

Attendibilità di metodi utilizzati per la determinazione di coliformi ed *Escherichia coli* in acque da destinare al consumo umano

Elvira Barone¹, Luciana Di Pardo¹, Antonella Melloni¹,
Gianluca Chiaretti², Lucia Bonadonna^{2*}, Annamaria Manuppella¹

¹ ARPA Molise; Dipartimento Provinciale di Isernia – Via Giovanni Berta, Palazzo Provincia - 86170 Isernia

² Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

* Referente per la corrispondenza: fax 0649902390; lucybond@iss.it

Pervenuto il 25.1.2006; accettato il 21.2.2006

Riassunto

Il metodo UNI EN ISO 9308-1 per la determinazione dei coliformi e di *Escherichia coli* nelle acque ha limiti legati alla difficoltà di interpretazione dei risultati ed alle discrepanze osservate in base alla nuova organizzazione tassonomica della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Pertanto, è stato condotto uno studio per la ricerca di coliformi ed *E. coli* analizzando con metodi diversi, in parallelo, campioni di acqua da destinare al consumo umano. Oltre al metodo UNI EN ISO 9308-1 che prevede l'uso del terreno al Lattosio TTC Tergitol agar sono stati utilizzati i metodi selettivi che comportano l'impiego dei terreni mEndo Agar Les (coliformi) e Chromogenic *E. coli* Agar. Sono stati analizzati 98 campioni di acqua e percentuali elevate degli isolati, variabili tra l'84% e il 98%, sono state sottoposte a prove biochimiche di conferma. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la crescita di flora interferente sul terreno Lattosio TTC Tergitol agar è il più grosso limite del metodo, se considerate, soprattutto, sia le alte percentuali di colonie ossidasi positive sia i falsi negativi rilevati durante l'indagine. Inoltre, le prove di conferma più tradizionali, soprattutto quella relativa alla produzione di indolo, non sembrano essere sufficienti per discriminare la specie. Risultati diversi ed equiparabili sono stati osservati quando erano presi in considerazione i coliformi. Anche se l'esecuzione di test di conferma aggiuntivi potrebbe sopperire ai limiti del metodo, la procedura comporta comunque difficoltà legate all'esatta interpretazione dei risultati, ai costi addizionali e all'allungamento dei tempi di risposta delle analisi.

PAROLE CHIAVE: Acqua / Lattosio TTC /metodi analitici / microbiologia / coliformi / *E. coli*

Coliforms and *Escherichia coli* in water to be treated for human consumption: assessment of confirmation tests

The UNI EN ISO 9308-1 standard for the enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in water has limits due to difficulty in the reading of results and to discrepancies concerning the recent taxonomy of the *Enterobacteriaceae* family. Two alternative methods, a chromogenic media, the Chromogenic *E. coli* Agar for *E. coli* and the more traditional mEndo Agar Les for coliforms, were used in parallel with the reference standard that uses the substrate Lactose TTC Tergitol Agar. 98 water samples were analyzed and high percentages of isolates, ranging between 84% and 98%, were subjected to biochemical confirmation tests. Results showed that the presence of disturbing background growth is a serious drawback of the UNI EN ISO 9308-1 standard with particular concern to high numbers of false negative isolates and oxidase positive colonies, these former recovered in the coliforms plates. Furthermore, the use of indole production test is not an adequately specific test for confirmation. The substrate gave equivalent results when compared with the mEndo Agar Les. Additional confirmation tests of isolates from Lactose TTC Tergitol agar could help to overcome difficulties associated to interpretation of results. Nevertheless the regular use of the UNI EN ISO 9308-1 method remains uncomfortable because human resources, additional costs and time for analysis results have to be involved.

KEY WORDS: Analytical methods / Lactose TTC / microbiology / water / coliforms / *E. coli*

INTRODUZIONE

Il gruppo dei coliformi, in cui è compresa la specie *E. coli*, fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* che, ad oggi, include approssimativamente 20 generi, tra cui alcuni patogeni enterici, quali *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. Sulla base degli studi di tassonomia tradizionale, la conoscenza del gruppo dei coliformi

non ha fatto progressi fino al passato recente; per lungo tempo, infatti, è stata basata su criteri definiti nella prima metà del '900 (BREED e NORTON, 1937; PARR, 1939). Solo negli anni più recenti lo sviluppo di più moderni metodi di identificazione (genetico-molecolari, principalmente) ha radicalmente trasformato la

loro classificazione, distinguendo e aumentando il numero di specie che, ora circa 60, sono state inquadrare in sottoinsiemi sulla base di caratteristiche biochimiche ed immunologiche (LECLERC, 1990).

