

# Rassegna su *Escherichia coli* ed enterococchi come indicatori della qualità delle acque

Busignani Emanuela<sup>1</sup>, Bucca Milena<sup>1</sup>, Anselmo Antonella<sup>1</sup>, Veronesi Yuri<sup>2</sup>, Formichetti Paolo<sup>1</sup> e Mancini Laura<sup>1\*</sup>

1. Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Igiene Ambientale, viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

2. ARPA Emilia Romagna, Via Amendola 2, 42100 Reggio Emilia.

\* Autore referente per la corrispondenza (fax 06 49387083, e-mail: lmancini@iss.it)

## INTRODUZIONE

Gli standard di qualità microbiologica delle acque stabiliscono concentrazioni di batteri indicatori che non dovrebbero essere superate per proteggere la salute umana dai patogeni (FIKSDAL *et al.*, 1997). Questi organismi indicatori in genere non causano direttamente disturbi, ma sono buoni “previsori” della presenza di patogeni (virus, protozoi, batteri) nelle acque.

Perciò, considerato il gran numero di specie differenti di patogeni potenzialmente presenti e la complessità della loro identificazione e conteggio (spesso laboriosi e difficoltosi), in loro vece si ricercano usualmente i microrganismi indicatori.

Dato che il microrganismo originariamente chiamato *Bacterium coli commune* veniva invariabilmente ed esclusivamente ritrovato nelle feci umane, la sua presenza nelle acque fece presumere, già dal secolo scorso, la potenziale presenza anche di patogeni enterici. Il termine coliformi è stato perciò usato per indicare quei batteri che ricordavano l’originale descrizione del *Bacterium coli* (più tardi *Escherichia coli*) e i coliformi sono stati universalmente utilizzati come indicatori di contaminazione fecale.

Molti altri batteri sono stati usati come indicatori di contaminazione fecale (ad esempio streptococchi, enterococchi), per differenziare il gruppo animale di provenienza (bifidobatteri, alcune specie di enterococchi), l’età o la lontananza della sorgente di inquinamento (ad esempio spore di clostridi) e lo stato trofico (Tab. I).

Spesso, specialmente per le acque usate a scopo ricreativo, è stata messa in discussione l’opportunità di utilizzare gli indicatori fecali come “marcatori” di patogeni umani.

L’Agenzia di Protezione Ambientale statunitense (US-EPA, 1986) ha dimostrato che *E. coli* e gli enterococchi sono i migliori organismi indicatori della presenza di patogeni che causano disturbi gastro-intestinali ed ha specificato, come priorità della stessa Agenzia per il triennio 2000-2002, il passaggio all’uso di questi indicatori in tutti gli Stati Uniti (US-EPA, 2000a).

In Italia, il decreto legislativo n. 152 del 1999 (ITALIA, 1999) e le sue successive integrazioni stabiliscono la classificazione dei corpi idrici in funzione degli obiettivi di qualità ambientale ed individuano *E. coli* come parametro significativo per l’analisi microbiologica delle acque superficiali e reflue urbane

includendolo tra i parametri “macroscrittore” utilizzati –assieme all’Indice Biotico Esteso– per la classificazione dello stato ecologico dei corpi idrici che, in rapporto alla presenza di inquinanti chimici, consente l’attribuzione dello stato di qualità ambientale.

Viene quindi superato il concetto di limite di legge per singolo parametro, sostituito dall’integrazione dei risultati chimici, microbiologici e biologici per una valutazione complessiva del corpo idrico.

Gli enterococchi sono utilizzati dal nuovo decreto come indicatori per le acque marine costiere.

A differenza delle precedenti normative sulle acque, il D. Lgs. n. 152/99, utilizza indicatori di tipo microbiologico non solo per usi particolari della risorsa (utilizzo diretto da parte dell’uomo, balneazione, potabilizzazione) (Tab. II), ma anche per valutare la qualità dei corsi d’acqua.

## CLASSIFICAZIONE

### *Escherichia coli*

*E. coli*, appartenente al gruppo dei batteri coliformi, è una specie tassonomicamente definita della famiglia Enterobacteriaceae. La definizione storica di questo gruppo si è basata sul metodo di identi-

ficazione (fermentazione del lattosio) piuttosto che sulle regole della sistematica batterica: è un microrganismo a forma di bastoncino, anaerobio facoltativo, Gram-nega-

tivo, asporigeno, che fermenta il lattosio con formazione di gas e acido dopo 48 h di incubazione a 44 °C; è mobile per flagelli peritrichi e, in molti stipiti, è fornito di

fimbrie e capsula.

### Enterococchi

Gli enterococchi costituiscono un sottogruppo degli streptococchi, un termine funzionale usato per indicare gli streptococchi normalmente presenti nel tratto intestinale degli uomini e degli animali. SHERMAN (1937) fece il primo tentativo di classificazione degli streptococchi, riconoscendone quattro gruppi, fra essi gli enterococchi, caratterizzati dalla capacità di sopravvivere per almeno 30 minuti a 60 °C e di crescere ad un pH di 9,6 in presenza di cloruro di sodio al 6,5%.

La tassonomia degli streptococchi ha subito enormi variazioni, fino a che si è giunti a suddividerli in tre generi distinti: *Lactococcus*, *Streptococcus* (comprendente gli streptococchi in senso stretto) ed *Enterococcus* (comprendente diverse specie, tra le quali quelle in precedenza denominate *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. gallinarum* e *S. avium*). Gli enterococchi sono batteri Gram-positivi, ovoidali, non sporigeni, singoli, accoppiati o in catene corte (HARDIE e WHILEY, 1997); alcune specie sono mobili. Sono chemioautotrofi, anaerobi facoltativi ed hanno richieste nutrizionali complesse, possedendo un metabolismo di tipo fermentativo, con l'acido lattico come principale prodotto della fermentazione del glucosio. La parete cellulare contiene un peptidoglicano del tipo lisina-asparagina. La maggior parte delle specie è caratterizzata dall'antigene del gruppo D di Lancefield, con l'eccezione di *E. cecorum*, *E. columbae* ed *E. dispar*.

Col trasferimento di *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* nel nuovo genere *Enterococcus*, il numero totale di specie incluse in quest'ultimo è salito a 17. La posizione tassonomica di *E. flavescens* è incerta, data la stretta parentela con *E. casseliflavus* (DE-

**Tab. I.** Microrganismi utilizzati come indicatori di diverse condizioni delle acque potabili.

Microrganismi	Indicatori di:
<i>Escherichia coli</i>	Contaminazione fecale di origine umana ed animale.
Coliformi fecali o termotolleranti ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> )	Contaminazione fecale di origine animale ed umana (validi sostituti di <i>E. coli</i> ). Inefficienza dei sistemi di trattamento delle acque.
Coliformi totali ( <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>Rahnella aquatilis</i> , <i>Buttiauxella agrestis</i> , <i>Yersinia</i> )	Contaminazione fecale. Inefficienza dei sistemi di trattamento delle acque e mancata integrità della rete. Presenza di nutrienti e ricrescita nelle reti idriche.
Streptococchi fecali ( <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. avium</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. durans</i> )*	Contaminazione fecale di origine umana ed animale. Inefficienza dei sistemi di trattamento delle acque. Contaminazione delle acque sotterranee da acque di dilavamento e da acque superficiali.
Clostridi solfito riduttori (spore)	Contaminazione fecale di origine umana ed animale. Contaminazione da virus enterici e protozoi patogeni.
Enterovirus	Contaminazione da virus enterici.
Batteriofagi Virus enterici umani	Contaminazione da liquami. Contaminazione fecale.
Batteri filamentosi	Colonizzazione microbica di reti idriche. Biocorrosione. Occlusione di pozzi.

