

Determinazione di *Escherichia coli* in acque sotterranee con un metodo rapido automatizzato

Lucia Bonadonna*, Claudia Cataldo, Maurizio Semproni

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

* Referente per la corrispondenza: lucybond@iss.it

Pervenuto il 5.8.2008; accettato il 15.12.2008

Riassunto

Sono stati analizzati campioni di acqua di falda contenente microflora ambientale e concentrazioni mediamente basse di *Escherichia coli* con un metodo rapido automatizzato, il sistema Colifast® Analyzer (CA), basato sul rilevamento di specifiche attività enzimatiche del microorganismo ricercato. Dai risultati ottenuti è emerso che la tecnica è in grado di fornire un'alta percentuale di conferme, alta specificità e selettività e tempi molto ridotti per il rilevamento della specie in campioni di acqua sia con bassi livelli di contaminazione (≤ 3 U.F.C./100 mL) sia con livelli di contaminazione maggiori ($4 \div 150$ U.F.C./100 mL). I vantaggi del metodo risiedono prevalentemente nella rapidità di rilevamento dei microrganismi *target*, consentendo così di ottenere risposte in tempi più rapidi rispetto ai convenzionali metodi colturali, vantaggio non trascurabile in un ambito di tutela della salute pubblica.

PAROLE CHIAVE: Acqua / Colifast / *E. coli* / indicatori batterici / metodi rapidi

Recovery of *Escherichia coli* in groundwater with a rapid automated method

Untreated groundwater containing background flora and on average low loads of *Escherichia coli* was analyzed with a rapid automated method, the Colifast® system (CA) based on the detection of specific enzyme activity of *E. coli*. Results showed a good performance of the rapid technique both for its high confirmation rate, specificity, selectivity and time to detect the target microorganisms. CA technology showed to be suitable for analysis of both very clean water samples (≤ 3 CFU/100 mL) and higher contaminated water ($4 \div 150$ CFU/100 mL). Its main advantage consists in the recovery swiftness of the target microorganisms. That allows to obtain results more rapidly when compared with the traditional cultural methods, principal concern for the safeguard of public health.

KEY WORDS: Bacterial indicators / Colifast / *E. coli* / rapid methods / water

INTRODUZIONE

I requisiti microbiologici perché un'acqua possa essere definita potabile sono l'assenza di microrganismi patogeni e, in un volume non inferiore a 100 mL, di indicatori di contaminazione fecale (OECD, 2003).

I metodi colturali tradizionali sono spesso caratterizzati da interferenze da parte della microflora ambientale, da scarsa specificità e da un basso livello di rilevamento dei microrganismi a crescita lenta o stressati (TALLON *et al.*, 2005). Dal punto di vista pratico, questi metodi sono laboriosi e, richiedendo lo svolgimento di prove di conferma, inadeguati anche in rela-

zione al tempo che intercorre tra l'esecuzione dell'analisi e l'ottenimento del risultato definitivo (ROMPRÉ *et al.*, 2002), anche se con un basso costo di esercizio.

Escherichia coli è considerato uno dei più idonei indicatori di contaminazione fecale nell'acqua e di rischio per la salute (WHO, 2006). È un bacillo gram negativo, in grado di fermentare il lattosio a 44°C e produrre indolo a partire dal triptofano, assegnato alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed incluso nel gruppo dei coliformi. Si distingue, all'interno di questo gruppo, i cui appartenenti possiedono l'enzima β -D-

galattosidasi, anche per la presenza dell'enzima β -D-glucuronidasi che catalizza l'idrolisi degli acidi β -D-glucopiranosiduronici nei loro componenti, aglicani e acido D-glucuronico (MANAFI, 1996).

Negli ultimi anni, la tassonomia della famiglia delle *Enterobacteriaceae* ha subito una serie di revisioni (GAVINI *et al.*, 1985), basate anche sull'attività enzimatica dei diversi generi, che hanno posto le basi per lo sviluppo di nuove tecniche di analisi per l'isolamento di questo microorganismo.