Oggi, in accordo con il nuovo ordinamento tassonomico, è riconosciuto che tutte le specie di coliformi sono β -galattosidasi positive, ed *E. coli*, indicatore primario di contaminazione fecale, è anche β -glucuronidasi positivo. Inoltre, è stato anche accertato che 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 (GAVINI *et al.*, 1985).

I nuovi criteri tassonomici di classificazione dei coliformi hanno avuto, come conseguenza, importanti ripercussioni anche sui metodi messi a punto per la loro ricerca e per la loro conferma ed identificazione. 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 classici, può raggiungere, nel complesso, le 72 ore.

Pertanto, a partire da alcuni anni, sulla base del nuovo sistema di classificazione, sono stati messi a punto metodi cosiddetti "rapidi", che non richiedono prove di conferma degli isolati, per la determinazione di coliformi e di *E. coli* nelle acque e negli alimenti (MANAFI, 1996; BONADONNA, 2003). Utilizzano infatti substrati modificati con l'aggiunta di composti cromofori o fluorogeni che vengono idrolizzati dagli specifici enzimi, la β -D-galattosidasi e la β -D-glucuronidasi, rispettivamente. Taluni di questi metodi, alcuni dei quali normati a livello internazionale (ISO) ed altri riconosciuti da enti di standardizzazione (AOAC, EPA), stanno trovando ampia applicazione nei laboratori che effettuano i controlli di qualità, anche perché sono di facile manualità e meno esposti ad interpretazioni soggettive e ad errori dell'operatore.

Uno dei metodi tradizionali per la ricerca di *E. coli* e dei coliformi nelle acque è previsto dalla norma UNI EN ISO 9308-1 (UNI EN ISO 9308-1, 2001) Il metodo, basato sulla tecnica della filtrazione su membrana, utilizza un terreno colturale elaborato nel 1947 (CHAPMAN, 1947) che sfrutta l'usuale 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. Il metodo mostra limiti imputabili a scarsa selettività del substrato per crescita di batteri interferenti e non appartenenti alle specie ricercate, impossibilità di distinguere, in base alla mor-

fologia delle colonie e alla temperatura, *E. coli* dai coliformi, obbligatorietà di procedere a prove di conferma tradizionali delle colonie sospette, con conseguente aumento dei costi e dei tempi di risposta delle analisi e, non ultimo, difficoltà di interpretazione dei risultati. Dubbi e riserve sull'opportunità di utilizzare il metodo UNI EN ISO 9308-1 per la ricerca di coliformi ed *Escherichia coli* sono stati avanzati da molti laboratori che operano nel settore dei controlli della qualità delle acque. Per la verifica sia delle eventuali difficoltà legate all'uso routinario del metodo sia dell'appartenenza al gruppo dei coliformi dei singoli microrganismi isolati sulla base delle tipiche caratteristiche morfologiche/cromatiche, è stata quindi effettuata una valutazione comparativa tra prove analitiche per la conferma dei microrganismi ricercati. Pertanto, scopo del presente lavoro è stato quello di verificare le risposte degli isolati, cresciuti sui diversi terreni colturali utilizzati, a singole prove di conferma tradizionali e non tradizionali, anche in considerazione delle nuove acquisizioni scientifiche che hanno interessato la famiglia delle *Enterobacteriaceae* a cui coliformi ed *Escherichia coli* appartengono. Per la ricerca dei coliformi sono stati utilizzati, come metodi di isolamento primario, la procedura descritta in UNI EN ISO 9308-1 che prevede l'uso del terreno Lattosio TTC Tergitol agar e il metodo che usa il terreno mEndo Agar Les, terreno tradizionale, ampiamente sperimentato per la determinazione del parametro. Per il rilevamento di *Escherichia coli* è stato impiegato, oltre al metodo UNI EN ISO 9308-1, il metodo che prevede l'esecuzione delle analisi con il terreno Chromogenic *E. coli* Agar, substrato di più recente formulazione contenente un cromogeno.

MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti ed analizzati campioni di acqua da destinare al consumo umano che presentavano concentrazioni variabili tra 5–20 UFC/100 mL per *E. coli* e tra 10–30 UFC/100 mL per i coliformi. È stato quindi selezionato un totale di 98 campioni, di cui 51 analizzati per la determinazione di *E. coli* e 47 per quella dei coliformi a 37°C.