\* Il termine "streptococchi fecali" viene mantenuto perché questo gruppo di microrganismi è così indicato nel DPR 236/88 ancora vigente.

**Tab. II.** Limiti di legge relativi alla concentrazione (UFC/100ML) di indicatori microbiologici in acqua

	Acque destinate al consumo umano DPR 236/88	Balneazione DPR 470/82	Acque superficiali da potabilizzare D. Lgs. 152/99 **
Coliformi totali	5*	2.000	50 - 5.000 - 50.000
Coliformi fecali	0	100	20 - 2.000 - 20.000
Streptococchi fecali	0	100	20 - 1.000 - 10.000

\* fino a 5 per non più di due campioni successivi dello stesso punto.

\*\* sono previsti 3 valori limite per i Coliformi fecali e totali in relazione a tre diversi livelli di trattamento delle acque destinate alla potabilizzazione.

**Tab. III.** Gruppi di Enterococchi classificati mediante analisi comparative di sequenze di rRNA16S. (WILLIAMS *et al.*, 1991)

Gruppo di <i>faecium</i>	Gruppo di <i>avium</i>	Gruppo di <i>gallinarum</i>	Gruppo di <i>cecorum</i>	Altre specie distinte
<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>E. mundtii</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. dispar</i>
<i>E. durans</i>	<i>E. raffinosus</i>			<i>E. sulfureus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>E. pseudoavium</i>			<i>E. saccharolyticus</i>

VRIESE e POT, 1995). Analisi comparative delle sequenze di rRNA 16S hanno rivelato che la maggior parte delle specie di *Enterococcus* ricade in uno dei quattro gruppi di specie riportati nella tabella III (WILLIAMS *et al.*, 1991). Le quattro specie che rimangono slegate dai gruppi sono *E. faecalis*, *E. sulfureus*, *E. saccharolyticus* e *E. dispar* (MORRISON *et al.*, 1997).

## ECOLOGIA

### *Escherichia coli*

La specie proviene dai reflui umani o animali riversati direttamente nei fiumi, nei laghi o nelle falde acquifere, o veicolati dalle acque di dilavamento del territorio in occasione delle piogge (MULLER *et al.*, 2001; PARVEEN *et al.*, 2001). Vive nell'ambiente intestinale dell'uomo e degli animali; è sensibile a molti disinfettanti chimici e fisici. L'Organizzazione Mondiale della Sanità già da tempo considera *E. coli* un indicatore primario di inquinamento fecale, a causa della sua maggiore stabilità nell'ambiente acquatico rispetto ai coliformi

fecali -che risentono maggiormente delle variazioni stagionali- e della sua minore sensibilità alle procedure di disinfezione.

### Enterococchi

Gli enterococchi si trovano, tipicamente, nel tratto intestinale e nelle feci degli uomini e di altri animali (MURRAY, 1990), ma possono colonizzare altri siti, come il tratto iniziale del sistema gastrointestinale o le vie genitali; alcune specie sono state isolate anche nel suolo, nei cibi, nell'acqua e nelle piante, ed è proprio la loro capacità di sopravvivere e crescere in un'ampia gamma di condizioni ambientali che spiega la loro distribuzione pressoché ubiquitaria.

Soddisfano la maggior parte dei criteri necessari per candidare un organismo nella lista degli indicatori: ecologia e sopravvivenza simili a quella dei patogeni, presenza consistente ed esclusiva nelle feci, incapacità a moltiplicarsi nell'ambiente, disponibilità di metodi d'identificazione semplici e riproducibili, abbondanza uguale o superiore a quella del patogeno di

interesse.

Studi su animali hanno dimostrato che la colonizzazione è influenzata da fattori specifici dell'ospite: *E. faecalis* predomina nei maiali, cani, gatti, cavalli e roditori, mentre nelle pecore predomina *E. faecium*. Alcuni enterococchi, specie quelli pigmentati, sono spesso associati alle piante ed è stata suggerita l'esistenza di una relazione epifitica; altri sono stati isolati dal tratto digestivo e sulla cuticola degli insetti, ma si ipotizza una contaminazione secondaria (GODFREE *et al.* 1997) (Tab. IV).

Vi è, poi, un generale accordo sul fatto che gli enterococchi non siano originari del suolo o delle acque, ma rappresentino una contaminazione da fonti animali o vegetali. Essi, infatti, sono in grado di sopravvivere per lungo tempo su oggetti inanimati e alla luce diretta del sole e si pensa che -rispetto al gruppo dei coliformi- siano migliori indicatori della contaminazione fecale delle acque usate a scopo ricreativo. Anche se diverse ricerche hanno collegato gli enterococchi ad incidenti di avvelenamento da cibo, questa associazione non è stata ancora provata (GODFREE *et al.*, 1997).

## PATOGENESI

### *Escherichia coli*

Come parte essenziale della flora batterica intestinale, questo organismo gioca un ruolo fondamentale nella digestione per la produzione di vitamina K nell'intestino.

**Tab. IV.** Specie di Enterococchi associati al tratto intestinale di uomini e/o animali.

Specie	Origine intestinale
<i>E. faecium</i>	Uomini, bovini, maiali, uccelli
<i>E. faecalis</i>	Uomini, bovini, maiali, uccelli
<i>E. durans</i>	Uomini, maiali, uccelli
<i>E. hirae</i>	Uomini, maiali, uccelli
<i>E. avium</i>	Uomini, bovini, maiali, uccelli
<i>E. gallinarum</i>	Uomini, uccelli
<i>E. cecorum</i>	bovini, maiali, uccelli
<i>E. columbae</i>	bovini, maiali, uccelli

Pur essendo un abitante abituale del tratto intestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo qualche ceppo può causare disturbi nell'uomo. Gli *E. coli* patogeni sono stati spesso considerati responsabili di infezioni alimentari (soltanto a partire dagli anni '50), ma sono state anche riferite gravi epidemie propagate da acque inquinate, sia potabili che usate a scopo ricreativo. Alcuni *E. coli* patogeni sono caratterizzati da una bassa dose infettiva; la maggior parte dei ceppi patogeni produce endotossine. Oltre ad essere il responsabile principale delle infezioni del tratto urinario, questo batterio è stato messo in relazione a molte infezioni in varie parti dell'organismo, tra cui polmoniti e meningiti.

