$

Tabella 3. — *Streptococchi fecali* ($n/100 \text{ ml} \times 10^{-4}$) enumerati nel liquame: all'entrata (E), all'uscita della vasca di sedimentazione primaria (I) e all'uscita dell'impianto di depurazione (U)

Campione N°	E	I	U
1	210	120	30
2	350	100	35
3	9	30	4
4	20	50	3
5	40	5	5
6	140	90	70
7	100	100	3
8	180	90	3
9	10	8	1
10	120	50	3
11	50	1	1
12	30	30	1
13	90	30	1
Media geometrica	$6,2 \times 10^1$	$3,1 \times 10^1$	4,2
Limiti di confidenza	$(3,0 \times 10^1 \div 1,3 \times 10^2)$	$(1,3 \times 10^1 \div 7,4 \times 10^1)$	$(1,8 \div 1,0 \times 10^1)$

Tabella 4. — *Conta batterica totale* a 22° C ($n/100 \text{ ml} \times 10^{-6}$) effettuata sul liquame: all'entrata (E), all'uscita della vasca di sedimentazione primaria (I), e all'uscita dell'impianto di depurazione (U)

Campione N°	E	I	U
1	500.000	2.000	500
2	30.000	1.500	180
3	250	70	12
4	90	200	3
5	200	6	10
6	1.100	600	8
7	5.000	1.600	100
8	1.100	1.400	20
9	500	700	7
10	300	1.100	14
11	1.100	500	15
12	200	90	1
13	220	80	5
Media geometrica	$1,1 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$
Limiti di confidenza	$(2,5 \times 10^2 \div 4,7 \times 10^3)$	$(1,2 \times 10^2 \div 9,7 \times 10^2)$	$(5,7 \div 4,4 \times 10^1)$

ml), coliformi fecali ($10^6-10^7/100 \text{ ml}$) e streptococchi fecali ($10^4-10^6/100 \text{ ml}$). Nei campioni in uscita dall'impianto tale andamento viene mantenuto, pur verificandosi una riduzione di carica per ciascun parametro (Tabelle 1-4). Le variazioni di contenuto di indicatori di contaminazione microbiologica misurate tra l'ingresso dell'impianto e la vasca di sedimentazione primaria non raggiungono il livello di significatività statistica (test di Wilcoxon per dati appaiati) [6], né sussistono differenze significative tra le percentuali di abbattimento relative ai singoli indicatori. E' invece immediatamente evidenziabile un decremento altamente significativo ($p < 0,002$)

tra ingresso ed uscita dell'impianto e tra vasca di sedimentazione primaria ed uscita dell'impianto ($p < 0,002$). Infatti, anche se tra i campionamenti operati in giorni diversi la variabilità è molto elevata (in relazione anche alla variabilità delle caratteristiche dell'acqua in ingresso), all'interno di ogni campionamento è rilevabile un sistematico decremento tra valori misurati in ingresso (E) e all'uscita dell'impianto (U), e tra i valori misurati all'uscita della vasca di sedimentazione primaria (I) ed all'uscita dell'impianto (U). L'analisi dei dati attraverso il test di Wilcoxon per dati appaiati ha consentito di verificare la significatività di questo decremento, non

Tabella 5. — Percentuali di decadimento batterico. CT = Coliformi totali; CF = Coliformi fecali; SF = Streptococchi fecali; BE = Batteri eterotrofi; E = liquame in entrata all'impianto; I = liquame in uscita dalla vasca di sedimentazione primaria; U = liquame in uscita dall'impianto

Campione N°	E → I				I → U				E → U			
	CT	CF	SF	BE	CT	CF	SF	BE	CT	CF	SF	BE
1	35,2	19,3	42,8	99,6	89,8	94,0	75,0	75,0	93,4	95,2	85,7	99,9
2	35,2	28,3	71,4	95,0	84,6	92,1	65,0	88,0	90,0	94,3	90,0	99,4
3	49,5	<u>200,0</u>	<u>233,3</u>	72,0	87,2	94,8	86,6	82,8	80,9	84,6	55,5	95,2
4	<u>120,8</u>	60,4	<u>150,0</u>	<u>122,0</u>	98,5	92,1	94,0	98,5	96,9	96,8	85,0	96,7
5	97,1	87,8	87,5	97,0	44,8	20,0	0,0	66,0	95,8	90,2	87,5	95,0
6	70,7	0,5	35,7	45,4	65,0	56,4	22,2	98,6	89,8	56,2	50,0	99,3
7	33,3	43,6	0,0	68,0	89,6	88,9	97,0	93,7	93,1	93,7	97,0	98,0
8	5,6	22,1	50,0	27,0	93,2	84,1	96,6	98,6	93,6	87,6	98,3	98,1
9	8,6	4,8	20,0	40,0	99,1	96,9	100,0	99,0	99,0	96,7	100,0	98,6
10	15,3	23,0	58,3	<u>266,7</u>	97,9	98,1	94,0	98,7	97,6	98,5	97,5	95,3
11	9,5	23,1	100,0	54,5	99,9	95,5	0,0	97,0	99,9	96,5	100,0	98,6
12	79,3	23,8	0,0	55,0	91,3	97,3	96,6	98,8	98,2	96,6	96,6	99,5
13	21,0	<u>116,9</u>	66,6	63,6	97,9	99,1	96,6	93,7	97,5	98,1	98,8	97,7
Media	11,6	2,9	11,5	8,0	80,7	85,3	71,0	91,4	94,3	91,2	87,8	97,8

Sono state sottolineate le percentuali attestanti un incremento batterico, anziché il normale e prevedibile abbattimento.