Procedura per la determinazione di *E. coli*

L'analisi è stata svolta in parallelo utilizzando il metodo UNI EN ISO 9308-1 al Lattosio TTC Tergitol agar (Tergitolo TTC) (Oxoid) e il metodo che prevede l'uso del Chromogenic *E. coli* Agar (EcX Gluc) (Biolife). Le procedure analitiche sono state applicate secondo le specifiche tecniche (UNI EN ISO 9308-1, 2001; APAT, 2003). Per ogni campione, sono state filtrate due aliquote di identico volume (100 mL) attraverso membrane filtranti sterili di acetato di cellulosa (porosità nominale di 0,45 μ m); l'incubazione per

entrambi i terreni è stata eseguita per 22 ± 2 ore a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ nonostante che, sul terreno EcX Gluc, la temperatura di incubazione prevista dal metodo standard sia 44°C . Scopo della modifica era quello di uniformare le temperature dei due metodi messi a confronto ma, soprattutto, di evitare di sottoporre le cellule del microrganismo ricercato ad ulteriore *stress*, termico in questo caso, considerando che il terreno è altamente selettivo, contenente sali biliari e con attività differenziale esplicata dal cromogeno X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3 indolil β -D-glucuronide).

Sul terreno al Tergitolo TTC sono state contate le colonie di colore giallo e giallo-arancio che presentavano colorazione gialla sul retro del terreno, mentre sul terreno EcX Gluc sono state contate le colonie di colore blu-verde.

Tutte le colonie sono state considerate come *E. coli*-presuntive e sono state saggiate per la loro termotolleranza (crescita a 44°C), l'assenza dell'enzima citocromossidasi (OX), la fermentazione del lattosio, la produzione di indolo, l'idrolisi del cromogeno 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG). Pertanto, una percentuale elevata di colonie cresciute su ciascuno dei due terreni è stata sottoposta a prove di conferma come di seguito descritto. In primo luogo si è proceduto all'isolamento degli isolati su Brain Heart Infusion Agar (Biolife); dopo incubazione per 24 ore a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$, è stato effettuato il test della citocromossidasi con kit del commercio (Oxoid); le colonie ossidasi negative sono state seminate su Mac Conkey Agar (Oxoid) ed incubate per 24 ore a $44^{\circ}\text{C}\pm 1$. Gli stipiti lattosio fermentanti (colorazione rosata delle colonie) sono stati seminati su Brodo Lauryl Pepto Bios addizionato con MUG (Biolife) ed incubati per 24 ore a $44^{\circ}\text{C}\pm 1$. Sulle brodocolture risultate positive per l'idrolisi del MUG è stata effettuata la prova della produzione di indolo aggiungendo alcune gocce di reattivo di Kovac's (Merck). In questo caso, sono state considerate positive le brodocolture che hanno mostrato la produzione di un anello rosso superficiale.

Inoltre, alcuni degli isolati ossidasi negativi sono stati identificati con il Sistema Vitek (Biomérieux).

Procedura per la determinazione dei Coliformi

L'analisi è stata svolta in parallelo utilizzando il metodo UNI EN ISO 9308-1 al Lattosio TTC Tergitol agar (Tergitolo TTC) (Oxoid) e il metodo che prevede l'uso dell'mEndo Agar Les (mEndo Les) (Oxoid). Le procedure analitiche sono state applicate secondo le specifiche tecniche (UNI EN ISO 9308-1, 2001; APAT, 2003.). Per ogni campione, sono state filtrate due aliquote di identico volume (100 mL) attraverso membrane filtranti sterili di acetato di cellulosa (porosità nominale di $0,45\ \mu\text{m}$); l'incubazione per entrambi i

terreni è stata eseguita per 22 ± 2 ore a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$.

Sul terreno al Tergitolo TTC sono state contate le colonie di colore giallo e giallo-arancio che presentavano colorazione gialla sul retro del terreno, mentre sul terreno mEndo Les sono state contate le colonie di colore rosso con sfumature metalliche.

