

La contaminazione delle acque superficiali e gli indicatori microbiologici

Francesca Anna AULICINO (a), Marina MARRANZANO (b) e Luisa MAURO (b)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica "G.F. Ingrassia", Università degli Studi, Catania

Riassunto. - Le acque superficiali, se utilizzate a scopo potabile, devono essere sottoposte ad approfondite rilevazioni della loro qualità. La loro contaminazione con acque luride trattate, non trattate o parzialmente trattate può rappresentare un rischio per la salute umana. La maggior parte delle infezioni di origine idrica è conseguente alla ingestione di acqua contaminata ma si può verificare anche a seguito di contatto o inalazione. Nei paesi industrializzati gli episodi epidemici sono legati, soprattutto, alla diffusione di nuovi agenti o al riconoscimento di nuove infezioni (*Arcobacter*, *Norovirus*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, ecc.). Per l'accertamento della qualità microbiologica degli ambienti idrici secondo le più recenti normative si ricorre alla scelta di indicatori che in funzione del ruolo assunto possono essere distinti in tre gruppi: indicatori di contaminazione fecale, indicatori di processo, organismi indice o modello. Non esiste un unico organismo che possa essere scelto come indicatore delle diverse condizioni degli ambienti idrici. Occorre operare una scelta accurata in funzione di cosa si vuole valutare.

Parole chiave: acque superficiali, contaminazione microbiologica, *Escherichia coli*, enterococchi, indicatori di contaminazione fecale, organismi indice, indicatori di processo.

Summary (*Surface water pollution and microbiological indicators*). - Surface waters must undergo careful quality assessment before being used as drinking water. Contamination with wastewaters, whether treated, untreated or partially treated, is a risk to public health. Most waterborne infections are caused by ingestion of contaminated water, but contact or inhalation also represent a risk. In industrialized countries, epidemic episodes are mainly due to the spread of new agents or newly identified infections (*Arcobacter*, *Norovirus*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, etc.). To determine the microbial quality of water environments, the latest regulations identify three different groups of indicators according to their contaminating role: faecal, processing, and model or index organisms. No single organism is an adequate indicator of the diverse conditions of water environments. Thus, it is necessary to accurately identify specific indicators.

Key words: surface waters, microbiological contamination, *Escherichia coli*, enterococci, index organism, process indicator.

Introduzione

Le acque dolci superficiali fanno parte di due diversi sistemi, quello degli invasi naturali e artificiali (sistemi lentic) e quello delle acque correnti come i fiumi e altri corsi d'acqua (sistemi lotici). Il fluire dell'acqua, caratteristico dei corsi d'acqua, assicura ai microrganismi presenti il rifornimento continuo di nutrienti disciolti, di ossigeno e di carbonio organico limitando fortemente l'instaurarsi di comunità di tipo planctonico. I sistemi dominanti in questi ambienti sono quelli bentonici (sedimenti e biofilm)

diversamente dagli ambienti lacustri, in cui la colonna d'acqua supporta comunità planctoniche costituite da batteri, fitoplancton e zooplancton. I corsi d'acqua sono intimamente e direttamente connessi con il mondo terrestre con input continui di composti organici ed inorganici e di microrganismi provenienti dalle acque di dilavamento dei terreni limitrofi ai bacini di drenaggio o da acque di invasi. La velocità del flusso dell'acqua nei sistemi lotici varia periodicamente con marcate fluttuazioni sia nel livello dell'acqua che nella velocità della corrente e le concentrazioni del materiale particolato e disciolto proveniente dal bacino

imbrifero seguono queste fluttuazioni. La connessione al territorio ha conseguenze importanti sulla qualità di questi ambienti idrici che possono albergare sia flora autoctona che alloctona, in misura maggiore o minore, a seconda del succedersi e dell'intensità dei fenomeni meteorologici, ma anche della presenza o meno di scarichi o di altri fattori di pressione [1].

I sistemi lacustri sono sottoposti a variazioni periodiche giornaliere (temperature, illuminazione) e a variazioni periodiche stagionali (variazioni climatiche). La composizione delle acque dei laghi e, in particolare, dei laghi artificiali varia anche in senso verticale, cioè dalla superficie al fondo, ed i profili delle concentrazioni dei vari parametri alle varie quote sono importanti elementi di valutazione della qualità delle acque. La presenza di materiali organici deriva sia dagli apporti dell'affluente ma anche dai sistemi biologici (fitoplancton, zooplancton, vegetali, macrofite, pesci, ecc.) presenti nel corpo idrico. In conseguenza del periodo di permanenza e della bassa velocità dell'acqua nei laghi sono favoriti i fenomeni di sedimentazione e la torbidità residua è costituita da particellato fine soprattutto di origine colloidale. La flora microbica tende naturalmente a dare origine a fenomeni di aggregazione e di adsorbimento al materiale particolato e alle superfici solide. Le aggregazioni microbiche sono processi complessi con diverse interazioni di tipo fisico, chimico e biologico. In questi fenomeni un ruolo determinante è assunto dalle sostanze polimeriche extracellulari della flora microbica formate da polisaccaridi, aminoacidi e altri costituenti come acetati, piruvati e succinati. È così che i detriti e i materiali inorganici ed organici, di cui sono costituiti i sedimenti, si arricchiscono di microrganismi che possono essere considerati come particelle colloidali caratterizzate da una densità leggermente superiore a quella dell'acqua [2]. I sedimenti rappresentano ambienti ideali di sopravvivenza per i microrganismi che in determinate situazioni ambientali possono andare incontro a fenomeni di replicazione. I fenomeni di sedimentazione favoriscono la chiarificazione delle acque e, quindi, l'allontanamento di contaminanti microbici adsorbiti al materiale particellato. Da considerare che fenomeni di risospensione dei sedimenti possono essere causa di ricontaminazione di ambienti idrici.

I corpi idrici superficiali rappresentano risorse preziosissime per la popolazione per le molteplici funzioni a loro proprie; tra esse, quelle assunte come corpi recettori di escreti umani ed animali e come risorse idriche destinate ad uso potabile. In funzione di corpi ricettori di rifiuti urbani, rurali ed industriali i fiumi e gli invasi consentono l'allontanamento dagli agglomerati umani ed animali di matrici che possono costituire un rischio, anche rilevante, per la salute pubblica. L'utilizzo di corpi idrici superficiali come