Gli *E. coli* patogeni sono classificati in 5 gruppi.

1. *Enterotossinogeni (ETEC)*: aderiscono tramite specifiche fimbrie alla mucosa intestinale e producono due tipi di tossine: una termolabile (LT), simile a quella del colera, e l'altra termostabile (ST). Determinano ipersecrezioni di elettroliti nell'intestino causando diarrea, vomito e febbre per circa 24-48 h, dopo un'incubazione che va dalle 8 alle 44 ore. Apparentemente le cellule infettate non subiscono variazioni, a parte qualche piccola infiammazione.

2. *Enterohemorragici (EHEC)*: causano la distruzione dei microvilli della mucosa intestinale e l'infiammazione delle cellule, tramite la produzione di due tipi di enterotossine, una simile alla tossina delle specie di *Shigella* (SLT) e una verotossina (VT). Comprende vari sierotipi, fra cui l'O111:H e l'O157:H11; quest'ultimo sta diventando una delle cause emergenti di intossicazioni alimentari e da balneazione (MULLER *et al.*, 2001).

3. *Enteroinvasivi (EIEC)*. I ceppi appartenenti al gruppo EIEC possie-

dono numerose caratteristiche biochimiche, antigeniche e genetiche in comune con le shigelle, con le quali vengono spesso confusi al momento della identificazione batteriologica.

I microrganismi EIEC provocano una malattia dissenterica indistinguibile da quella causata dalle shigelle, dovuta ad invasione delle cellule epiteliali del colon e successiva moltiplicazione intracellulare dei microrganismi, con produzione di fenomeni infiammatori ed ulcere mucose. I fattori di invasività sono mediati da plasmidi (LEVINE, 1987). La malattia è rara e si manifesta sporadicamente in tutto il mondo, con una più elevata frequenza in Brasile ed in Europa orientale.

La diagnosi presenta notevoli difficoltà per la somiglianza dei microrganismi con le shigelle e dovrebbe essere affidata a laboratori particolarmente attrezzati. L'identificazione si basa sulla sierotipizzazione e sulla determinazione, mediante tecnica ELISA, della presenza di alcune proteine di membrana associate con l'invasività. Sono stati inoltre recentemente preparati *probe* di DNA che permettono il riconoscimento dei geni codificanti fattori di invasività.

4. *Enteropatogeni (EPEC)*: responsabili della cosiddetta diarrea del viaggiatore, non producono tossine, ma aderiscono alla mucosa intestinale causando infiammazioni e la distruzione dei microvilli della mucosa intestinale. Questo tipo di infezione può essere anche fatale per i neonati e per i bambini piccoli, mentre gli adulti in genere sviluppano immunità.

5. *Enteroaderenti-aggregativi (EA-AggEC)*: si tratta di un ultimo gruppo riconosciuto di recente, così chiamato per la sua capacità di aderire alle colture di cellule di mammifero. Comprende batteri simili agli ETEC: producono enterotossine si-

mili alle emolisine e causano diarrea, specie nei bambini.

Gli *E. coli* patogeni possono essere raggruppati sulla base della sierologia, ma una identificazione definitiva richiede la determinazione delle proprietà caratteristiche di virulenza associate ad ogni gruppo, ad esempio la produzione di numerose e potenti citotossine, di emolisine, di enterotossine stabili e instabili.

### Enterococchi

Le patologie più comuni dovute agli enterococchi sono le infezioni delle vie urinarie (FELMINGHAM *et al.*, 1992). Gli enterococchi, in special modo *E. faecalis*, sono responsabili di una notevole percentuale di endocarditi batteriche (MEGRAN, 1992), specie in individui immunocompromessi sottoposti a terapia antibiotica; di solito, l'infezione parte proprio dalle vie urinarie. Essi causano anche, in alcune occasioni, infezioni del tratto respiratorio e del sistema nervoso centrale dei neonati (MURRAY, 1990).

La notevole abilità nello scambiare elementi extracromosomici che codificano geni per la virulenza o per la resistenza agli antibiotici, tramite vari meccanismi genetici (CLEWELL, 1990), sta inducendo un continuo aumento dei ceppi antibioticoresistenti e, quindi, difficoltà terapeutiche.

### IMPORTANZA COME INDICATORI DI QUALITÀ DELLE ACQUE

Nella guida *Ambient Water Quality Criteria for Bacteria* (US-EPA, 1986) i criteri di qualità raccomandavano che la media geometrica della densità batterica non superasse determinati valori e fornivano ragioni scientifiche per sviluppare standard di qualità tali da mantenere la sicurezza delle acque usate a scopo ricreativo. I dati for-

niti dall'US-EPA provenivano da una serie di ricerche condotte dalla stessa Agenzia per esaminare la relazione tra i disturbi associati alla balneazione e la qualità microbiologica delle acque (CABELLI *et al.*, 1982; CABELLI, 1983; DUFOUR, 1984).

Con questi studi si dimostrò che i coliformi fecali, gli indicatori originariamente consigliati dalla Federal Water Pollution Control Administration of the Department of the Interior, mostravano una correlazione con le gastroenteriti associate alle attività balneari inferiore a quella di alcuni altri organismi. Due di questi in particolare, *E. coli* ed enterococchi, mostravano una forte correlazione, il primo per le acque dolci e i secondi per quelle marine. La migliore correlazione osservata potrebbe essere il risultato della loro capacità di sopravvivenza simile a quella dei patogeni.

Le buone qualità indicatrici degli enterococchi sono legate alle loro caratteristiche: non si moltiplicano nell'ambiente ed hanno una resistenza agli agenti disinfettanti chimici (circa due volte quella di *E. coli*) e ai raggi UV. Anche se sono presenti nelle acque di scarico, grezze e trattate, a livelli inferiori di *E. coli*, il numero di streptococchi fecali ( $1 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$  e  $2 \cdot 10^2 \text{ ml}^{-1}$  rispettivamente nelle acque grezze e in quelle trattate) supera di gran lunga quello dei patogeni, sia virali che batterici.

#### Acque dolci

I batteri fecali possono contaminare le acque naturali a partire da una varietà di fonti. Le acque reflue trattate contengono tipicamente  $200 \text{ ml}^{-1}$  streptococchi fecali, anche se ci sono variazioni considerevoli nelle stagioni e nei vari Paesi. Altre fonti includono alcune attività agricole e gli scarichi urbani.

Un approccio utilizzato per stabilire l'origine umana o anima-

le dell'inquinamento è quello delle relazioni fra la densità dei vari indicatori, principalmente tra coliformi fecali (CF) e streptococchi fecali (SF). In particolare GELDREICH (1976) ha condotto degli studi sul rapporto tra CF ed SF in vari fiumi. Le acque di scarico non trattate possedevano rapporti CF/SF pari o superiore a quattro, mentre nelle acque piovane il rapporto era 0,7 o minore. Tuttavia, non sempre si ottenevano i rapporti attesi. Questo si può spiegare con differenze nei tassi di sopravvivenza delle varie specie di streptococchi fecali, ulteriormente accentuate dalla disinfezione dello scarico prima dell'immissione nelle acque riceventi. Inoltre, il rapporto è falsato dalla percentuale di "falsi positivi", a sua volta influenzata sia dal terreno colturale scelto, sia dal tipo di acque (marine o dolci). Per questo motivo il rapporto CF/SF non viene più consigliato come metodo per differenziare tra fonti di inquinamento (DIONISIO e BORREGO, 1995).