Anche in questo caso tutte le colonie sono state considerate come coliformi presuntivi e la loro conferma è stata effettuata sulla base delle loro caratteristiche: assenza dell'enzima citocromossidasi (OX), capacità di fermentare il lattosio e di idrolizzare l'o-nitrofenil- β -D-galattopiranoside (ONPG). Dopo isolamento degli stipiti su Brain Heart Infusion Agar (Biolife) e incubazione per 24 ore a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$, è stato effettuato il test della citocromossidasi con kit del commercio (Oxoid). Le colonie ossidasi negative sono state seminate su Mac Conkey Agar (Oxoid) ed incubate per 24 ore a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$. Sulle colonie lattosio positive è stata effettuata la prova dell'idrolisi dell'o-nitrofenil- β -D-galattopiranoside (ONPG) (Microsafe). A tal fine, ciascuna colonia da saggiare è stata stemperata in soluzione salina (0,8% NaCl) e alla sospensione è stato aggiunto un dischetto di carta bibula imbibito della soluzione di ONPG. La sospensione è stata incubata per 2 ore a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$. In questo caso, lo sviluppo di una colorazione gialla confermava la presenza di coliformi.

Analisi statistica

L'elaborazione dei dati è stata eseguita con il programma statistico SPSS v 11.0.

RISULTATI

Confronto di metodi per *Escherichia coli*

Dall'analisi dei 51 campioni analizzati con il terreno Tergitolo TTC sono state contate 656 colonie con morfologia tipica. Di queste, 596 (91%) sono state sottoposte alle prove biochimiche di conferma, mentre dai corrispondenti campioni analizzati con il terreno EcX Gluc sono state contate 400 colonie tipiche, di cui il 98% (392) è stato sottoposto a conferma.

In tabella I è riportato il numero di *E. coli* presuntivi isolati con ciascun metodo e sottoposti al test della citocromossidasi e della crescita a 44°C . Allo screening iniziale, l'8% (da Tergitolo TTC) e il 3% (da EcX Gluc) delle colonie sottoposte a conferma, anche se con caratteristiche morfologiche tipiche su ciascuno dei due terreni, sono risultati positivi alla prova della citocromossidasi o negativi alla crescita a 44°C .

Le rimanenti colonie, ossidasi negative, hanno fornito risultati diversi in funzione del terreno di isolamento da cui derivavano e delle caratteristiche biochimiche considerate. In tabella II sono riportati i risultati ottenuti dalle conferme delle colonie di *E. coli* presuntive e

ossidasi negative, raggruppando, appaiate, le caratteristiche per la fermentazione del lattosio (LAC)/idrolisi del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG) e per la produzione di indolo (IND)/idrolisi del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG). Il calcolo del χ^2 , elaborato sulla base della differenza tra le percentuali medie dei batteri confermati, ha dimostrato l'esistenza di una differenza statisticamente significativa dei dati ottenuti con i due metodi messi a confronto ($p < 0,01$), quando considerati appaiati il test della produzione di indolo e quello per l'idrolisi del MUG. I dati appaiati relativi alla fermentazione del lattosio/idrolisi del MUG presentavano invece percentuali pressoché simili per gli isolati da entrambi i terreni selettivi, se considerati i ceppi lattosio-non fermentanti; diverse apparivano le percentuali di conferma quando erano presi in considerazione i ceppi β -glucuronidasi.

In tabella III sono riportati l'elenco delle specie identificate e le risposte ai singoli test di conferma degli isolati selezionati tra gli isolati *E. coli* presuntivi e

cresciuti con i metodi al Tergitolo TTC e all'EcX Gluc. I risultati ottenuti, nonostante il basso numero di identificati, evidenziano che su entrambi i terreni possono crescere colonie appartenenti a specie diverse da quella ricercata. Appare soprattutto interessante il dato relativo allo sviluppo di ceppi di *E. coli* falsi negativi se considerati i test della fermentazione del lattosio e della produzione di indolo. Inoltre, risulta possibile la crescita, anche in questo caso su entrambi i terreni, di ceppi falsi positivi, identificati come *Klebsiella oxytoca*, microorganismo in grado di produrre indolo come *E. coli*.

Identificando due gruppi di dati sulla base del calcolo della mediana (CAVALLI SFORZA, 1992), è stata calcolata la percentuale di conferma degli isolati in funzione dell'effetto dell'affollamento delle colonie cresciute su ciascun terreno. I due gruppi selezionati dal terreno Tergitolo TTC, il primo considerando un numero di colonie comprese nella classe 1-12 UFC ("membrana poco affollata") e il secondo con un numero di colonie da 13 a >18 UFC ("membrana molto affollata"), hanno

Tab. I. Numero di *E. coli* presuntivi isolati con ciascun metodo e sottoposti al test della citocromossidasi e della crescita a 44°C.