ricettori di liquami trattati o non trattati ha come conseguenza la modifica della qualità dell'acqua di questi ambienti a causa della presenza di microrganismi come virus, batteri e protozoi. Gli invasi naturali e artificiali, rispetto ai corsi d'acqua, a causa della maggiore profondità e del più lento tasso di ricambio dell'acqua sono caratterizzati da una maggiore suscettibilità alla contaminazione. Un completo ricambio dell'acqua di un lago, ad esempio, può avvenire in un periodo variabile da 10 a 100 e più anni. C'è inoltre da considerare il problema dei sedimenti, che soprattutto in ambienti idrici come i laghi, subiscono fenomeni di accumulo e di rilascio continui. L'altra importante funzione dei corpi idrici superficiali è quella di risorsa destinata ad approvvigionamento potabile. Se ad essere utilizzate come fonti di acqua potabile sono acque superficiali correnti, in considerazione della variabilità nella composizione molto più elevata rispetto a quella dei laghi, esse devono essere sottoposte ad approfondite rilevazioni della loro qualità. Proprio per problemi connessi alla loro variabilità di composizione e alla conseguente necessità di doverle sottoporre trattamenti, talora, molto spinti, c'è la tendenza a non utilizzare acque correnti direttamente a scopo potabile, a meno che non si tratti di fiumi di notevole portata. Nel caso della disponibilità di risorse idriche di questo tipo si tende a ricorrere ad opere accessorie (bacini di equalizzazione o pozzi riparali) che rendono più costanti le caratteristiche dell'acqua da potabilizzare. È stato stimato che nel 2025 circa un terzo della popolazione mondiale soffrirà di carenza cronica di acqua potabile, in particolare, la prossima generazione potrà disporre di circa un terzo dell'acqua che è stata disponibile negli ultimi 30 anni. Ci sono, quindi, problemi di progressiva diminuzione di disponibilità di acqua consona all'utilizzo umano. Le risorse idriche di qualità accettabile stanno sempre più riducendosi per effetto della scarsa attenzione alla loro protezione. Attualmente solo il 20% circa delle acque distribuite in Italia attinge da acque superficiali, costituendo una percentuale piuttosto limitata rispetto a quelle sotterranee. Da considerare, comunque, che per alcune regioni come Sardegna, Calabria e Puglia le percentuali di acque superficiali utilizzate come fonti di acque potabili sono piuttosto elevate (superiori al 50%) [3]. Inoltre, la crescente richiesta di acqua potabile sempre di più spinge verso l'utilizzo di risorse idriche superficiali. I problemi connessi all'uso di queste acque sono molteplici e soprattutto legati ai trattamenti, talora spinti, cui devono essere sottoposte in virtù del fatto che le concentrazioni di microrganismi inquinanti e di materiale in sospensione di natura organica e inorganica sono generalmente piuttosto elevate e che le loro caratteristiche variano nel tempo, considerato che i carichi inquinanti provenienti dall'azione antropica hanno una diffusione spaziale e temporale piuttosto variabile.

Contaminazione microbiologica delle acque superficiali: i microrganismi e le affezioni conseguenti

Corpi idrici superficiali contaminati per effetto dello sversamento di acque luride trattate, non trattate o parzialmente trattate possono rappresentare un rischio per la salute umana, rischio connesso alla presenza di microrganismi patogeni ed opportunisti.

La maggior parte delle affezioni microbiche di origine idrica è conseguente alla ingestione di acqua contaminata ma vi sono affezioni conseguenti anche al contatto dell'acqua contaminata con differenti distretti dell'organismo (es. apparato respiratorio, pelle, mucose). Nella Tab. 1 sono elencati i principali microrganismi patogeni e opportunisti responsabili di affezioni conseguenti a ingestione, contatto e inalazione di acque contaminate e quelle specie microbiche o gruppi per i quali sono stati accertati eventi epidemici [4-11].

Nonostante l'enorme importanza di conoscere la reale incidenza delle malattie di origine idrica nei diversi territori, i dati di cui oggi si dispone riguardo al nostro territorio ma anche a quello europeo sono scarsi per la mancanza di un adeguato sistema di sorveglianza. Dati organizzati sono disponibili solo per il Regno Unito e gli Stati Uniti d'America. Negli Stati Uniti dal 1971, il Center for Disease Control and Prevention (CDC), l'Environmental Protection Agency (EPA) e il Council of State Territorial Epidemiologists (CSTE) collaborano per l'organizzazione e il funzionamento di un sistema di sorveglianza per la rilevazione di epidemie di origine idrica con pubblicazioni periodiche dei dati raccolti [12-16]. In Tab. 2 sono riportate le epidemie di origine idrica, dovute all'assunzione di acqua potabile contaminata e registrate negli Stati Uniti e in Inghilterra e Galles dal 1911-1920 fino al 1998 [4, 15]. È possibile osservare come in ambedue i paesi il numero di queste epidemie non abbia mostrato tendenza alla diminuzione e come gli eventi epidemici nei decenni più recenti siano correlati ad agenti eziologici nuovi, definiti *emergenti*. I dati riportati nella Tab. 2 evidenziano nel periodo intercorrente tra gli anni '40 e gli anni '70 una flessione degli eventi epidemici di origine idrica e/o del numero degli individui coinvolti rispetto al periodo 1911-1940. La maggior parte degli episodi epidemici nei due paesi fino agli anni '70 risulta imputabile soprattutto a malattie come tifo e paratifo e a dissenterie bacillari (ad es. shigellosi) [4]. Dopo gli anni '70 si nota una forte riduzione delle infezioni tifoidi. Al declino di queste malattie conseguente a trattamenti adeguati delle acque e alla diminuzione della circolazione dei relativi patogeni nella popolazione si sostituiscono patologie di natura soprattutto virale e protozoaria (Tab. 2). Nel periodo dal 1971 al 1998 si registra un incremento delle epidemie con il coinvolgimento, rispettivamente,

di 7520 e 569934 individui [4, 12-15]. L'incremento di casi di criptosporidiosi si fa risalire all'acquisita capacità di diagnosticare infezioni di questo tipo in precedenza non diagnosticabili, oltre alla resistenza del *Cryptosporidium* ai trattamenti di disinfezione.

La pubblicazione periodica degli eventi epidemici negli Stati Uniti, che avviene regolarmente dal 1971, fornisce un quadro aggiornato dei gruppi microbici di maggiore interesse in relazione alle malattie a trasmissione idrica [12-16]. Nel periodo 1992-2000, ad esempio, sono state registrate 144 epidemie connesse all'utilizzo di acque destinate al consumo umano con il coinvolgimento di circa 30 000 persone. Nello stesso periodo va segnalata la nota epidemia di *Cryptosporidium* derivata dall'uso di acqua superficiale contaminata ed avvenuta a Milwaukee nel 1993 con il coinvolgimento di 429 103 individui, di cui 440 ospedalizzati e 100 morti [13, 17].

La maggior parte degli episodi epidemici sono legati a patologie emergenti, cioè quelle la cui incidenza risulta aumentata nelle due decadi precedenti o per le quali si prevede un aumento dell'incidenza nel futuro prossimo [18]. Le infezioni emergenti sono legate alla diffusione di nuovi agenti, ma anche al riconoscimento di infezioni prima non identificate o al riconoscimento della natura microbica di alcune malattie. Le infezioni emergenti comprendono le riemergenti, che sono quelle affezioni che riappaiono dopo un periodo di declino della loro incidenza [18]. Le indicazioni più recenti riportano come *emergenti*, in relazione alle malattie idrotrasmesse, le seguenti specie batteriche: *Arcobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O139. Per quanto riguarda i virus enterici ed i protozoi quelli attualmente considerati emergenti sono: Adenovirus, Astrovirus, Coxsackievirus, Hepatitis E virus, Norwalk virus e Calicivirus, Rotavirus, *Cyclospora caytanensis*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Microsporidi, *Toxoplasma gondii* [19].