#### Acque marine

Gli indicatori batterici di contaminazione fecale rivestono particolare interesse per le acque di balneazione e per la contaminazione dei prodotti della pesca e dell'allevamento. La composizione della flora batterica in tali aree è governata 1) dalla natura della sorgente degli indicatori e 2) dalla diminuzione differenziale della concentrazione degli indicatori *in situ*.

La principale fonte di batteri indicatori sono i liquami fognari grezzi o sottoposti a vari gradi di trattamento, da quello preliminare (grigliatura e macerazione) al primario (con fase di sedimentazione), secondario (ossidazione biologica) e terziario (disinfezione finale, spesso con luce UV).

Altre fonti significative sono gli effluenti delle aree agricole che

arrivano alle zone costiere come carichi episodici durante eventi di piena. In queste condizioni, le acque di ruscellamento che giungono al mare vedono aumentare la propria concentrazione di 2-4 ordini di grandezza, mentre il volume di acqua scaricata aumenta solo di 1-2 ordini. Questi picchi di concentrazione, essendo transitori, spesso non vengono rilevati dal monitoraggio di *routine* (effettuato abitualmente in condizioni meteorologiche normali).

Quando il trattamento è minimo e non riduce in modo significativo la concentrazione batterica, in genere, le acque reflue delle aree residenziali costituiscono la fonte principale di enterococchi e, in generale, di streptococchi fecali. In periodi di piene fluviali, però, la fonte principale di enterococchi sono gli scarichi degli allevamenti zootecnici che, rispetto ai reflui urbani, producono una quantità iniziale maggiore di streptococchi fecali.

Sebbene HANES e FRAGALA (1967) abbiano suggerito che gli enterococchi muoiono più rapidamente in acque marine che in quelle dolci, oggi è universalmente riconosciuto che nelle acque marine la concentrazione degli enterococchi si riduce più lentamente di quella dei coliformi fecali (WYER *et al.*, 1994).

I pochi dati disponibili relativi al tempo di riduzione (tempo richiesto per la morte del 90% della popolazione) di *E. coli* ed enterococchi sono riportati nella tabella V (BARTRAM e REES, 2000).

#### STANDARD DI QUALITÀ PER LE ACQUE USATE A SCOPO RICREATIVO

Ricerche epidemiologiche svolte sia in Nord-America che in Europa, hanno evidenziato un'associa-

**Tab. V.** Tempo di riduzione di *E. coli* e degli enterococchi in acque dolci e marine (BARTRAM and REES, 2000).

Indicatore	Tempo di riduzione (giorni) <sup>1</sup>		Referenze
	Acque dolci	Acque marine	
<i>E. coli</i>	3.9 <sup>2</sup>	0.8 <sup>2</sup>	BITTON <i>et al.</i> , 1983
	6.3		McFETERS and STUART, 1974
	2.7		KESWICK <i>et al.</i> , 1982
	3.1	0.8	HANES and FRAGALA, 1967
	4.6	0.7	OMURA <i>et al.</i> , 1982
Enterococchi	4.4 <sup>2</sup>	2.5 <sup>2</sup>	
	34.7		BITTON <i>et al.</i> , 1983
	4.2		McFETERS and STUART, 1974
	4.5		KESWICK <i>et al.</i> , 1982
	3.0	2.4	HANES and FRAGALA, 1967
		2.6	OMURA <i>et al.</i> , 1982

1 tempo richiesto per la riduzione del 90% della popolazione.

2 valori medi

zione tra i sintomi gastrointestinali associati all'immersione e al nuoto nei bagnanti e la concentrazione di batteri indicatori, sia in acque dolci che marine. È stata anche riscontrata una plausibilità biologica e un'analogia con alcuni casi clinici. È risultata evidente una relazione causale tra l'aumento dell'esposizione alla contaminazione fecale e la frequenza delle gastroenteriti. Nessun autore suggerisce che gli enterococchi siano i patogeni implicati nelle infezioni, ma piuttosto li elencano fra i migliori indicatori batterici associati alle gastroenteriti di probabile eziologia virale.

Gli studi hanno riportato una forte e consistente associazione di tempi e relazioni di tipo dose-risposta, tra la probabilità di contrarre gastroenteriti e la concentrazione di streptococchi fecali nelle acque di balneazione. Si può, inoltre, quantificare l'importanza di altri fattori di rischio non collegati alle acque (NWR non-water-related risk), come l'alimentazione. Questi risultati sono di solito applicati 1) alla creazione di standard di qualità volti a contenere il rischio entro livelli appropriati e 2) alla valuta-

zione del "guadagno in salute" attribuibile al miglioramento della qualità delle acque conseguente alla messa in atto di trattamenti per le acque di scarico presso le zone costiere (GODFREE *et al.*, 1997).

I due studi più importanti per definire gli standard per le acque ad uso ricreativo sono stati condotti dalla US-EPA (1986) che ha anche proposto valori guida per la qualità delle acque, basati sulla densità degli enterococchi. Il valore guida è la concentrazione di un componente che non comporta un rischio sanitario significativo per la maggior parte degli "utenti", se non particolarmente sensibili. Il suo superamento è un segnale che deve indurre alla ricerca delle cause, per decidere se bisogna prendere misure precauzionali volte a ridurre l'esposizione al pericolo, anche nel futuro.

Per la maggior parte dei parametri non esiste un vero e proprio valore soglia al di sotto del quale si escludono effetti sulla salute, per cui la derivazione dei valori guida e la loro conversione in standard include alcune valutazioni a proposito della frequenza e della natura degli effetti sulla salute. In que-

sta valutazione entrano in gioco anche fattori ambientali, sociali ed economici.

Non c'è quindi una formula di gestione del rischio universalmente accettabile. I valori guida dovrebbero essere modificati alla luce di fattori regionali o locali, fra cui la natura e la serietà delle malattie locali endemiche, il comportamento della popolazione, le modalità di esposizione e fattori sociali, economici, ambientali.

L'approccio adottato nella maggior parte dei lavori mira a definire una serie di valori associati ad un dato aumento della frequenza e della varietà di disturbi. Le informazioni che contribuiscono alla definizione dei valori guida derivano anche dai "valori soglia" pubblicati negli studi epidemiologici sulle gastroenteriti ed altre malattie.

## CRITERI DI BALNEAZIONE SECONDO L'US-EPA (1998)

### Acque dolci

Basandosi su un numero statisticamente sufficiente di campioni (in genere non meno di 5, distanziati ugualmente per un periodo di 30 giorni) la media geometrica della densità batterica indicata non dovrebbe superare 126 *E. coli*/100 mL o 33 enterococchi/100 mL.

