

documento

In un contesto di prevenzione e tutela della salute pubblica è prioritario poter disporre dei risultati dell'analisi dell'acqua in tempi rapidi, soprattutto quando si tratta di acque destinate al consumo umano.

Un'indagine, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità, ha permesso di eseguire un confronto fra i vari metodi attualmente disponibili e di individuarne uno in modo particolare che oltre a richiedere scarsa manualità presenta un'alta sensibilità e fornisce risultati in 18-22 ore.

■ Lucia Bonadonna

L. Bonadonna, Reparto delle Acque Interne, Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria - Istituto Superiore di Sanità, Roma



ACQUE F

Metodi

La ricerca di microrganismi indicatori di contaminazione fecale costituisce la parte largamente prevalente dell'esame microbiologico delle acque e quella universalmente praticata. Ciò è dovuto essenzialmente a motivi di ordine pratico, legati alla relativa semplicità della ricerca degli indicatori a fronte della ricerca dei patogeni che, a causa di difficoltà in larga parte dovute alla limitata sensibilità dei metodi e ai tempi lunghi di risposta delle analisi, non possono essere spesso direttamente determinati.

Quali i patogeni da ricercare?

L'esame microbiologico delle acque si basa essenzialmente sulla possibilità di coltivare su idonei substrati, e in specifiche condizioni di temperatura e di incubazione, microrganismi indicatori, utilizzando procedure analitiche finalizzate all'individuazione differenziale di specie (*Escherichia Coli*) e di gruppi microbici (i coliformi) che si ritengono significativi per la formulazione di un giudizio igienico-sanitario o di qualità delle acque in esame.

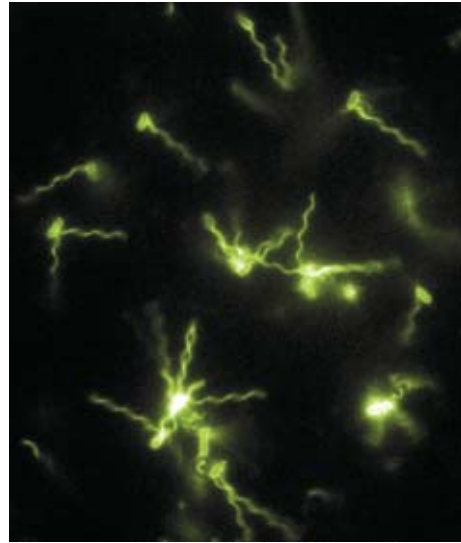
Il gruppo dei coliformi ed *Escherichia Coli*, una delle specie comprese nel sottogruppo dei coliformi termotolleranti, fanno parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* che include approssimativamente 20 generi, tra cui alcuni patogeni enterici, quali *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*.

Escherichia Coli è stato descritto,

per la prima volta, nel 1885 col nome di *Bacterium Coli*. Il termine di coliformi, ovvero come allora veniva anche chiamato "gruppo colon" o "*coli-aerogenes*", venne utilizzato inizialmente da batteriologi inglesi e, successivamente, venne proposto per indicare i batteri fermentanti il lattosio, ricercati come indicatori di contaminazione delle acque.

L'appartenenza al gruppo dei coliformi, bacilli Gram negativi, non sporigeni, ossidasi negativi, aerobi o anaerobi facoltativi, capaci di moltiplicarsi in presenza di sali biliari o di tensioattivi, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è storicamente basata sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare, in 48 ore, il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35°-37°C, i coliformi, e di 44°C, *Escherichia Coli*.

Sulla base degli studi di tassonomia tradizionale, la conoscenza del gruppo dei coliformi non ha fatto progressi fino al passato recente: le nuove forme eventualmente isolate venivano ritenute irregolari o atipiche, proprio per l'impossibilità di inquadrarle negli schemi esistenti. I metodi tradizionali d'identificazione si basano, infatti, su chiavi dicotomiche che attribuiscono arbitrariamente un peso ai caratteri. Questi sistemi gerarchizzati conducono necessariamente ad errori di diagnosi, tenuto conto delle eterogeneità fenotipiche



delle specie e dell'esistenza di ceppi atipici.