Un ruolo molto importante tra i patogeni emergenti è svolto dalla *Legionella pneumophila*. Patogeno opportunistico descritto per la prima volta nel 1976 (Tab. 1) è presente in ambienti ricchi di sostanza organica soprattutto acquiferi superficiali e acque termali. La sua propagazione avviene per aerosol o attraverso ferite, non per ingestione diretta di acqua contaminata. *Legionella* rappresenta un pericolo non trascurabile per la popolazione ospedalizzata. Nel nostro territorio ha fatto registrare nel corso degli ultimi anni diversi casi di affezioni soprattutto a carico di individui ospedalizzati. Al genere *Legionella* appartengono circa 40 specie di cui 12 sono patogene per l'uomo. I quadri morbosi legati all'infezione da *Legionella* sono diversi, si passa dalla malattia multisistemica, che culmina con la polmonite, ad altri tipi di patologie, tra cui quella

Tabella 1. - Microrganismi presenti in acque superficiali e connessi ad affezioni per ingestione o contatto con acqua contaminata [4-10]

Microrganismi	Tipo di affezione	Note
<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. caviae</i>	Gastroenteriti, infezioni di ferite	Ingestione, contatto
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. upsaliensis</i>	Gastroenterite	Ingestione (epidemie)
<i>Escherichia coli</i> enteropatogena (EPEC), <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC), <i>E. coli</i> enteroaggregante (EAaggEC)	Gastroenteriti, diarree persistenti	Ingestione
<i>E. coli</i> enteroemorragica (EHEC) (O157/H7)	Colite emorragica e sindromi renali emolitiche	Ingestione (epidemie*)
<i>E. coli</i> enterotossigena (ETEC)	Gastroenteriti	Ingestione (epidemie)
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Gastroenterite tossigene	Ingestione
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	Ingestione, contatto, inalazione (epidemie)
<i>Klebsiella</i> spp	Gastroenteriti in infezioni miste	Ingestione
<i>Leptospira interrogans</i> , <i>L. pamona</i> , <i>L. icterohemorrhagiae</i> , <i>L. australis</i>	Leptospirosi	Contatto (epidemie*)
<i>Legionella bozemanai</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>L. spp</i>	Legionellosi, febbre di Pontiac	Inalazione (epidemie*)
<i>Mycobacterium marinum</i>	Infezione di ferite (granuloma da piscine)	Contatto (epidemie*)
<i>Mycobacterium avium</i> Complex	Affezioni respiratorie, diarree	Ingestione, Inalazione (epidemie*)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Gastroenterite dissenteria	Ingestione (1 epidemia)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Follicoliti, otiti, congiuntiviti	Contatto (epidemie*)
<i>Salmonella cholerae-suis</i> (<i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhi</i>)	Tifo, gastroenterite	Ingestione (epidemie*)
<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Sh. sonney</i> , <i>Sh. spp</i>	Dissenteria emorragica, gastroenteriti	Ingestione (epidemie*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infezioni di ferite	Contatto
<i>Vibrio cholerae</i>	Colera, gastroenterite	Ingestione (epidemie)
<i>V. vulnificus</i>	Setticemie e gastroenteriti, infezioni di ferite	Ingestione, contatto
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteriti	Ingestione
Adenovirus	Diarree, faringo congiuntiviti	Ingestione, contatto, inalazione
Astrovirus, Calicivirus e Coronavirus	Gastroenteriti	Ingestione
Enterovirus (Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus, Enterovirus-sierotipo 68-71)	Gastroenteriti, poliomielite, meningiti, miocarditi	Ingestione (epidemie)
Hepatitis A virus,	Epatite	Ingestione (epidemie*)
Hepatitis E virus	Epatite	Ingestione (epidemie)
Norwalk virus, Norovirus	Gastroenteriti	Ingestione (epidemie*)
Rotavirus	Gastroenteriti	Ingestione (epidemie)
<i>Balantidium coli</i>	Balantidiasi	Ingestione
<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cr. hominis</i> , <i>Cr. spp</i>	Criptosporidiasi	Ingestione (epidemie*)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Ciclosporidiasi	Ingestione (epidemie*)
<i>Giardia intestinalis</i>	Gastroenterite	Ingestione (epidemie*)
<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalite amebica primaria	Inalazione (epidemie*)

* Epidemie connesse anche alle acque destinate ad uso ricreazionale.

che simula l'influenza (febbre di Pontiac) ed altre come pielonefriti, endocarditi, infezioni di ferite, ecc. [8, 20].

Escherichia coli O157:H7 (Tab. 1) è un ceppo riconosciuto negli anni '80 come produttore di due potenti tossine. Causa gastroenteriti emorragiche che, nel 15% dei casi, evolvono in sindromi uremiche emolitiche anche fatali. Le epidemie sono connesse al consumo di cibi contaminati (carni, succhi di frutta, prodotti freschi), al contagio interpersonale e al consumo di acqua [7, 8]. Nell'epidemia avvenuta a Walkerton in Ontario (Canada) nel 2000 e dovuta al consumo di acqua potabile contaminata sono state coinvolte 1338 persone con 7 morti [21]. In USA sono state registrate diverse epidemie di origine idrica da *Escherichia coli O157:H7*, tra esse, una con 243 casi, verificatasi in una comunità del Missouri ed un'altra, con 80 soggetti, conseguente alla qualità dell'acqua di balneazione di un lago dell'Oregon [7, 12, 22].

Enteriti da specie antropozootiche batteriche come *Campylobacter* spp., *Campylobacter coli*, ecc. sono state riconosciute a partire dal 1977. Nell'epidemia di Walkerton (Ontario), dovuta ad *Escherichia coli O157:H7* presente nell'acqua potabile, fu anche rilevato *Campylobacter* [21]. Le enteriti da *Campylobacter*, attualmente in UK, sono anche più numerose di quelle imputabili a *Salmonella* [7].

Altri gruppi di microrganismi sono stati riconosciuti responsabili di affezioni idrotrasmissibili e la loro presenza negli ambienti idrici è ritenuta rischiosa per la salute. Tra essi i micobatteri e *pseudomonas*, che sono opportunisti patogeni [8]. I membri del gruppo *Mycobacterium avium Complex* (MAC) (Tab.1), in particolare *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*, si trasmettono per inalazione e ingestione sia di acqua potabile che di acqua ad uso ricreazionale e possono produrre affezioni polmonari, soprattutto in

malati di AIDS, ma anche sintomi tipici di gastroenteriti (vomito, nausea e diarrea) [7, 23]. Altri batteri, come *Aeromonas hydrophila* possono acquisire la potenzialità di produrre enterotossine e causare gastroenteriti. *Arcobacter* è risultato causa di diarree conseguenti ad infezioni di origine idrica [19]. *Pseudomonas aeruginosa* è un opportunisto patogeno capace di adattarsi a svariate condizioni ambientali e, pertanto, è molto diffuso in tutti gli ambienti idrici, comprese le acque superficiali ed i sedimenti, nei quali si trova preferenzialmente adsorbito, per le sue ottime capacità di colonizzatore. È associato ad infezioni nosocomiali e la sua resistenza agli antibiotici rende problematico il trattamento delle infezioni di cui è responsabile [7, 8]. Sono suscettibili soprattutto i bambini e le persone anziane. Le affezioni più frequenti sono a carico della pelle (follicoliti) e dell'orecchio (otite dell'orecchio esterno). Le follicoliti sono le affezioni epidemiche più diffuse da contatto con acque ricreazionali trattate [9, 12-16]. *Ps. aeruginosa* è causa del 70% delle otiti esterne nei nuotatori, sia in connessione all'uso di acque trattate (piscine), ma soprattutto a quello di acque naturali (dolci o marine) [7].