### Acque marine

Basandosi su di un numero statisticamente sufficiente di campioni (in genere non meno di 5, distanziati ugualmente per un periodo di 30 giorni) la media geometrica della densità batterica degli enterococchi non dovrebbe superare 35 UFC per 100 mL (US-EPA, 1986).

Questi standard sono basati su specifici livelli di rischio di disturbi gastrointestinali acuti. I livelli di rischio correlati utilizzati

Tab. VI. Sommario delle ricerche condotte dal 1984

Autore/i	Anno	Località	Acque	Microorganismi	Risultati rilevanti
FATTAL	1987	Israele	marine	Coliformi fecali Enterococchi <i>E. coli</i>	• Gli enterococchi erano gli indicatori migliori per prevedere i sintomi di disturbi enterici
CHEUNG <i>et al.</i>	1990	Hong Kong	marine	Coliformi fecali Enterococchi <i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. Streptococchi fecali Stafilococchi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> Funghi totali	• La migliore correlazione tra la densità dell'indicatore microbico e gli effetti associati alla balneazione era fra <i>E. coli</i> e disturbi gastrointestinali
BALARAJAN <i>et al.</i>	1991	Regno Unito	marine	Sconosciuti	• Il rischio di malattia aumenta con il grado di esposizione. Se il livello di rischio della popolazione non esposta è 1, questo aumenta ad 1,25 per i bagnanti, ad 1,31 per i nuotatori e ad 1,81 per i surfisti o i tuffatori.
VON SCHIRNDING <i>et al.</i>	1992	Sud Africa (Costa Atlantica)	marine	Enterococchi Coliformi fecali Colifagi Stafilococchi Batteriofagi	• L'incertezza nell'origine della contaminazione fecale potrebbe spiegare la mancanza di differenze statistiche significative tra nuotatori e non.
CORBETT <i>et al.</i>	1993	Sydney, Australia	marine	Coliformi fecali Streptococchi fecali	• I sintomi gastrointestinali nei nuotatori non aumentavano con l'aumento della concentrazione di batteri fecali. • Gli streptococchi fecali erano peggiori indicatori di disturbi gastroenterici rispetto ai coliformi fecali.
KAY <i>et al.</i> ; KAY	1994	Regno Unito	marine	Coliformi totali Coliformi fecali Streptococchi fecali <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stafilococchi totali	• Solo gli streptococchi fecali si potevano associare all'aumento del rischio di gastroenteriti. • Il rischio di gastroenteriti non aumentava fino a che i bagnanti venivano esposti a circa 40 streptococchi/100ml
KUEH <i>et al.</i>	1995	Hong Kong	marine	<i>E. coli</i> Coliformi fecali Stafilococchi <i>Aeromonas</i> spp. <i>Clostridium perfringens</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.	• Sono stati anche analizzati campioni di feci per la ricerca di rotavirus, <i>Salmonella</i> spp, <i>Shigella</i> spp, <i>Vibrio</i> spp e <i>Aeromonas</i> spp; tamponi esofagei per i virus dell'influenza A e B; per i virus parainfluenzali di tipo 1, 2 e 3; infine per i virus respiratori sinciziali e per gli adenovirus • Non si è trovata una relazione tra <i>E. coli</i> e i disturbi associati alla balneazione [probabilmente il fatto è dovuto al basso numero di spiagge campionate] • Gli enterococchi risultavano più strettamente associati al rischio di malattia nei gruppi esposti.
MC BRIDE <i>et al.</i>	1998	Nuova Zelanda	marine	Coliformi fecali <i>E. coli</i> Enterococchi	• La differenza di rischio tra nuotatori e non nuotatori aumentava in modo significativo se i nuotatori rimanevano in acqua per più di 30 min.
HAILE <i>et al.</i>	1996	California	marine	Coliformi fecali Coliformi totali <i>E. coli</i> Enterococchi	• I risultati per gli enterococchi indicavano un'associazione positiva con febbre, eruzioni cutanee, nausea, diarrea, dolori di stomaco, tosse, raffreddore e disturbi gastrointestinali • L'associazione dei sintomi sia con <i>E. coli</i> che con i coliformi fecali era molto debole. • Il rapporto tra coliformi totali e fecali risultò molto predittivo. Usando un rapporto di 5 come livello soglia, la diarrea e gli altri sintomi erano associati con un rapporto più basso indipendentemente dal livello assoluto di coliformi fecali.
SEYFRIED <i>et al.</i>	1985	Canada	dolci	Coliformi fecali Streptococchi fecali <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stafilococchi totali Batteri eterotrofici	• Si è osservato un basso grado di correlazione tra gli streptococchi fecali e i disturbi gastrointestinali • Migliore correlazione tra tali disturbi e densità di stafilococchi
FERLEY <i>et al.</i>	1989	Francia	dolci	Coliformi fecali Streptococchi fecali <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	• In questo studio la definizione di streptococchi fecali in realtà corrispondeva a quella di enterococchi della US-EPA • Buona correlazione tra i disturbi e le concentrazioni di coliformi e streptococchi fecali • La relazione più buona si è osservata con la densità degli streptococchi fecali.

dalla US-EPA sono di non più di 8 insorgenze di malattia su 1000 bagnanti per le acque dolci e di non più di 19 su 1000 per le marine. I tassi di malattia scelti sono quelli più bassi stimati per le zone che prima applicavano il criterio di conta dei CF.

Per essere certi che i criteri assicurino davvero la protezione della salute, l'US-EPA raccomanda un monitoraggio frequente delle località di balneazione conosciute, per stabilire un database completo sul quale determinare se un corpo idrico stia raggiungendo gli standard stabiliti; raccomanda inoltre di condurre indagini sanitarie (esistenza di scarichi provenienti ad esempio da perdite di fosse settiche o da condotte danneggiate) qualora vengano misurate concentrazioni troppo alte di batteri rispetto ai livelli normali. Nonostante gli studi della US-EPA abbiano dimostrato la migliore correlazione tra i disturbi associati alla balneazione e la concentrazione di *E. coli* ed enterococchi, molti Stati continuano ad utilizzare i coliformi fecali o totali.

## GLI STUDI EPIDEMIOLOGICI

Le indagini dell'US-EPA, volte alla ricerca di una correlazione tra l'insorgenza di malattie nei bagnanti e la qualità delle acque, sono state condotte richiedendo alle persone, mentre lasciavano le spiagge, la loro volontaria partecipazione agli studi epidemiologici sulle località di balneazione. Dopo 7-10 giorni i volontari erano contattati telefonicamente per determinare il loro stato di salute. La stessa domanda veniva posta ai volontari che servivano da "controllo", di solito membri della stessa famiglia. La qualità delle acque veniva misurata nello stesso giorno della "nuotata", utilizzando numerosi indicatori, per-

ché non si sapeva ancora quale sarebbe stato quello meglio correlato ai disturbi del nuotatore. I parametri associati al disturbo venivano ottenuti sottraendo il numero di

malati non nuotatori dal numero dei malati nuotatori, utilizzando dati provenienti da esperimenti stagionali.