Tuttavia, negli anni più recenti, lo sviluppo di più moderni metodi tassonomici (genetico-molecolari, principalmente) ha radicalmente trasformato la loro classificazione, distinguendo e aumen-

POTABILI

di analisi a confronto

tando il numero di specie, oggi sono circa 60, e inquadrando in sottosistemi caratterizzati da particolarità biochimiche (biotipi), immunologiche (sierotipi) e tossinogene.

Si comprende quindi perché, nel passato, numerosi coliformi venivano classificati come atipici. Si trattava, infatti, di nuove specie che le tecniche analitiche convenzionali non permettevano di distinguere e di classificare. Attualmente, è riconosciuto che tutte le specie sono regolarmente b-galattosidasi positive, tranne *E. Coli* che è b-glucuronidasi positivo, mentre una percentuale relativamente elevata di coliformi e di *E. Coli* non è in grado né di fermentare il lattosio né di produrre gas. Inoltre, *E. Coli* può essere indolo negativo e non in grado di crescere alla temperatura di 44°C.

Come risultato ne è derivata la considerazione che, per il gruppo dei coliformi, il criterio della b-galattosidasi, usato come marcatore per il gene *lacZ*, sia più caratterizzante che non quello della fermentazione del lattosio, così come per *E. Coli* l'enzima b-glucuronidasi, codificato dal gene *Gus*, abbia una frequenza più elevata che non la fermentazione del lattosio.

Grazie ai nuovi criteri tassonomici la nuova classificazione dei coliformi ha avuto, di conseguenza, importanti ripercussioni anche sui metodi messi a punto per la loro ricerca e per la loro identificazione.

Necessità di metodi analitici più rapidi

L'evoluzione e l'approfondimento degli studi nel campo della microbiologia ambientale hanno inoltre dimostrato l'inadeguatezza e i limiti delle procedure analitiche tradizionali anche in relazione al tempo che intercorre tra l'esecuzione dell'analisi e l'ottenimento del risultato che, con i metodi tradizionali, può raggiungere, nel complesso, le 72 ore. Requisito prioritario in un contesto di prevenzione e tutela della salute pubblica è invece poter disporre dei risultati analitici in tempi più rapidi possibili, idealmente entro lo stesso giorno del prelievo dell'acqua, soprattutto quando si tratta di acque destinate al consumo umano. D'altra parte, il ricorso a metodi più rapidi permetterebbe di ottenere in tempi più brevi il segnale dell'eventuale deterioramento della qualità dell'acqua, grazie al quale sarebbe



possibile adottare con maggior tempestività le misure appropriate per fronteggiare i rischi e individuare i provvedimenti più idonei per ripristinarne la buona qualità. Da alcuni anni, sulla base dei nuovi criteri di classificazione, hanno avuto il loro sviluppo diversi metodi cosiddetti rapidi per la determinazione di coliformi ed di *E. coli*. Utilizzano infatti substrati modificati con l'aggiunta di composti cromatici o fluorogeni che vengono idrolizzati dagli specifici enzimi, β -D-galattosidasi e β -D-glucuronidasi. L'attività enzimatica dei batteri non sembra risentire degli effetti legati a stress ambientale e tecnologico cui sono sottoposti i microrganismi nelle acque e alcuni di questi metodi stanno trovando ampia applicazione nei laboratori che effettuano i controlli di qualità delle acque anche perché sono di facile manualità e meno esposti ad interpretazioni soggettive ed a errori dell'operatore.