Negli ultimi venti anni sono stati proposti nuovi metodi analitici per l'isolamento dei microrganismi nell'acqua e negli alimenti (SARTORY e HOWARD, 1992; FRAMPTON e RESTAINO, 1993; GEORGE *et al.*, 2000; BONADONNA, 2003) e il loro uso si sta affermando anche per l'analisi di campioni ufficiali (UNI EN ISO 9308-3, 2001; BONADONNA e OTTAVIANI, 2007). Essi consentono una migliore discriminazione e una più facile lettura dei risultati, con l'ulteriore vantaggio di fornire risultati in tempi più brevi di quelli convenzionali. Gran parte di queste procedure si basa sul rilevamento di specifiche attività enzimatiche e non richiede successive prove di conferma (EDBERG e KONTNICK, 1986; ADAMS *et al.*, 1990; RICE *et al.*, 1991; TRYLAND e FIKSDAL, 1998).

Tuttavia, in situazioni di emergenza (inquinamento accidentale nel sistema di distribuzione, lavori di manutenzione e riparazione delle condotte, guasti al sistema di approvvigionamento) possono essere necessarie tecniche ancora più rapide. In questi casi, nel corso dello stesso giorno del prelievo dovrebbero essere eseguite le analisi e ottenuti i risultati (GELDREICH, 1997).

A questo campo di ricerca appartiene il presente studio che ha valutato un metodo rapido, basato sull'espressione dell'attività enzimatica, per accertare o escludere la presenza di *E. coli* in acque di falda. Il sistema Colifast® (Colifast® Analyser, denominato in seguito CA) è stato utilizzato per l'analisi di campioni di acqua contenente microflora ambientale interferente e contemporaneamente concentrazioni medio-basse del microorganismo-bersaglio. Di esso sono state valutate le caratteristiche di prestazione ed è stato calcolato e preso in considerazione il tempo necessario per l'ottenimento dei risultati in funzione delle diverse concentrazioni del microorganismo-bersaglio.

MATERIALI E METODI

Sono stati prelevati, in siti diversi, 208 campioni di acque sotterranee contenenti concentrazioni di *E. coli* risultate comprese tra 1 e 150 UFC/100 mL, calcolate sulla base di una serie di analisi quantitative eseguite in parallelo con un metodo colturale tradizionale (TTC Tergitol 7). Gli esami analitici sono stati effettuati entro 6 ore dal campionamento.

Tecnologia CA

Il Colifast® Analyser (Colifast, Norvegia) rileva la crescita batterica tramite la misura della fluorescenza prodotta dall'attività enzimatica del microorganismo indagato, su uno specifico idoneo substrato. L'utilizzo di specifici substrati selettivi e di una temperatura di incubazione appropriata concorrono a garantire la specificità del rilevamento.

Il terreno Colifast® utilizzato viene inoculato e introdotto all'interno del blocco incubatore dello strumento, che può ospitare sino a 76 campioni. Successivamente, ad intervalli programmati, vengono prelevati automaticamente sub-campioni dalle provette in cui sono presenti i campioni da analizzare.