Oltre al riesame dello studio

Tab. VII. Metodi analitici US-EPA per la determinazione di *E. coli*.

Metodo	Tecnica	Note
1	Metodo delle membrane filtranti. L'agar mTEC è incubato a $35,0 \pm 0,5$ °C per 2 ore, per riattivare i batteri stressati o danneggiati, e poi a $44,5 \pm 0,2$ °C per 22 ore. La membrana è trasferita su un tampone imbevuto di un substrato di urea. Dopo 15-20 minuti le colonie gialle, giallo-verdi o giallo-marroni sull'mTEC vengono confermate col test dell'urea con l'aiuto di una lampada a fluorescenza e di una lente d'ingrandimento (2-5x) o di uno stereoscopio.	Il metodo originale su agar mTEC è stato introdotto dall'US-EPA nel 1986.
2	Metodo delle membrane filtranti. Si utilizza un solo terreno, l'mTEC modificato, e non c'è il trasferimento delle membrane filtranti su un altro terreno o substrato, ma il solo conteggio finale delle colonie rosse. Il terreno modificato, infatti, contiene un cromogeno (5-bromo-6-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronide) che viene catabolizzato in acido glucuronico e un composto rosso o magenta dall'enzima $\beta$ -D-glucuronidasi prodotto da <i>E. coli</i> .	Il metodo modificato da US-EPA nel 1998.

Tab. VIII. Metodi analitici US-EPA per la determinazione degli enterococchi.

Metodo	Tecnica	Note
1	Metodo delle membrane filtranti. Si utilizzano due terreni di coltura: l'mE agar e l'Esculin Iron Agar (EIA). L'mE agar per 48 h a $41 \pm 0,5$ °C e, come prova di conferma, il trasferimento della membrana su EIA e l'incubazione a $41 \pm 0,5$ °C per 20-30 minuti. Con l'ausilio di una lampada fluorescente e di una lente di ingrandimento (2-5x) o di uno stereoscopio, vengono contate le colonie rosa o rosse su mE agar che, poste su EIA, sviluppano un alone nero o marrone rossiccio sulla parte inferiore della membrana filtrante.	Metodo US-EPA 1986. Utilizzo di due terreni di coltura.
2	Metodo delle membrane filtranti. La membrana filtrante contenente i batteri viene posta su mEI agar e incubata per 24 h a $41 \pm 0,5$ °C. Tutte le colonie con un alone blu, indipendentemente dal colore della colonia, sono considerate enterococchi. Lo stereoscopio fornisce la massima visibilità nel conteggio delle colonie.	Metodo US-EPA 1997. Utilizza un solo terreno di coltura, migliora la qualità delle analisi e la abbrevia da 48 a 24 h; utilizza un mE agar modificato variando la concentrazione di trifeniltetrazolium chloride e aggiungendo un cromogeno, l'indoxyl- $\beta$ -D-glucoside.



dell'86, la US-EPA (2000a, b) ha anche riesaminato la letteratura sugli studi epidemiologici sulla relazione tra la qualità delle acque e i disturbi associati alla balneazione condotti da altri studiosi. La maggior parte degli studi utilizzava un programma di ricerca simile a quello degli studi US-EPA condotti negli anni dal 1970 al 1980. Un recente articolo di PRUSS (1998) ha puntualizzato che sono stati condotti nove studi distinti sulle acque marine e almeno due sulle acque dolci da quando l'EPA ha completato i suoi studi nel 1984. I risultati di questi studi sono sintetizzati nella tabella VI.

Nessuno degli studi riesaminati dall'US-EPA presenta prove che rendano necessaria una revisione dei criteri microbiologici di qualità stabiliti nel 1986.

Solo un numero limitato di studi ha cercato di dimostrare una relazione dose-risposta tra la qualità delle acque e i disturbi gastrointestinali.

Si è dimostrato che la presenza e la densità di alcuni organismi sono indicatori di previsione d'insorgenza di malattie migliori di altri. Negli studi US-EPA questi erano *E. coli* e gli enterococchi. Alcuni studi hanno evidenziato che anche altri microrganismi, come gli stafilococchi (SEYFRED *et al.*, 1985), *Clostridium perfringense* e *Aeromonas* spp. (KUEH *et al.*, 1995) mostravano una forte relazione con i disturbi gastrointestinali.

## METODI DI ISOLAMENTO E DI CONTEGGIO US-EPA

### *Escherichia coli*

Gli *E. coli* patogeni sono fenotipicamente differenti tra loro; perciò non sono stati ancora sviluppati metodi microbiologici standard per questi ceppi (APHA, AWWA,

**Tab. IX.** Metodi analitici IRSA-CNR per la determinazione degli *E. coli*.

Metodo	Tecnica	Note
A	Il campione diluito è inoculato in 96 pozzetti da 350 mL contenenti il terreno di coltura disidratato. Dopo 36-72 ore di incubazione a $44 \pm 0,5$ °C si procede alla lettura sotto lampada a ultravioletti (366 nm). <i>E. coli</i> , idrolizzando il 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), produce fluorescenza blu nei pozzetti. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.	Corrisponde alla Norma ISO 9308-3: 1998. Applicabile all'analisi di tutti i tipi di acque superficiali e reflue; particolarmente adatto all'esame di quelle ricche di materiale in sospensione.
B	Disponibile come kit commerciale per l'inoculo del campione, utilizzabile in tubi e piastre multi-pozzetto, monouso (tecnica MPN). Dopo 18 o 24 ore di incubazione a $36 \pm 1$ °C si procede alla lettura dei risultati sotto lampada a ultravioletti (366 nm) esprimendo i risultati come MPN/100 mL.	Riportato negli Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, col nome di Enzyme Substrate Test. Approvato dall'US-EPA, col nome di MMO-MUG test (Colilert). Inserito dall'AOAC in Official Methods of Analysis, col nome di Defined Substrate Technology (Colilert). Applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche oligotrofe, clorate o comunque contenenti <i>E. coli</i> danneggiati.
C	Metodo delle membrane filtranti. Il composto 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla $\beta$ -glucuronidasi di <i>E. coli</i> , rilasciando il composto 4-metilumbelliferone che produce quindi colonie di colore blu-verde, fluorescenti alla luce ultravioletta (366 nm) dopo 18-24 ore di incubazione a $44 \pm 0,5$ °C. I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100ml).	In presenza di elevate concentrazioni di <i>E. coli</i> nel campione, la lettura dei risultati può rivelarsi complicata dalla diffusione e confluenza della fluorescenza prodotta dalle colonie tipiche: il metodo risulta più idoneo all'analisi di acque trattate e comunque poco contaminate.
D	Metodo delle membrane filtranti. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla $\beta$ -glucuronidasi di <i>E. coli</i> che produce quindi colonie di colore blu-verde dopo 18-24 ore a $44 \pm 0,5$ °C.	I risultati sono espressi in UFC/100ml. Il metodo risulta adatto all'analisi di acque reflue.
E	Metodo delle membrane filtranti. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla $\beta$ -glucuronidasi di <i>E. coli</i> che produce quindi colonie di colore grigio-blu dopo 18-24 ore a $36 \pm 1$ °C. I risultati sono espressi in UFC/100ml.	Il metodo risulta idoneo all'analisi di acque trattate e comunque contenenti <i>E. coli</i> danneggiati.
F	Metodo delle membrane filtranti. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla $\beta$ -glucuronidasi di <i>E. coli</i> , che produce quindi colonie di colore blu-verde dopo 18-24 ore a $44 \pm 0,5$ °C. Risultati espressi in UFC/100ml.	Il metodo è stato prodotto su indicazione del Public Health Laboratory Service (PHLS). Il metodo risulta particolarmente idoneo all'analisi di acque superficiali dolci o marine.