La Direttiva Europea 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano, recepita in Italia con il Decreto Legislativo n. 31 del 2001 [1], ha stabilito il metodo di riferimento per la ricerca di *E. Coli* e dei coliformi a 37°C, parametri da determinare per valutare le caratteristiche igienico-sanitarie e di qualità dell'acqua applicando il metodo previsto dalla norma Uni En Iso 9308-1. Il metodo, basato sulla tecnica della filtrazione su membrana, utilizza un terreno colturale elaborato nel 1947 che sfrutta il tradizionale principio della



fermentazione del lattosio, reazione prodotta, comunque, non solo dai microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi, ma anche da una molteplicità di altri microrganismi rilevabili nelle acque.

È da segnalare, tuttavia, che gli operatori addetti al settore dei controlli delle acque hanno avanzato dubbi e perplessità sull'opportunità all'uso del metodo. Gran parte dei limiti della procedura analitica stabilita dalla normativa risultano essere imputabili a scarsa selettività del substrato per crescita di colonie di batteri interferenti e non appartenenti alle specie ricercate, impossibilità di distinguere, in base alla morfologia delle colonie e alla temperatura, *Escherichia Coli* dai

coliformi (è previsto, infatti, che entrambi siano coltivati alla temperatura di 37°C), obbligatorietà di procedere a prove di conferma delle colonie sospette, con conseguente aumento dei costi e dei tempi di risposta delle analisi, difficoltà di interpretazione dei risultati.

In considerazione di queste riserve, il Gruppo Metodi Microbiologici e Biologici, che opera nell'ambito della Commissione Permanente sulle Acque del Ministero della Salute - deputato alla definizione e all'aggiornamento dei metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DLgs 31/2001, ha organizzato uno studio comparativo per verificare l'equivalenza di metodi da utilizzare in alternativa al metodo di riferimento (Uni En Iso 9308-1 - Lattosio Ttc Tergitol agar), così come è previsto, in questi casi, dall'articolo 7 della Direttiva Europea 98/83/CE. Lo studio ha preso in esame, nel complesso, tre metodi alternativi.

Dst: il più veloce

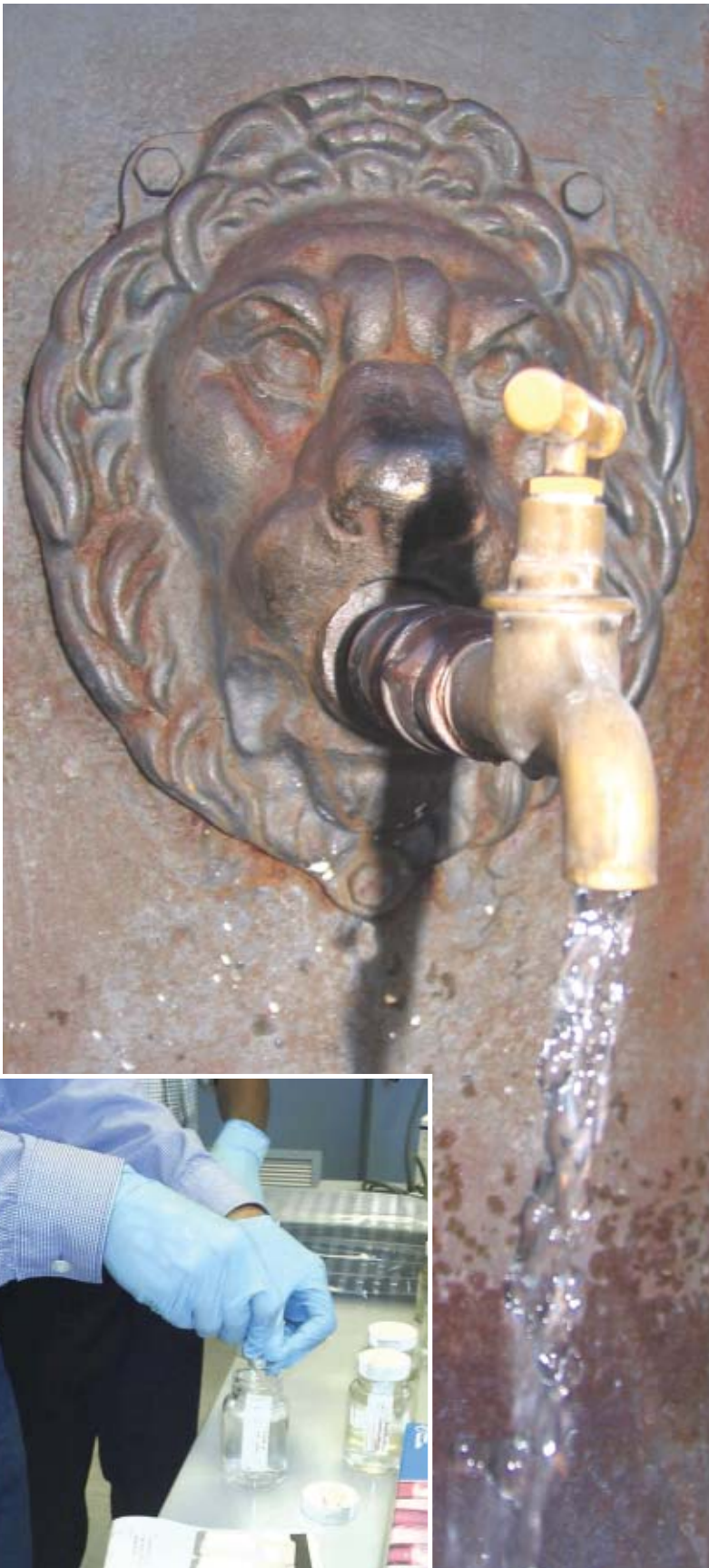
Uno di questi metodi, il Defined Substrate Technology (Dst) è già noto da tempo a livello internazionale come metodo rapido di analisi per le acque. Infatti, è stato approvato dall'Environmental Protection Agency con il nome di Mmo-Mug test già dal 1992 e dall'Aoac (Official Methods of Analysis) nel 1995 con il nome di "Defined Substrate Technology", mentre è