Responsabili di gastroenteriti epidemiche sono virus enterici come rotavirus, Norwalk virus (NV) e Small round virus (SRV). NorwalkVirus e Small round virus sono stati associati in USA, Svezia e Canada a gastroenteriti epidemiche legate oltre che all'uso di acqua da bere anche al contatto con acque per uso ricreativo sia naturali, come quelle di mare, di lago e di fiume, che trattate, come quelle di piscine [23, 24]. In USA il 50-70% della popolazione adulta ha anticorpi anti NV; in Inghilterra il 48% dei bambini tra 12 e 23 mesi e fino al 90% della popolazione da 50 anni in su. Hepatitis E virus (HEV) e rotavirus sono molto diffusi nei paesi in via di sviluppo, soprattutto il primo, che colpisce prevalentemente individui adulti di 15-40 anni

Tabella 2. - Epidemie di origine idrica (acqua potabile) negli Stati Uniti (USA) e in Inghilterra e Galles (UK) registrate dal 1911-1920 fino al 1998 [4, 15]

Paese	Anni	Epidemie (n)	Individui (n)	Affezioni/microrganismi
USA	1920-1940	530	195 336	Tifo, gastroenteriti, shigellosi, amebiasi, epatiti
	1941-1970	554	112 800	Tifo, gastroenteriti, shigellosi, amebiasi, epatiti, poliomieliti, tularemia, leptosirosi, giardiasi
	1971-1998	691	569 934	Gastroenteriti (anche virali), shigellosi, campilobatteriosi, epatiti, criptosporidiosi, giardiasi, amebiasi, ciclosporidiosi, yersinosi, <i>E. coli</i> (EHEC)
UK	1911-1940	22	12 045	Tifo, paratifo, dissenteria, gastroenteriti
	1941-1970	4	700	Tifo, gastroenteriti
	1971-1998	41	7520	Gastroenteriti, campilobatteriosi giardiasi, criptosporidiosi

di età e che è particolarmente virulento per le donne in gravidanza; è responsabile, oltre che di episodi epidemici per contagio interpersonale e per assunzione di acqua potabile nei paesi in via di sviluppo (Africa, Asia, India, Messico) anche di epidemie derivate dall'uso ricreazionale di acque naturali negli Stati Uniti [23]. Alcuni gruppi di adenovirus sono responsabili di gastroenteriti di origine idrica [19].

Tra i microrganismi che, attualmente, destano attenzione per le epidemie idrotrasmesse sono da considerare i protozoi patogeni come *Giardia lamblia* o *intestinalis*, *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium parvum*, ma anche microsporidi che inducono affezioni gastrointestinali e infezioni dei dotti biliari in individui immunocompromessi (Tab. 1 e 2). *Cyclospora cayetanensis*, ritenuto erroneamente un cianobatterio ed identificato come protozoo solo nel 1993, è capace di indurre patologie gastroenteriche epidemiche con picchi nei mesi estivi [8, 25]. *Cryptosporidium*, la cui morfologia e ciclo di vita sono stati, per la prima volta, descritti nel 1912, è rimasto nell'ombra fino al 1971, anno in cui ne è stata dimostrata l'associazione ad una diarrea bovina. Il primo caso umano di criptosporidiosi è stato riportato nel 1976 e a partire dal 1984, anno al quale risale il primo evento epidemico, sono state registrate numerose epidemie tra cui la più nota è quella di Milwaukee (Wisconsin) nel 1993 [17, 26]. Si è così evidenziato il ruolo fondamentale svolto dall'acqua nella trasmissione di questo microrganismo, la cui dose infettante può variare da 1 a 30 oocisti e la cui sopravvivenza nell'ambiente idrico è piuttosto elevata potendo, le oocisti, persistere anche per mesi in laghi e fiumi. In USA l'80-97% delle acque superficiali contiene oocisti di *Cryptosporidium* [26]. Sono ampiamente documentate oltre ad epidemie dovute all'acqua potabile anche epidemie dovute all'acqua di balneazione compresa quella delle piscine [7, 8, 23, 24]. Attualmente sono state identificate 20 specie di *Cryptosporidium*, quella di più recente identificazione è *Cryptosporidium hominis*, implicata in epidemie da acque ricreazionali [9].

Gli indicatori microbiologici ed i loro attributi

L'accertamento della qualità microbiologica degli ambienti idrici per stabilirne l'eventuale pericolosità per la salute pubblica dovrebbe essere effettuato con controlli mirati alla verifica dell'assenza di microrganismi patogeni. Controlli di questo tipo, però, non possono essere realizzati per diversi motivi. L'assenza dimostrata di un patogeno non dà la certezza dell'assenza di altri patogeni. Inoltre, tutti i microrganismi o, almeno, quelli opportunisti potrebbero assumere il ruolo di patogeni. Non esistono metodiche atte al rilevamento di tutti i patogeni e

di tutti i patogeni potenziali, molte delle tecniche oggi disponibili, soprattutto quelle utilizzate per i microrganismi enterici sono indaginose, poco sensibili e spesso con basso indice di ripetibilità/riproducibilità. Per questi motivi si ricorre alla scelta di adeguati indicatori della presenza di patogeni [5].

Il concetto di indicatore microbiologico risale al secolo scorso. Nel 1849 in *On the mode of communication of cholera* John Snow aveva suggerito la correlazione tra colera ed acqua distribuita alla popolazione e cinque anni più tardi dimostrò e documentò la prima epidemia di origine idrica, un'epidemia di colera sviluppatasi a Londra nel quartiere di Soho [11]. Quando, trent'anni più tardi, cominciarono ad essere identificati in laboratorio gli agenti infettivi, ci fu un'ulteriore e definitiva conferma della trasmissione di malattie infettive attraverso la via idrica. Alle analisi chimiche effettuate regolarmente dal 1858 sulle acque di approvvigionamento di una città come Londra furono affiancate, successivamente agli studi di Pasteur, le analisi batteriologiche. Nel 1891 si sosteneva che la rilevazione dei microrganismi presenti nei liquami poteva dare utili indicazioni sulla eventuale contaminazione delle acque utilizzate dalla popolazione a scopo potabile. In seguito ci si orientò alla selezione, nell'ambito dei microrganismi presenti in acque contaminate, di gruppi di batteri indicatori di contaminazione. Houston affermò l'importanza di rilevare nelle acque microrganismi come i coliformi, gli streptococchi fecali ed i clostridi, che facendo parte della flora intestinale dell'uomo e degli animali potevano dare una stima del grado di contaminazione fecale e fungere da indicatori della presenza di patogeni fecali nell'acqua contaminata [11].

L'indicatore deve possedere specifici attributi affinché il suo rilevamento acquisti significatività in relazione al rischio reale costituito dalla presenza dei patogeni. Negli anni '60 Bonde ha selezionato e descritto i criteri mirati alla individuazione di un gruppo di microrganismi o di un microrganismo con funzione di indicatore ideale di contaminazione fecale di ambienti idrici [27, 28]. Secondo i criteri di Bonde l'indicatore:

- 1) deve essere sempre presente nelle deiezioni umane ed animali;
- 2) non deve replicarsi nell'ambiente;
- 3) deve essere presente in numero più elevato dei patogeni;
- 4) deve essere resistente alle condizioni tipiche di ambienti idrici naturali o modificati per l'applicazione di trattamenti (es. disinfezione, sedimentazione, ecc.) in misura maggiore dei patogeni;
- 5) deve crescere rapidamente su terreni di coltura;
- 6) deve esplicitare reazioni caratteristiche e semplici in modo che in tempi più rapidi possibili sia possibile una sua identificazione certa;

7) deve essere distribuito uniformemente nel campione da analizzare o deve essere possibile ottenere una distribuzione uniforme con semplici procedure di omogeneizzazione;

8) una volta seminato in terreni di coltura deve crescere bene indipendentemente dalla presenza di altri microrganismi; cioè, la sua crescita non deve essere inibita dalla presenza di altri gruppi microbici.