WPCF, 1998). Diversamente dagli *E. coli* tipici, alcuni ceppi patogeni, come gli EIEC non fermentano il lattosio, quindi il metodo di fermentazione del lattosio non è applicabile. Inoltre, molte procedure di verifica utilizzano temperature elevate di incubazione, che inibiscono la crescita degli EHEC, oltretanto danneggiano i plasmidi, che codificano la maggior parte dei fattori di virulenza.

Solo i ceppi patogeni che fermentano il lattosio e che non sono danneggiati dalle alte temperature possono essere individuati con il metodo classico delle membrane filtranti, seguito dalla sierotipizzazione e dall'analisi della virulenza. Nella tabella VII sono riassunti i

metodi per la determinazione di *E. coli*.

#### Enterococchi

Vengono descritti nella tabella VIII due metodi di isolamento e di conta degli enterococchi, entrambi basati sulla filtrazione su membrana (MF): quello originale (US-EPA, 1986) e quello più recente (US-EPA, 1997), entrambi raccomandati per isolare i batteri provenienti dalle acque usate a scopo ricreativo e non per altre, come quelle potabili.

#### METODI IRSA-CNR

##### *Escherichia coli*

I metodi descritti consentono

di valutare, in un determinato volume di acqua, la concentrazione di *E. coli* mediante il calcolo statistico del Most Probable Number (MPN, numero più probabile) o con procedure di conta diretta.

Nella tabella IX sono proposti diversi metodi per il rilevamento di *Escherichia coli* (Metodi A-F), tutti basati, non più sulla tradizionale reazione della fermentazione del lattosio, bensì sul rilevamento dell'attività enzimatica della  $\beta$ -glucuronidasi, evidenziabile dall'idrolisi di  $\beta$ -glucuronidi cromogeni o fluorogeni, con rilascio di composti colorati o fluorescenti.

##### Enterococchi

Nelle acque reflue le concentrazioni degli streptococchi fecali per 100 mL di acqua sono comprese generalmente tra  $10^4$ - $10^6$ .

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo degli streptococchi fecali.

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Nella tabella X sono proposti i metodi per il rilevamento degli enterococchi.

#### CONCLUSIONI

La validità come indicatori della qualità delle acque di *E. coli* e degli enterococchi è ampiamente dimostrata dai numerosi studi effettuati negli ultimi anni. Si sottolinea, inoltre, l'impiego specifico di enterococchi per le acque marine e di *E. coli* per quelle dolci.

Le metodologie messe a punto e quelle in fase di pubblicazione consentono una buona rilevabilità di questi indicatori; resta intesa la necessità di lavorare in buona pratica ed in controllo di qualità, affinché i risultati ottenuti siano re-

Tab. X. Metodi analitici IRSA-CNR per la determinazione degli enterococchi.

Metodo	Tecnica	Note
A	Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con una prova presuntiva e una prova di conferma, viene calcolata la densità degli streptococchi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido a base di azide e destrosio per la prova presuntiva e di violetto di etile e azide destrosio per la prova di conferma.	Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta.
B	Metodo del numero più probabile (MPN) in micropiastre da 96 pozzetti. Dalla miscela di quattro soluzioni (MUD/SF medium, soluzione all'acido nalidixico, TTC, MUD) si procede, dopo sterilizzazione per filtrazione, alla distribuzione in aliquote di 100mL in ciascuno dei 96 pozzetti e a successiva disidratazione. Il campione diluito viene versato in aliquote di 200 mL nei rispettivi pozzetti. Le piastre vengono infine incubate a $44 \pm 0,5$ °C per almeno 36 ore.	
C	Metodo delle membrane filtranti (MF). Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento degli streptococchi fecali che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti.	La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

plicabili e confrontabili. La via percorsa per la selezione di questi due indicatori è stata lunga ed è passata anche attraverso studi epidemiologici che consentono di tracciare

il rischio per la popolazione.

Il recepimento del decreto legislativo 152/99 e le sue successive integrazioni introducono, al fine di classificare lo stato ambientale

di un corso d'acqua, valori limite solo per *E. coli*; per gli enterococchi è prescritto solo l'uso dell'indicatore lasciando aperti quindi i limiti.