TABELLA - LABORATORI ITALIANI COINVOLTI NELLO STUDIO DI COMPARAZIONE TRA METODI MICROBIOLOGICI

Laboratori partecipanti

Arpa, Piemonte
Arpa, Ferrara
Arpal, Genova
Bas, Bergamo
Vestaspa, Venezia
Arpa Molise, Isernia
Amga, Genova
Acea, Roma
Publiacqua, Firenze
Centro Ricerche Marine, Cesenatico
Arpa, Forlì
Asl, Darfo Boario Terme
Aqp, Bari





riportato, dal 1996, dall'American Public Health Association nel Manuale "Standard Methods for the examination of water and wastewater", sotto il nome di Enzyme Substrate Test.

La procedura di analisi sfrutta le proprietà enzimatiche dei coliformi e di *E. Coli* che, tramite β -galattosidasi e β -glucuronidasi rispettivamente, forniscono una caratterizzazione più aderente agli attuali schemi di classificazione di questi microrganismi. Diversamente da altri metodi analoghi e da quelli tradizionali, che ostacolano la crescita dei microrganismi interferenti con agenti inibitori, la tecnologia Dst è basata sul principio che solo i microrganismi ricercati riescono ad utilizzare il substrato nutritivo presente nella composizione che non presenta, d'altra parte, componenti utili alla crescita di eventuali altri batteri. Fanno parte integrante del terreno di crescita due indicatori/nutrienti per i batteri bersaglio, l'o-nitrofenil- β -D-galattopiranoside (Onpg), un composto cromogenico, per i coliformi, e il 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (Mug), un composto fluorogenico, per *E. Coli*. Dalla loro idrolisi, ad opera degli enzimi specifici, vengono prodotti l'o-nitrofenolo, come pigmento giallo e il 4-metil-umbelliferone, composto fluorescente se osservato alla lampada do Wood (UV) alla lunghezza d'onda di 366 nm.