I primi quattro requisiti proposti da Bonde si riferiscono alla relazione tra organismo indicatore e patogeno di interesse, gli altri quattro descrivono le proprietà associate alla quantificazione dell'indicatore. Per almeno 40 anni i requisiti indicati da Bonde per la individuazione di un indicatore ideale sono serviti come modello per gli indicatori di contaminazione fecale e gli indicatori dell'efficienza dei trattamenti. Attualmente questi requisiti sono in fase di revisione in conseguenza dello sviluppo e della maggiore disponibilità di nuovi metodi di misura e si tende a trattare i requisiti che si riferiscono alla caratterizzazione degli indicatori separatamente da quelli tipici dei metodi di rilevamento [28]. I metodi attualmente disponibili, in particolare, le tecniche di biologia molecolare, offrono maggiore possibilità di identificazione delle diverse specie microbiche. Inoltre ci sono diverse opzioni di scelta per il rilevamento di diversi gruppi di indicatori per la disponibilità di una grande varietà di metodi nuovi. Così criteri separati permettono da una parte di scegliere un indicatore con caratteristiche biologiche appropriate idonee per una data applicazione e dall'altra di accoppiare queste caratteristiche con un metodo di misura adatto a tale applicazione.

Gli indicatori della qualità microbiologica di un ambiente idrico possono avere funzioni diverse in relazione al tipo di valutazione che si vuole fornire per quel determinato ambiente. Un indicatore può, ad esempio essere utilizzato per la valutazione di pericoli potenziali o per valutare il tipo di esposizione, ma anche per identificare l'origine della contaminazione o per valutare l'efficacia di interventi adottati per ridurre il rischio, ecc. A seconda della finalità che ci si propone si dovrà scegliere un indicatore con le caratteristiche più idonee tenendo presenti:

- quali sono gli attributi di un indicatore;
- quali sono le applicazioni tipiche degli indicatori;
- quali attributi sono importanti per le diverse applicazioni.

Gli attributi biologici ideali per un indicatore sono i seguenti [28]:

- correlazione con il rischio per la salute;
- sopravvivenza simile o più elevata di un patogeno a fattori fisici, chimici e biologici (es. raggi ultravioletti, temperatura, salinità, predazione della flora autoctona, disidratazione, sporulazione, incistamento, azione dei disinfettanti, ecc.);

- velocità nel trasporto simile o maggiore di quella caratteristica del patogeno in relazione a filtrazione, sedimentazione, assorbimento a materiale particolato;

- presenza numericamente più elevata di quella del patogeno;

- specificità in relazione all'origine della contaminazione fecale o identificabilità dell'origine di contaminazione.

L'attributo biologico più importante è la relazione quantitativa tra concentrazione dell'indicatore e rischio per la salute. Questa relazione è stata dimostrata, ad esempio, da studi epidemiologici sull'esposizione ad acque di tipo ricreazionale. In alcuni di questi studi è stato dimostrato che il rischio di contrarre gastroenteriti a seguito del bagno in acque di mare e di fiume è correlato alla presenza di streptococchi fecali in quantità superiori a 20/100ml e che tale rischio aumenta in relazione diretta all'aumento delle concentrazioni di streptococchi, per cui con quantità di streptococchi fecali maggiori di 40/100ml questo rischio diventa significativo [29, 30]. Tra gli attributi biologici assumono rilievo le caratteristiche di sopravvivenza simili a quelle di un patogeno e la velocità del trasporto. Nel caso di differenti comportamenti in quanto al trasporto o alla sopravvivenza le relazioni tra concentrazioni dell'indicatore e del patogeno cambieranno in funzione della distanza dalla fonte inquinante e in funzione dei tempi di permanenza nell'ambiente. Ad esempio, le differenze nel trasporto batterico e virale attraverso il suolo e gli acquiferi influenzano la valutazione dell'impatto della qualità dell'acqua dai sistemi delle fosse settiche [31]. Se l'indicatore e il patogeno hanno tempi di sopravvivenza differenti, a maggiore garanzia di protezione della salute pubblica, è preferibile che l'indicatore sia più resistente del patogeno anche se l'utilizzo di un indicatore caratterizzato da una elevata capacità di sopravvivenza (ad es. spore di *Clostridium perfringens*) può tradursi in una condizione di superprotezione. Infatti un indicatore con caratteristiche di resistenza può essere rilevato in concentrazioni erroneamente considerate indicative di rischio per la salute pubblica anche quando il patogeno è scomparso.

La concentrazione dell'indicatore nei campioni da saggiare deve essere sempre maggiore rispetto a quella del patogeno. Questo è importante in quanto l'indicatore deve essere presente in concentrazioni tali da non rendere necessario il prelievo e l'analisi di quantità elevate del campione da analizzare, cosa che complicherebbe ulteriormente non solo le operazioni di campionamento e trasporto, ma anche quelle della conservazione e dell'esecuzione delle analisi. I coliformi rispondono bene a questo criterio. Gli individui malati, infatti, che eliminano con le feci patogeni in quantità paragonabile a quelle dei coliformi, rappresentano una minore percentuale rispetto alla popolazione sana che

elimina costantemente coliformi ed altri indicatori microbiologici di origine fecale i quali sono dunque presenti nei liquami in quantità notevolmente superiore (diverse migliaia) a quella della maggior parte dei patogeni [32].

In merito all'attributo "specificità della fonte di contaminazione" o "identificabilità dell'origine della contaminazione", in relazione alla contaminazione di origine fecale, è indubbio che gli indicatori specifici di provenienza intestinale sono preferibili a quelli presenti nell'ambiente naturale. Un ulteriore aspetto legato all'efficienza di un indicatore può essere collegato alla sua origine animale o umana. Alcuni indicatori, pur non avendo specificità di provenienza, hanno proprietà genotipiche e fenotipiche che consentono una differenziazione in relazione all'origine fecale umana e animale [33]. Altri indicatori, in grado di indicare l'apporto inquinante di particolari specie animali, possono essere utilizzati per indicare il grado o il tipo di rischio. Ad esempio, la vicinanza di bestiame ad un fonte idrica indica un potenziale rischio di contaminazione dell'acqua con patogeni comuni nel bestiame ma pericolosi per la salute umana, come *Escherichia coli O157:H7* e *Cryptosporidium* [34, 35]. La scelta di un organismo indicatore è subordinata anche ad una serie di valutazioni che riguardano i metodi di rilevamento e di enumerazione dell'indicatore stesso. I metodi devono essere semplici e rapidi e dare risultati in linea con il processo di controllo di qualità. Le principali caratteristiche di un metodo di rilevazione devono essere le seguenti:

- specificità per l'organismo da ricercare non influenzabile dalla natura del materiale in esame;
- precisione e sensibilità;
- rapidità dei risultati;
- determinazione quantitativa;
- capacità di misurare vitalità o infettività;
- flessibilità logistica per quanto riguarda apprendimento del metodo e personale impiegato, vantaggi nelle analisi di campo, costi e volumi da analizzare.

Tutti questi requisiti sono interdipendenti. La specificità o capacità di identificare l'organismo target è uno dei più importanti attributi di un metodo. La specificità può essere riferita ad un gruppo (es. coliformi o enterovirus), a un genere (es. *Pseudomonas*), ad una specie (es. *Cryptosporidium parvum*) oppure a stipiti (es. *Escherichia coli O157:H7*) e può essere determinata con metodi biochimici, antigenici o genetici. La specificità può essere influenzata dalla composizione della matrice, infatti acque ad elevato contenuto di sali, di sostanza organica o torbide possono interferire con la specificità di un metodo. Ad esempio acidi tannici ed umici possono interferire con metodi di biologia molecolare. Acque caratterizzate da elevate quantità di particolato solido influenzano in modo determinante i metodi che utilizzano la filtrazione attraverso membrane a causa di fenomeni di occlusione delle membrane.