## Bibliografia

- APHA, AWWA, WPCF, 1998. Standard methods for the examination of Water and Waste-water, 20<sup>th</sup> ed., American Public Health Association, Washington D. C.
- BALARAJAN R., SONI RALEIGH V., YUEN P., WHEELER D., MACHIN D. and CARTWRIGHT R., 1991. Health Risks Associated with Bathing in Sea Water. *Brit. Med. J.*, **303**: 1444-1445.
- BARTRAM J. and REES G., 2000. *Monitoring bathing waters*. E. & FN Spon London, 337 pp.
- BITTON G., FARRAH S.R., RUSKIN R. H., BUTNER J. And CHOU Y.J., 1983. Survival of pathogenic and indicator organism in groundwater. *Groundwater*, **21**: 405-410.
- CABELLI V.J., DUFOUR A.P., McCABE L.J. and LEVIN M.A., 1982. A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **55**: 1306-1314.
- CABELLI V.J., 1983. *Health Effects Criteria for Marine Recreational Waters*. U.S. Environmental Protection Agency. EPA-600/1-80-031: 98.
- CHEUNG W.H.S., CHANG K.C.K. and HUNG R.P.S., 1990. Health Effects of Beach Water Pollution in Hong Kong. *Epidemiol. Infect.*, **105**: 139-162.
- CLEWELL D.B., 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, **9**: 90-102.
- CORBETT S.J., RUBIN J.L., CURRY G.K., and KLEINBAUM D.G., 1993. The Health Effects of Swimming at Sydney Beaches. *Am. J. Public Health*, **83**: 1701-1706.
- DEVRIESE L.A. and POT B., 1995. The genus *Enterococcus*. In: The genera of lactic Acid Bacteria, ed. Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H., **2**, 327-367.
- DIONISIO L.P.C. e BORREGO J.J., 1995. Evaluation of media for the enumeration of faecal streptococci from natural water samples. *Journal of Microbiological Methods*, **23**: 337-351.
- DUFOUR A.P., 1984. Health Effects Criteria for Fresh Recreational Waters. U.S. Environmental Protection Agency. EPA-600/1-84-004.
- FATTAL B., 1987. The association Between Seawater Pollution as Measured by Bacterial Indicators and Morbidity Among Bathers at Mediterranean Bathing Beaches of Israel. *Chemosphere*, **16**: 565-570.
- FELMINGHAM D., WILSON A.P.R., QUINTANNA A.I. and GRUNBERG R.N., 1992. *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clinical Infectious Disease*, **15**: 295-300.
- FERLEY J.P., ZMIROU D., BALDUCCI F., BALEUX B., FERA P., LARBAIGT G., JACQ E., MOISSONNIER B., BLINEAU A. and BOUDOT J., 1989. Epidemiological Significance of Microbiological Pollution Criteria for River Recreational Waters. *International Journal of Epidemiology*, **18**: 198-205.
- FIKSDAL L., TRYLAND I. and NELIS H., 1997. Rapid detection of coliform bacteria and influence of non-target bacteria. *Wat.Sci.Tech.*, **35**: 415-418.
- GELDRICH E.E., 1976. Faecal coliform and faecal streptococci density relationships in waste discharges and receiving waters. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, **6**: 349-369.
- GODFREE A.F., KAY D. and WYER M.D., 1997. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. In Andrew, P.W and Mitchell, J.T. (Eds) The biology of streptococci and enterococci: Supplement to the *Journal of Applied Bacteriology* 83 Symposium, **26**: 110-120.
- HAILE R.W., WITTE J.S., GOLD M., CRESSEY R., MCGEE C., MILLIKAN R.C., GLASSER A., HARAWA N., ERVIN C., HARMON P., HARPER J., DERMAND J., ALAMILLO J., BARRETT K., NIDES M. and WANG G., 1996. The Health Effects of Swimming in Ocean Water Contaminated by Storm Drain Runoff. *Epidemiology*, **10**: 355-363.
- HANES N.B. and FRAGALA R., 1967. Effect of seawater concentration on the survival of indicator bacteria. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **39**: 97.
- HARDIE J.M. and WHILEY R.A., 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **83**: 1S-11S.
- ITALIA, 1999. Decreto legislativo 11-5-99, n.152 "Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole" Supplemento ordinario alla *G.U. della Repubblica Italiana* n. 124 del 29 maggio 1999.
- KAY D., FLEISHER J.M., SALMON R.L., JONES F., WYER M.D., GODFREE S.F., ZELENKAUCH-JACQUOTTE Z. and SHORE R., 1994. Predicting Likelihood of Gas-

- troenteritis from Sea Bathing: Results from Randomized Exposure, *Lancet*, **344**: 905-909.
- KAY D., 1994. *Summary of epidemiological evidence from the UK sea bathing research programme*. Appendix 5 in Anon (1994d). Selected Committee on the European Communities, Bathing Water.
- KESWICK B.H., GERBA C.P., SECOR S. L. and CECH I., 1982. Survival of enteric viruses and indicator bacteria in groundwater. *Journal of Environmental Science and Health*, **A 17** (6): 903-912.
- KUEH C.S.W., TAM T.-Y., LEE T.W., WANG S.L., LLOYD O.L., YU I.T.S., WANG T.W., TAM J.S. and BASSETT D.C.J., 1995. Epidemiological Study of Swimming-Associated Illnesses Relating to Bathing-Beach Water Quality, *Water Science Tech.*, **31**: 1-4.
- LEVINE M.M., 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Inf. Dis.*, **155** (3).
- MCBRIDE G.B., SALMOND C.E., BANDARANAYAKE D.R., TURNER S.J., LEWIS G.D. and TILL D.G., 1998. Health Effects of Marine Bathing in New Zealand. *International Journal of Environmental Health Research*, **8**: 173-189.
- McFETERS G.A. and STUART D.J., 1974. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in wellwater. *Applied Microbiology*, **27**: 823-829.
- MEGRAN D.W., 1992. Enterococcal endocarditis. *Clinical Infectious Disease*, **15**: 63-71.
- MORRISON D., WOODFORD N. And COOKSON B., 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **83**: 89S-99S.
- MULLER E.E., EHELERS M.M. and GRABOW W.O.K., 2001. The occurrence of *E. coli* O157:H7 in south African water sources intended for direct and indirect human consumption. *Wat. Res.*, **35**: 3085-3088.
- MURRAY B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, **3**: 46-65.
- OMURA T., ONUMA M. and HASCHIMOTO Y., 1982. Viability and adaptability of *E. coli* and *Enterococcus* group to salt water high concentration of sodium chloride. *Water Science and Technology*, **14**: 115-126.
- PARVEEN S., HODGE N.C. STALL R.E., FARRAH S.R. and TAMPLIN M.L., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *E. coli*. *Wat. Res.*, **35**: 379-386.
- PRUSS A., 1998. Review of Epidemiological Studies on Health Effects from Exposure to Recreational Water. *International J. Epidemiology*, **27**: 1-9.
- SEYFRIED P.L., TOBIN R.S., BROWN N.E. and NESS P.F., 1985. A Prospective Study of Swimming-related Illness II. Morbidity and the Microbiological Quality of Water. *Am. J. Public Health*, **75**: 1071-1075.
- SHERMAN J.M., 1937. The streptococci. *Bacteriological Reviews*, **1**: 3-97.
- US-EPA, 1986. *Ambient Water Quality Criteria for Bacteria- 1986*. Office of Water Regulation and Standards, Criteria and Standards Division, Washington DC. EPA-440/5-84/002
- US-EPA, 1997. *Method 1600: membrane filter test methods for enterococci in water*. Office of Water, Washington, DC. EPA-821/R-97/004.
- US-EPA, 1998. *Bacterial Water Quality Standards Status Report*. Office of Water Regulation and Standards, Criteria and Standards Division, Washington DC. EPA-823R-98-003
- US-EPA, 2000a. *Implementation guidance for "Ambient Water Quality Criteria for Bacteria- 1986"*. Office of Water Regulation and Standards, Criteria and Standards Division, Washington DC. EPA-823-D-00-001
- US-EPA, 2000b. *Improved Enumeration Methods for the Recreational Water Quality Indicators: Enterococci and Escherichia coli*. EPA-821/R-97-004. US-EPA, Washington
- VON SCHIRNDING Y.E.R., Kfir R., CABELLI V., FRANKLIN L. and JOUBERT G., 1992. Morbidity Among Bathers Exposed to Polluted Seawater - A Prospective Epidemiological Study. *South African Medical Journal*, **81**: 543-546.
- WILLIAMS A.M., RODRIGUES U.M. and COLLINS M.D., 1991. Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Research in Microbiology*, **142**: 67-74.
- WYER M.D., JACKSON JF., KAY D., YEO J. And DAWSON H., 1994. An assessment of the impact of inland surface water input to the bacteriological quality of coastal waters. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management*, **6**: 459.