Metodo	N° colonie presuntive isolate	N° colonie presuntive sottoposte a conferma	mancata crescita a 44°C		Colonie OX positive	
			N°	(%)	N°	(%)
ISO 9308-1 (Tergitolo TTC)	656	596	41	(7)	6	(1)
EcX Guc	400	392	4	(1)	6	(2)
N° Totale	1056	988	45	(5)	12	(1)

OX= citocromossidasi

Tab. II. Risultati ottenuti dalle conferme delle colonie di *E. coli* presuntive, ossidasi negative, raggruppando, appaiate, le caratteristiche per la fermentazione del lattosio (LAC)/idrolisi del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG) e per la produzione di indolo (IND)/idrolisi del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG). La percentuale è calcolata sul numero totale di *E. coli* presuntivi sottoposti a conferma.

Metodo	LAC/MUG					IND/MUG				
	+/+ (%)	+/- (%)	-/+ (%)	-/- (%)	N°	+/+ (%)	+/- (%)	-/+ (%)	-/- (%)	N°
ISO 9308-1(Tergitolo TTC)	328 (55)	194 (33)	27 (5)	0	549	305 (51)	84 (14)	50 (8)	110 (18)	549
EcX Gluc	322 (82)	52 (13)	8 (2)	0	382	322 (82)	25 (6)	31 (8)	4 (1)	382
N° Totale	650 (62)	246 (23)	35 (3)	0	931	627 (59)	109 (10)	81 (7)	114 (11)	931

+ = positivo; - = negativo

Tab. III. Numero e specie di microrganismi identificati, selezionati tra gli isolati *E. coli* presuntivi e cresciuti con i metodi al Tergitolo TTC e all'EcX Gluc con le rispettive risposte ai singoli test di conferma.

Fermentazione Lattosio	Produzione Indolo	Idrolisi MUG	Specie identificate	N° isolati con metodo Tergitolo TTC	N° isolati con metodo EcX Gluc
+	-	+	<i>Escherichia coli</i>	5	4
-	+	-	<i>Escherichia coli</i>	2	1
-	+	+	<i>Escherichia fergusonii</i>	2	
+	+	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	
-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2
Totale identificati				15	7

+ = positivo; - = negativo

fornito risposte diverse in relazione al numero di colonie presenti. Infatti, la percentuale media di isolati confermati è risultata pari a 56%, quando considerate le membrane poco affollate, e a 47% per gli isolati da membrane molto affollate; una differenza statisticamente significativa tra i valori ottenuti è stata calcolata con il t-Test ($p=0,01$). Diversamente, per il terreno EcX Gluc, i due gruppi selezionati, il primo con un numero di colonie comprese tra 1 e 8 UFC e il secondo con un numero tra 9 e >14 UFC, la differenza calcolata con il t-Test tra le percentuali medie di isolati confermati (77% e 88%, rispettivamente) non ha fornito differenze significative tra il numero degli isolati confermati cresciuti su membrane “poco affollate” e “molto affollate”.

Confronto dei metodi per i coliformi

Dall'analisi dei 47 campioni analizzati con il terreno al Tergitolo TTC, un totale di 657 colonie ha mostrato morfologia tipica (colore giallo-arancio con colorazione gialla sul retro). Di queste, 562 (86%) sono state sottoposte alle prove biochimiche di conferma. Dagli stessi campioni analizzati con il terreno mEndo Les sono stati contati un totale di 726 isolati, 612 dei quali (84%) sono stati sottoposti alle stesse prove di conferma (Tab. IV). Elevato è risultato il numero di colonie ossidasi positive rilevate su entrambi i terreni. Infatti, il 40% delle colonie isolate sul terreno al Tergitolo TTC e il 31% di quelle isolate sull'mEndo Les erano ossidasi positive, e quindi non appartenevano al gruppo degli microrganismi ricercati, nonostante la rispondenza della loro morfologia a quella considerata tipica dei coliformi.