Terreni molto selettivi possono determinare perdita di specificità di un metodo nel caso in cui la disinfezione abbia prodotto la presenza di microrganismi indicatori danneggiati, quindi momentaneamente non in grado di esplicare le loro normali azioni metaboliche [36].

I metodi devono essere in grado di dare misure della concentrazione degli indicatori con caratteristiche di precisione. Per ciascun metodo devono essere noti i dati di ripetibilità e di riproducibilità dei risultati. I metodi caratterizzati da elevati gradi di precisione sono quelli in grado di dare risposte di tipo quantitativo. Anche la sensibilità di un metodo ha influenza sui risultati e quindi su un'adeguata caratterizzazione di un corpo idrico. Metodi che amplificano o concentrano l'organismo target sono tipicamente più sensibili (colture, PCR, filtrazione). La sensibilità di un metodo è influenzata dal volume del campione esaminato, specialmente se l'organismo target è in bassa concentrazione in relazione al volume analizzato. La rapidità di risposta di un metodo che rileva indicatori di contaminazione è, indubbiamente, una delle caratteristiche più importanti, considerato che la popolazione potrebbe essere a rischio nel periodo necessario all'esecuzione delle analisi. La vitalità ed infettività degli organismi rilevati sono caratteristiche importanti poiché gli studi epidemiologici sui quali si basano gli attuali standard attuali sono stati condotti con metodi che utilizzano tecniche colturali e non è chiaro come possa essere valutato un corpo idrico caratterizzato da risultati numerici che includono indicatori non vitali.

L'uso degli indicatori microbiologici per la valutazione della qualità microbiologica di ambienti idrici

La valutazione della qualità microbiologica delle acque, secondo la più recente normativa, prevede il rilevamento di microrganismi indicatori che, in funzione del ruolo assunto, possono essere distinti in tre gruppi:

- indicatori di contaminazione fecale;
- indicatori di processo,
- organismi indice o organismi modello [37].

Mentre gli indicatori di contaminazione fecale, (ad es. *Escherichia coli*) hanno la funzione di indicare la possibile presenza di patogeni di origine fecale, quelli di processo sono in grado di dimostrare l'efficacia di un processo di trattamento. Ad esempio tra gli organismi indicatori di processo, la flora eterotrofa o i coliformi non termotolleranti sono in grado di fungere da verifica per l'efficacia dei trattamenti di disinfezione con il cloro. Gli organismi indice o modello sono gruppi o singole specie in grado di indicare la presenza di un patogeno, ad esempio *Escherichia coli* è l'organismo indice di Salmonella ed i colifagi F-RNA lo sono per i virus enterici umani.

Le normative relative ai diversi comparti idrici, a partire dal secolo scorso e revisionate in tempi successivi, hanno previsto la dimostrazione dell'inquinamento fecale con il rilevamento degli indicatori di contaminazione fecale (coliformi totali, coliformi fecali e streptococchi fecali). Nelle più recenti normative coliformi fecali e streptococchi fecali sono stati sostituiti, rispettivamente, da *Escherichia coli* ed enterococchi. I coliformi totali, cui appartengono le specie dei generi *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, non sono attualmente considerati validi indicatori di contaminazione fecale annoverando anche germi di esclusiva derivazione ambientale come *Serratia fonticola*, *Rahnella aquatilis* e *Buttiauxella agrestis* [5]. La scelta di *Escherichia coli* come indicatore di elezione per la contaminazione fecale dei diversi comparti idrici è conseguente alla sua elevata presenza nelle feci umane ed animali (fino a $10^9/g$), alla facilità della sua coltivazione e alla sua rapidità di sviluppo. *Escherichia coli* sostituisce il parametro coliformi fecali poiché quest'ultimo comprende microrganismi non sempre di derivazione fecale. Comunque, i coliformi fecali o termotolleranti sono buoni indicatori di fecalizzazione, ad esempio, nel caso si voglia valutare l'efficienza dei processi di trattamento applicati alle acque da potabilizzare consideratane la maggiore numerosità nelle acque rispetto a quella della sola specie *E. coli*. Gli streptococchi fecali, al pari dei coliformi, sono un gruppo microbico eterogeneo di cui fanno parte germi Gram positivi le cui specie, revisionate sotto il profilo di appartenenza tassonomica, sono presenti nelle feci umane e animali. Sulla base di analisi molecolari e antigeniche le due specie *Enterococcus faecalis* ed *E. faecium* assieme ad altre specie appartenenti al gruppo D di Lancefield, come *Enterococcus durans* ed *E. avium*, sono state inserite nel nuovo genere *Enterococcus*. Solo poche specie del gruppo D di Lancefield, come *S. bovis* ed *equinus* sono state lasciate nel genere *Streptococcus*. Vi sono attualmente almeno 26 specie nel genere *Enterococcus* [38]. Gli enterococchi - cocchi Gram positivi, ossidasi e catalasi positivi - sono distinguibili dagli streptococchi per la loro capacità di crescita in presenza di NaCl in concentrazioni del 6,5%, in presenza di bile al 40% e di blu di metilene allo 0,1%, a temperature di 45 °C ed a valori di pH pari a 9,6. Sono generalmente più abbondanti nelle feci animali che in quelle umane e caratterizzati da persistenza maggiore di quella di *Escherichia coli* e dei coliformi fecali nelle acque contaminate. Resistono a condizioni di disidratazione per cui, assieme ai coliformi e alle spore di clostridi solfitoriduttori, sono indicatori della efficienza dei trattamenti delle acque. Ne è raccomandato il rilevamento in reti acquedottistiche dopo interventi di manutenzione o per accertare contaminazione di acque sotterranee da parte di acque superficiali. A seguito degli

studi di Cabelli nel 1970, nei quali è stato accertato per *Enterococcus faecium* e *faecalis* il ruolo di predittori di malattie gastrointestinali in acque di tipo ricreazionale, ne è raccomandato il rilevamento in acque superficiali dolci (fiumi e laghi) e marine [29, 30].