Tabella 6. — Coliformi fecali: streptococchi fecali nel liquame in entrata all'impianto di depurazione

Campione N°	Coliformi fecali/ Streptococchi fecali
1	2,95
2	1,50
3	14,40
4	64,50
5	10,25
6	13,70
7	32,00
8	6,20
9	62,00
10	16,60
11	23,40
12	7,00
13	5,80
Media	10,20

immediatamente evidenziabile attraverso un semplice confronto tra medie. La riduzione del contenuto di indicatori appare pertanto aver luogo essenzialmente a questo ultimo stadio.

Gli abbattimenti dei diversi indicatori rilevati nei successivi campionamenti risultano intercorrelati, sia tra ingresso ed uscita ($p < 0,02$), che tra ingresso e vasca di sedimentazione primaria ($p < 0,05$) e quest'ultima e l'uscita dell'impianto ($p < 0,01$) (test del coefficiente di concordanza di Kendall) [6], indicando

una sostanziale unità del fenomeno in esame ed una omogenità degli andamenti dei diversi indicatori. L'entità degli abbattimenti non è tuttavia sempre la stessa: è rilevabile una maggiore persistenza degli streptococchi fecali rispetto a quella dei coliformi fecali ($p < 0,025$) tra la vasca di sedimentazione ed uscita dell'impianto.

Discussione

Una volta scaricati in ambiente acquoso, i coliformi fecali possono moltiplicarsi anche in misura elevata se le acque riceventi contengono quantità appropriate di sostanze organiche nutrienti e se la temperatura è favorevole [7]. Nella vasca di sedimentazione primaria, infatti, talvolta si verificano incrementi anche molto notevoli (200%), soprattutto a carico dei coliformi fecali probabilmente a causa dell'instaurarsi di condizioni ambientali favorevoli lo sviluppo di questa particolare flora microbica. Analoghi fenomeni di incremento (81% e 290%) a carico di coliformi fecali, nella vasca di Imhoff, sono stati registrati nel caso di una indagine simile svolta in un altro impianto di depurazione. E' interessante che il dato trovi conferma anche seguendo metodi di analisi diversi. Infatti, in questo caso, l'enumerazione dei coliformi è avvenuta con metodica dei tubi multipli [8]. Gli streptococchi fecali in ambienti diversi dal loro habitat naturale raramente si moltiplicano, ma la loro persistenza è elevata [7].

Le percentuali di decadimento batterico all'uscita dell'impianto (94% per i coliformi totali, 91% per i coliformi fecali, 87% per gli streptococchi fecali e

98 % per i batteri eterotrofi) sono abbastanza elevate, ma l'immissione di contaminanti microbiologici nel corpo idrico ricevente avviene in misura piuttosto massiccia (Tabelle 1-4). E' chiaro, quindi, come un costante sversamento di acque così contaminate, pur se depurate, possa comportare un decadimento della qualità delle acque riceventi. Resta comunque da considerare l'uso che si intende fare del corpo idrico rice-

vente. Nel caso in questione l'effluente dell'impianto di trattamento grava sulla parte terminale di un fiume, le cui acque, già abbastanza degradate, prima dello sversamento, oltre a non essere utilizzate per scopi potabili, non hanno alcuna altra destinazione.

Ricevuto l'8 ottobre 1983.

Accettato il 15 dicembre 1983.

BIBLIOGRAFIA

1. MILES, A. A. & MISRA, S. S. 1938. The estimation of bacterial power of the blood. *J. Hyg. Cambridge* 38: 732.
2. *Guidelines for related monitoring of coastal water quality*. 1977. WHO Coordinated Mediterranean Pollution Monitoring and Research Programme, Copenhagen.
3. GELDREICH, E. E. 1975. Microbiological criteria concepts for coastal bathing waters. *Ocean Manage.* 3: 225-248.
4. FEACHEM, R. 1975. An improved role for faecal coliforms to faecal streptococci ratio in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res.* 9: 689-690.
5. MARA, D. D. 1974. *Bacteriology for sanitary engineers*. Churchill, Livingstone.
6. SIEGEL, S. 1966. *Statistica non parametrica*. Ed. O/S, Firenze.
7. BERG, G. 1978. *Indicators of viruses in water and food*. Ann Arbor (Michigan), Ann Arbor Science.
8. SPINELLI, P. *Comunicazione personale*.