Anche in questo caso, identificando due gruppi di dati sulla base del calcolo della mediana (CAVALLI SFORZA, 1992), è stata calcolata la percentuale di conferma degli isolati in funzione dell'effetto dell'affollamento delle colonie cresciute su ciascun terreno. I due gruppi selezionati dal terreno Tergitolo TTC, il primo considerando un numero di colonie comprese nell'intervallo 1÷13 UFC (“membrana poco affollata”) e il secondo con un numero di colonie da 14 a >30 UFC (“membrana

molto affollata”), hanno fornito risposte diverse in relazione al numero di colonie presenti. Infatti, la percentuale media di isolati confermati è risultata pari a 45%, quando considerate le membrane poco affollate e a 66% per gli isolati da membrane molto affollate; una differenza statisticamente significativa tra i valori ottenuti è stata calcolata con il t-Test ($p=0,01$). Analogamente, per il terreno mEndo Les, i due gruppi selezionati, il primo con un numero di colonie comprese tra 1 e 15 UFC e il secondo con un numero tra 16 e >29 UFC, la differenza calcolata con il t-Test tra le percentuali medie di isolati confermati (72% e 52%, rispettivamente) ha fornito differenze significative ($p=0,01$) tra il numero degli isolati confermati cresciuti su membrane “poco affollate” e “molto affollate”.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'adeguamento a nuove procedure analitiche comporta, di norma, iniziali difficoltà operative. Questo potrebbe essere il caso del metodo UNI EN ISO 9308-1 per la determinazione di coliformi ed *E. coli* nelle acque. Tuttavia, la complessità del metodo, dovuta non solo alla necessità di procedere allo svolgimento di prove di conferma per tutti gli isolati, ma anche alle difficoltà di lettura dei risultati, da interpretare con attenzione e competenza, a cui si aggiungono i tempi lunghi per l'ottenimento degli esiti definitivi dell'analisi, dovrebbe far considerare la necessità di utilizzare metodi più idonei e rapidi nelle risposte.

Nelle specifiche condizioni di analisi e per i campioni di acqua sottoposti ad esame, è emersa la scarsa selettività del metodo di riferimento che ha permesso la crescita di un'ampia varietà di batteri interferenti in grado di svilupparsi, presumibilmente, grazie sia alla composizione del substrato di crescita, sia alla temperatura di incubazione non selettiva (37°C). A dimostrare questo aspetto è soprattutto l'alta percentuale di isolati ossidasi positivi rilevati nei campioni analizzati per i coliformi (40% di quelli sottoposti a conferma). Anche sul terreno colturale più tradizionale per il rilevamento dei coliformi, l'mEndo Les, la percentuale di

Tab. IV. Coliformi presuntivi isolati con il metodo Tergitolo TTC e con il metodo mEndo Les, suddivisi in base alle risposte ottenute dalle prove di conferma.

Terreno	N° colonie isolate	N° colonie sottoposte a conferma	% colonie sottoposte a conferma	Test di conferma				
				Fermentazione Lattosio	Idrolisi ONPG	Enzima OX	N° colonie	%
Tergitolo TTC	657	562	86	+	+	-	338	(60)
						+	224	(40)
mEndo Les	726	612	84	+	+	-	421	(69)
						+	191	(31)
Totale	1383	1174	85					

Enzima OX = citocromossidasi; + = positivo; - = negativo

ossidasi positivi è risultata molto elevata (31%).

Dal confronto dei metodi utilizzati per la determinazione di *E. coli*, sembrerebbe possibile ipotizzare che i due terreni culturali siano in grado di sostenere la crescita di frazioni di popolazioni microbiche, almeno in parte, dissimili. Infatti, considerando che ogni campione è analizzato in parallelo con i due metodi, appare che, tra gli isolati confermati, il metodo UNI EN ISO 9308-1 sia stato in grado di rilevare un numero inferiore di organismi capaci di idrolizzare il MUG (60%), contro il terreno EcX Gluc su cui il 90% dei microrganismi cresciuti e confermati si caratterizzava per positività a questa prova. D'altra parte, percentuali diverse di confermati sono state calcolate se si osservano i microrganismi risultati indolo negativi (falsi negativi se basati solo sul test di conferma tradizionale): il 27% e il 50% di *E. coli* rilevati sul Tergitolo TTC e sul EcX Gluc, rispettivamente, manifestavano questa caratteristica. Risultati, invece, abbastanza simili sono stati calcolati quando veniva preso in considerazione il test della fermentazione del lattosio: all'88% di positivi confermati per il metodo al Tergitolo TTC corrispondeva il 95% di confermati sul terreno cromogeno.