Gli indicatori di inquinamento fecale non sono propriamente idonei ad evidenziare microrganismi a diffusione diversa da quella oro-fecale, che si trasmettono per inalazione (*Legionella pneumophila*) o per contatto (*Pseudomonas aeruginosa*), ma neanche possono dare la sicurezza dell'assenza di patogeni specialmente se ci si riferisce a quelle forme dotate di alto potere infettante ed elevata resistenza alle condizioni ambientali e alla disinfezione come, ad esempio, i protozoi patogeni. Studi eseguiti in USA dal CDC e dall'EPA dimostrano che l'accertato adeguamento a limiti previsti dalle normative non basta a scongiurare il pericolo di epidemie idrotrasmesse. Si è evidenziato come alcuni eventi epidemici siano imputabili al consumo di acqua potabile in linea con gli standard stabiliti dalle normative che ne regolamentano la qualità igienica [39-42]. Questi eventi sono da considerare con molta attenzione poiché danno l'indicazione che non sempre gli indicatori di fecalizzazione assolvono alla loro funzione precipua, che è di *spia* della presenza di patogeni. Uno dei motivi che potrebbe spiegare questa anomalia può essere connesso alla diversa sopravvivenza dei vari tipi di microrganismi nell'ambiente idrico. È stata ampiamente descritta la sopravvivenza di alcuni gruppi di virus enterici in acque, che una volta sottoposte a trattamenti di disinfezione, risultavano esenti da indicatori batterici di contaminazione fecale. È anche noto come parassiti patogeni, quali *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp., in forma cistica nel mezzo idrico, siano più resistenti degli indicatori batterici di contaminazione fecale [40]. McFeters già nel 1974 evidenziava la maggiore resistenza nell'ambiente idrico degli enteropatogeni rispetto ai coliformi. Questi fenomeni potrebbero essere legati, oltre che a caratteristiche di sopravvivenza differenziale che favorisce i patogeni rispetto agli indicatori, anche ai fenomeni dell'adsorbimento dei microrganismi a superfici solide (nel caso delle condutture di acque potabili) o a materiale particolato e sedimentato favorenti la loro sopravvivenza anche in presenza di biocidi. Bisogna inoltre considerare il problema connesso alla presenza di *injured microorganisms*, rappresentati da quella parte di flora microbica che, non neutralizzata in modo definitivo dall'effetto dei biocidi e danneggiata a livello funzionale o strutturale, mostra bassi livelli di attività metabolica, perdita momentanea delle capacità replicative e incapacità di crescere sui terreni di coltura [36].

Accanto agli indicatori di contaminazione fecale normative recenti di diversi comparti idrici prevedono indicatori addizionali a quelli di contaminazione fecale. Per le acque destinate al consumo umano sono

previsti, ad esempio, coliformi, eterotrofi, *Clostridium perfringens* e *Pseudomonas aeruginosa* mentre per le acque di piscine, ancora, eterotrofi e *Pseudomonas aeruginosa*, ma anche *Staphylococcus aureus*. Ognuno di questi microrganismi ha un significato peculiare. Coliformi ed eterotrofi oltre ad essere indicatori di processo (efficienza di trattamenti delle acque) possono dare indicazioni sulla costanza della qualità chimica e biologica delle acque, essendo in grado di evidenziare fenomeni di ricrescita microbica nelle reti idriche o in altri ambienti idrici tra cui, ad esempio, le vasche natatorie. La presenza di coliformi totali in assenza di coliformi fecali può essere considerata, ad esempio, un segnale di fenomeni di ricrescita indotti dalla presenza di nutrienti o di contaminazione secondaria. Questo tipo di diagnosi va, comunque, confermata tenendo conto dei dati relativi alle cariche batteriche a 22 ed a 36 °C. Per escludere con sicurezza che la presenza di coliformi a 37 °C non sia imputabile a contaminazione di origine fecale occorre verificare l'assenza di altri indicatori di contaminazione fecale come gli enterococchi. Le conte batteriche a 22 e 36 °C rappresentano la biomassa microbica vitale e rilevabile su uno specifico substrato. Le diverse temperature di incubazione definiscono l'origine della carica microbica che a 36 °C rappresenta quella presumibilmente di derivazione da animali a sangue caldo, mentre a 22 °C è di origine prevalentemente ambientale, cioè certamente non fecale. La variazione del numero degli eterotrofi acquista significato in relazione a modificazioni che possono essere subentrate in una risorsa idrica per effetto di dilavamento del suolo e/o di apporto inconsueto di sostanza organica biodegradabile. Le conte batteriche possono essere utili per verificare l'efficienza dei trattamenti delle acque, ma anche per accertare le condizioni di trasporto di acque in rete e l'integrità dei sistemi di distribuzione, nonché fenomeni di ricrescita in vasche natatorie o apporti microbici elevati dovuti ad eccessivo affollamento di impianti natatori, ecc.

Clostridium perfringens tra i clostridi solfito riduttori è la specie più frequentemente associata alle feci di animali a sangue caldo. Essendo un microrganismo sporigeno ha tempi di sopravvivenza più elevati degli indicatori di fecalizzazione (*Escherichia coli* ed enterococchi). È discusso il suo ruolo di indicatore di contaminazione fecale perché proprio a causa della sua elevata persistenza ambientale può essere presente anche in assenza di patogeni enterici. È più resistente dei coliformi e degli enterococchi ai trattamenti di disinfezione e può essere utilizzato insieme ad essi come indicatore secondario di efficienza dei trattamenti delle acque. Le spore di *Cl. perfringens*, se presenti in acque in cui si sia registrata assenza di *E. coli* e di enterococchi, possono indicare presenza di virus enterici e di cisti di protozoi patogeni, più

resistenti di *E. coli* e di enterococchi alla disinfezione. *Clostridium perfringens*, considerato sia indicatore di contaminazione fecale che organismo indice per *Cryptosporidium* per le acque destinate al consumo umano, ha la funzione di verifica della connessione con acque superficiali contaminate e quindi della possibile presenza di questo protozoo.

Microrganismi come *Pseudomonas aeruginosa*, unitamente alla popolazione batterica in grado di crescere a 36 e 22 °C, sono in grado di indicare presenza di ricrescite microbiche nel caso di acque potabili confezionate, ma anche nel caso di acque distribuite o di acque di piscine.

L'uso degli indicatori di contaminazione fecale ha rappresentato uno strumento molto importante per il controllo delle acque destinate ad uso potabile e unitamente all'utilizzo del cloro ha consentito un abbattimento consistente di epidemie di origine idrica quale la febbre tifoide ed il colera anche se ancora oggi il veicolo idrico è all'origine di epidemie in nazioni caratterizzate da elevati standards igienici. Oggi molte malattie di origine idrica sono causate da microrganismi emergenti, altre non sono riconosciute come affezioni microbiche, altre ancora non sono segnalate. Le nuove acquisizioni circa la molteplicità dei patogeni di origine idrica, la loro origine, fisiologia ed ecologia sta portando alla consapevolezza che l'approccio attuale in tema di indicatori non sia più sufficiente a garantire la protezione della salute. Tra le limitazioni connesse all'uso degli indicatori di contaminazione fecale, precedentemente riportate, abbiamo sottolineato ad esempio, la sopravvivenza più elevata dei protozoi e dei virus patogeni rispetto a quella dei coliformi, per cui mentre la presenza di questi ultimi può fungere da indicatore di contaminazione fecale, la loro assenza non indica sicuramente che l'acqua non sia contaminata. Questo è solo un esempio che mette in luce come il problema degli indicatori debba essere affrontato con la consapevolezza che non esiste un indicatore per tutti gli ambienti idrici. Sempre in relazione ad *Escherichia coli* ci sono problemi connessi al suo utilizzo come indicatore di contaminazione fecale in acque superficiali di aree caratterizzate da climi tropicali e subtropicali in cui questo microrganismo ha capacità replicative.

Non esiste un unico microrganismo che possa essere scelto come indicatore delle diverse condizioni degli ambienti idrici. Occorre operare una scelta accurata in funzione di cosa si vuole valutare (fecalizzazione, presenza di patogeni trasmissibili per inalazione o contatto, presenza di patogeni opportunisti, ecc.). La scelta dei metodi da utilizzare è una parte molto importante per lo studio degli indicatori dello stato di fecalizzazione, di quelli di processo o degli indici o modello. Devono, quindi, essere sviluppati metodi attendibili ma più rapidi di quelli attualmente disponibili.

Da quanto esposto appare evidente che le problematiche legate alla contaminazione delle acque superficiali e alla scelta degli indicatori microbiologici più idonei rappresenta un campo di studio ancora aperto e di grande attualità.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 3 ottobre 2005.