Il metodo è basato sulla tecnica del Most Probable Number (Mpn) ed è semiautomatico miniaturizzato a multi-pozzetto. Tuttavia, si differenzia dalla classica tecnica dell'Mpn in cui la precisione è bassa. Infatti, con l'elaborazione di metodi Mpn a multi-pozzetto, l'aumento del numero di inoculi del campione di acqua da analizzare in parallelo comporta un conseguente aumento della precisione del metodo, precisione che diventa equiparabile o anche superiore a quella della tecnica di conta diretta su terreno agarizzato.

Il metodo ha in più il vantaggio di dare risposte definitive in tempi più rapidi (18-22 ore) rispetto ad altri metodi e permette una rilevazione simultanea dei coliformi e di *E. Coli* alla stessa temperatura di 37°C, permettendo, d'altra parte, di distinguere *E. Coli* dai coliformi in base alla caratteristica fluorescenza.

Il metodo è stato, nel 1999-2000, sottoposto ad uno studio di comparazione a livello europeo a cui hanno partecipato 20 laboratori europei [2].

Lo studio, svolto in Italia nel 2003, ha invece coinvolto un totale di 15 laboratori, tutti italiani, selezionati ed accreditati, appartenenti ad Arpa regionali, Aziende Usl e acquedotti (Tabella). L'indagine, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità, Reparto delle Acque Interne - Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, è stata condotta seguendo specifiche indicazioni, procedure ed elaborazioni statistiche dettate dalla norma Iso 17994 che stabilisce i criteri per valutare l'equivalenza di metodi microbiologici.

Per la determinazione dei coliformi sono stati

documento



analizzati, in parallelo con il Metodo Dst e il metodo di riferimento previsto dalla norma Uni En Iso 9308-1, 323 campioni naturali di acqua, confermate 4.263 colonie da ceppi presuntivi cresciuti utilizzando il Dst e 5.196 da ceppi presuntivi isolati con il metodo di riferimento. Analogamente, per la determinazione di *Escherichia coli*, sono stati analizzati, in parallelo, 318 campioni naturali di acqua, confermate 2.145 colonie da ceppi presuntivi cresciuti utilizzando il Dst e 5.185 da ceppi presuntivi isolati con il metodo di riferimento.

Dall'elaborazione statistica dei dati ricavati dallo studio è emerso che il Metodo Dst è migliore rispetto al metodo di riferimento per il parametro coliformi ed equivalente per il parametro *Escherichia Coli*.

Il metodo, inoltre, ha il vantaggio di richiedere scarsa manualità, con conseguente rapido svolgimento dell'analisi, di non avere necessità di svolgere prove di conferma dei microrganismi isolati, di avere un'alta sensibilità, e di fornire i risultati in 18-22 ore, caratteristiche accompagnate anche da semplicità nella lettura dei risultati che è meno soggetta ad un'interpretazione arbitraria da parte degli operatori.

Il metodo, approvato in sede di Commissione Permanente sulle Acque, per anticipare la pubblicazione dei Rapporti Istisan dell'Istituto Superiore di Sanità sui Metodi Analitici per le Acque destinate al consumo umano, con tutte le altre procedure analitiche per i parametri chimici e microbiologici previsti dalla normativa, è stato inserito come metodo ufficiale alternativo per l'analisi dei coliformi e di *Escherichia Coli* nel sito www.iss.it, all'interno dell'area scientifica Ambiente. Nel frattempo, un questionario sull'applicazione del DLgs 31/2001 a circa un anno dalla sua entrata in vigore, inviato ai laboratori operanti nel settore dall'Istituto Superiore di Sanità, Reparto delle Acque Interne, ha fornito chiare indicazioni circa l'interesse e, nella gran parte dei casi, l'accoglimento favorevole, da parte dei laboratori, del nuovo metodo rapido per l'analisi delle acque destinate al consumo umano.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

[1] Decreto Legislativo n. 31 del 2 febbraio 2001. Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. Supplemento ordinario della *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica Italiana n. 52 del 3 marzo 2001, Serie generale.

[2] S.I. Niemela, J.V. Lee, C.R. Fricker, *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**, 1285.