I risultati ottenuti dalle identificazioni delle colonie hanno messo in evidenza che la crescita di microrganismi falsi positivi e falsi negativi può verificarsi su tutte e due i terreni utilizzati per il rilevamento di *E. coli*. Sembra, infatti, che i test più tradizionali (fermentazione del lattosio e produzione di indolo) possano fornire risposte che rendono difficile l'interpretazione finale dei risultati. In questo caso, d'altra parte, è noto che *Klebsiella oxytoca* è in grado di produrre indolo come la specie *E. coli* e alcuni suoi stipiti possono essere positivi all'idrolisi del MUG (ALONSO *et al.*, 1999).

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO J.L., SORIANO A., CARBAJO O., AMOROS I., GARELICK H., 1999. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. *Applied and environmental Microbiology*, **65**: 3746-3749.
- APAT, 2003. *Manuale Metodi Analitici per le acque*, 2004. Volume III, Sezione 7000. ISBN 88-448-0083-7. Roma, APAT 29/2003.
- BONADONNA L., 2003. Rapid analysis of microbial contamination of water. In: Tothill I.E. (ed.), *Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance*. Woodhead Publishing, London: 161-182.
- BREED R.S., NORTON J.F., 1937. Nomenclature for the colon group. *American Journal of Public Health*, **27**: 560-563.
- CAVALLI SFORZA G., 1992. *Analisi statistica per medici e biologi*. Bollati Boringhieri Ed., ISBN 8833954927. Milano, 260 pp.
- CHAPMAN G.H., 1947. A superior culture medium for the enumeration and differentiation of coliforms. *Journal of Bacteriology*, **53**: 504.
- Altra considerazione che emerge dallo studio riguarda l'influenza della numerosità delle colonie rilevate sulle membrane poste sui diversi terreni utilizzati, rispetto alla percentuale di isolati confermati. Il calcolo del t-Test ha permesso di mettere in evidenza l'esistenza di una differenza significativa dei dati, quando considerati i terreni Tergitolo TTC (per entrambi i parametri) ed mEndo Les. In questi casi, maggiore è stato l'"affollamento" di colonie presenti sulle membrane, minore è risultato il numero di colonie confermate. Diversamente, per quanto riguarda il terreno EcX Gluc, la numerosità delle colonie, nell'ambito dei valori considerati, non sembra influire sul numero di isolati confermati.
- In conclusione, il metodo UNI EN ISO 9308-1 si è dimostrato poco selettivo, come dimostrato anche da altri autori (SCHETS *et al.*, 2002); inoltre, le prove di conferma più tradizionali, soprattutto quella relativa alla produzione di indolo, non sembra siano sufficienti per discriminare la specie *E. coli*. L'esecuzione di prove addizionali, quali quella relativa all'idrolisi del MUG, potrebbe permettere una più facile ed esatta interpretazione degli esiti delle analisi. Tuttavia, in base ai risultati ottenuti, appare evidente che l'impiego del terreno al Tergitolo TTC per la determinazione di *E. coli* e coliformi nelle acque abbia diversi limiti: il metodo comporta un maggiore utilizzo di risorse umane e economiche per lo svolgimento delle conferme biochimiche delle colonie isolate e ciò rende il suo utilizzo svantaggioso anche in termini di tempo per l'ottenimento dei risultati delle analisi.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Claudia Cataldo per l'attività svolta in ambito bibliografico.

GAVINI F., LECLERC H., MOSSEL D.A.A., 1985. *Enterobacteriaceae* of the «coliform group» in drinking water: identification and worldwide distribution. *Systematic Applied Microbiology*, **6**: 312-318.

LECLERC H., 1990. Indicateurs bactériens et contrôle de qualité des eaux minérales naturelles. In: Atti Meeting internazionale "Acque minerali naturali", Pisa, 23-24-25 maggio 1990.

MANAFI M., 1996. Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. *International Journal of Food Microbiology*, **31**: 45-58.

PARR L.W., 1939. Coliform bacteria. *Bacteriological Reviews*, **3**: 1-37.

SCHETS F.M., NOBEL P.J., STRATING S., MOOIJMAN K.A., ENGELS G.B., BROUWNER A., 2002. EU Drinking Water directive reference methods for enumeration of total coliforms and methods. *Letters in Applied Microbiology* **34**: 227-231.

UNI EN ISO 9308-1: 2001. Qualità dell'acqua. Rilevamento ed enumerazione di *Escherichia coli* e coliformi - Parte 1: Metodo della filtrazione su membrana.