BIBLIOGRAFIA

1. Sigeo DC (Ed). *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment*. Chichester: Wiley; 2004.
2. Paerl HW, Kuparinen J. Aggregates and consortia, Microbial. In: Bitton G (Ed.). *Encyclopedia of environmental microbiology*. New York: Wiley; 2000.
3. Navazio G. La gestione del controllo e dell'utilizzo delle risorse idriche. In: Frigerio A (Ed.) *Qualità dell'acqua: approccio chimico ed ecotossicologico*. Milano: Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche; 1996. p. 10-17.
4. Percival SL, Walker JT, Hunter PR. Waterborne diseases. In: Vreeland RH (Ed.). *Microbiological aspects of biofilm and drinking water*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 29-40.
5. Aulicino FA, Volterra L. Significato degli indicatori e dei patogeni nelle acque destinate al consumo umano. *Biologi Italiani* 2000;2:36-41.
6. Aulicino FA. Il quadro microbiologico delle acque destinate al consumo umano e problemi emergenti. In: Bratan R, Lorusso F, Pontremoli C, Soana A (Ed.). *Acque destinate al consumo umano - Aspetti gestionali e sanitari*. Milano: Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche; 2003 (Rapporti GSISR, 139, p. 21-5).
7. Hunter PR. *Waterborne disease - Epidemiology and ecology*. New York: Wiley; 1997.
8. Talley D (Ed.). *Waterborne pathogens. Manual of water supply practices*. Denver: American Water Works Association; 1999.
9. Surveillance of waterborne disease outbreak associated with recreational water United States, 2001-2002. *MMWR Surveillance summaries*, 2004;53(SS08):1-22.
10. Mignani E, Palmieri F, Fontana M, Marigo S. Italian epidemic of waterborne tularemia. *Lancet ii*: 1988:1423-4.
11. Percival SL, Walker JT, Hunter PR. Water supply, treatment and distribution. In: Vreeland RH (Ed.). *Microbiological aspects of biofilm and drinking water*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 1-14.
12. Surveillance of waterborne disease outbreak - United States, 1991-1992. *MMWR Surveillance summaries* November 19, 1993;42(SS-05):1-22.
13. Surveillance of waterborne disease outbreak - United States, 1993-1994. *MMWR Surveillance summaries* April 12, 1996;45(SS-1):1-33.
14. Surveillance of waterborne disease outbreak - United States, 1995-1996. *MMWR Surveillance summaries* December 11, 1998;47(SS-5):1-34.
15. Surveillance of waterborne disease outbreak - United States, 1997-1998. *MMWR Surveillance summaries* May 26, 2000;49(SS04):1-35).
16. Surveillance of waterborne disease outbreak-United States, 1999-2000. *MMWR Surveillance summaries* November 22, 2002; 51(SS-08): 1-28.
17. MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME *et al.* A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Engl J Med* 1994;331:161-67.
18. Muhldofer I, Schafer KP. *Emerging bacterial pathogens*. Basel: Karger; 2001.
19. Committee on indicators for waterborne pathogens (Ed.). *Indicators for waterborne pathogens*. Washington DC: The National Academies Press; 2004.
20. Malara P. Vigilanza delle autorità centrali. In: Castellani Pastoris M, Rota MC (Ed.). *Le infezioni da Legionella: aspetti microbiologici ed epidemiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Istisan Congressi) p. 17-20.
21. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply Walkerton, Ontario, May-June 2000. *Can Commun Dis Rep* 2000;26:170-73.
22. Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell JrHD, Geldreich EE, Payne BJ, Meyer Jr A, Wells JG, Greene KD, Bright M, Bean NH, Blake PA. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death. *Ann Intern Med* 1992;117:812-20.
23. Surveillance of waterborne disease outbreak-associated with recreational water United States, 2001-2002. *MMWR Surveillance summaries* October 22, 2004;53(SS08):1-22.
24. Andersson Y, Bohan P. Disease surveillance and waterborne outbreaks. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO; 2001. p. 115-35.
25. Huang P. The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. *Ann Intern Med* 1995;123:409-14.
26. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection* 2004;6:773-85.
27. Bonde G. Bacteriological methods for estimation of water pollution. *Health Lab Sc* 1966;3:124-8.
28. Committee on indicators for waterborne pathogens (Ed.). Attributes and application of indicators. In: *Indicators for waterborne pathogens*. Washington DC: The National Academies Press; 2004. p. 165-95.
29. Ferley JP, Zmirou D, Calducci F, Baleux B, Fera P, Larbaigt G, Jacq E, Moissonier B, Blinneau A, Boudot J. Epidemiological significance of microbiological pollution criteria for river recreational waters. *Int Journal Epidemiol* 1989;18:198-05.
30. Fleisher JM, Jones F, Kay D, Stanwell-Smith R, Wyer M, Morano R. Water and non-water risk factors for gastroenteritis among bathers exposed to sewages contaminated marine waters. *Int Journal Epidemiol* 1993;22:698-08.

31. Harden HS, Chanton JP, Rose IB, John DE, Hooks ME. Comparison of sulfur exafluoride, fluorescein and rhodamine dyes and the bacteriophage PDR-1 in tracing subsurface flow. *J Hydrol* 2003;277(1-2):100-15.
32. Rose JB, Huffman DE, Riley K, Farrah SR, Lukasik JO, Harman CL. Reduction of enteric microorganisms at the Upper Occoquan Sewage Authority water reclamation plant. *Water Env Res* 2001;73:711-20.
33. Simpson JM, Santo-Domingo JW, Reasoner DJ. Microbial source tracking: state of the science. *Environm Sci Technol* 2002;36:5729-89.
34. LeChevallier MW, Abbszdegan M, Camper AK, Izaguirre G, Stewart M, Naumovitz D, Mardhall M, Sterling CR, Payment P, Rice EW, Hurst CJ, Schaub S, Slifko TR, Rose JB, Smith HV, Smith DB. Emerging pathogens-bacteria. *J Am Water Works Ass* 1999a;91:136-72.
35. LeChevallier MW, Abbszdegan M, Camper AK, Izaguirre G, Stewart M, Naumovitz D, Mardhall M, Sterling CR, Payment P, Rice EW, Hurst CJ, Schaub S, Slifko TR, Rose JB, Smith HV, Smith DB. Emerging pathogens-viruses, protozoa and algal toxins. *J Am Water Works Ass* 1999b; 91:110-21.
36. Aulicino FA, Pastoni F. Sopravvivenza microbica nelle reti di distribuzione di acque potabili e problemi conseguenti. *Ann Ig* 2004;16:265-72.
37. Ashbolt NJ, Grabow WOK, Snozzi M. Indicators of microbial water quality. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO; 2001. p. 289-15.
38. Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastrointestinal tract. *Int Journal Food Microbiol* 2003; 88:123-31.
39. Payment P, Hunter PR. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO; 2001. p. 61-88.
40. Craun GF, Berger PS, Calderon RL. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *J Am Water Works Ass* 1997;89 (3):96-04.
41. Payment P, Richardson L, Siemiatycki J, Dewar R, Edwardes M, Franco E. A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to the consumption of drinking water meeting currently accepted microbiological standards. *Am J Publ Health* 1991;81:703-8.
42. Payment P, Siemiatycki J, Richardson L, Renaud G, Franco E, Prévost M. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effect due to the consumption of drinking. *Int J Environm Health Res* 1997;7:5-31.