Il metodo per la ricerca di *E. coli* (CA/*E. coli*) rileva l'attività dell'enzima β -D-glucuronidasi e non necessita di ulteriori prove di conferma. Durante la crescita dei batteri, la β -D-glucuronidasi idrolizza il substrato fluorogenico, presente nel terreno di coltura, con formazione del prodotto 4-metilumbelliferone (MU) fluorescente che viene rilevato dallo strumento. L'attività enzimatica che segnala la presenza di *E. coli* è monitorata tramite la misura dell'incremento di fluorescenza dovuta alla formazione di MU. La fluorescenza, misurata tramite il fluorimetro, è rilevata dal Colifast® Analyser ed i risultati sono forniti in termini di Presenza/Assenza. Per rilevare il composto MU, il fluorimetro è equipaggiato con specifici filtri di eccitazione ed emissione (365 e 450 nm, rispettivamente) e le letture della fluorescenza sono espresse come unità di fluorescenza relativa (UFR). Un valore soglia espresso in ppb di MU è fissato al di sopra del rumore di fondo generato dallo strumento e della possibile, seppur bassa, attività prodotta dai microrganismi interferenti presenti nel campione di acqua. Il tempo richiesto per raggiungere il valore soglia programmato, definito come tempo di rilevamento (TDT), può essere considerato come indizio della presenza del microorganismo bersaglio prima che l'analisi sia completata (SAMSET *et al.*, 2000; TRYLAND *et al.*, 2001).

Procedura di analisi

Nello studio effettuato, il Colifast® Analyser (CA) è stato programmato, secondo le indicazioni della ditta produttrice, ad una temperatura di incubazione di 37°C, con un tempo di adattamento del campione di 4 ore nelle provette, un intervallo di lettura tra due sub-campioni pari a 2 ore, un valore soglia di 100 ppb di MU, per ottenere i risultati di avviso preventivo (*early warning*), e di 1000 ppb di MU per quelli definitivi alla chiusura dell'analisi, una durata massima dell'analisi di 18 ore e con letture dei sub-campioni a partire dalla quarta ora.

Un volume di 100 mL di ogni campione è stato

filtrato attraverso una membrana costituita da esteri misti di cellulosa (25 mm di diametro e 0,45 μm di porosità) (Millipore, Bedford, USA) che è stata quindi inserita nella provetta contenente il terreno in brodo di coltura CA/E. *coli*. I risultati ottenuti sono stati espressi in termini di Presenza/Assenza.

Sebbene il metodo non richieda conferme degli isolati, tutti i campioni, sia quelli risultati positivi (presenza dell'enzima β -D-glucuronidasi) sia quelli negativi, sono stati sottoposti a test di conferma: da ogni provetta, un'aliquota, prelevata mediante ansa sterile, è stata trasferita su Triptone Soia Agar (Oxoid, England) e incubata a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18÷24 ore.

Il test della citocromossidasi è stato svolto su tutte le colonie; tutti gli isolati citocromossidasi negativi sono stati saggiati per la produzione di indolo (IND) e la formazione di gas dal lattosio (LAC) nel brodo al Lattosio Triptone Lauryl Solfato (Oxoid, England) (incubazione a $44,5^\circ\text{C}$ per 24,48 ore).

Identificazioni biochimiche degli isolati da CA/E. *coli*

Il 30% degli isolati, selezionati casualmente sia dalle provette positive (β -D-glucuronidasi⁺) sia da quelle negative (β -D-glucuronidasi⁻), è stato sottoposto ad identificazione biochimica con i test miniaturizzati del sistema Vitek (BioMérieux, France) ed è stata registrata anche la prova della fermentazione del lattosio.

Specificità e sensibilità del CA/E. *coli*

La specificità e la sensibilità del metodo CA/E. *coli* sono state calcolate in accordo con la norma UNI ENV ISO 13843 (2003) tenendo conto del numero di isolati positivi/negativi correttamente assegnati nelle conte presuntive.

Tempo richiesto per il raggiungimento dei risultati

Sono stati registrati sia il tempo di chiusura dell'analisi (TF), cioè il tempo richiesto per raggiungere la soglia di fluorescenza programmata (1000 ppb), valore designato per l'acquisizione dei risultati finali, sia il

tempo di rilevamento (TDT). Quest'ultimo ha una particolare rilevanza come parametro per fornire un "preavviso" in caso di positività del campione. Infatti, corrisponde al tempo richiesto per raggiungere il valore soglia di fluorescenza, fissata a 100 ppb, ed è determinato dal numero di microrganismi-bersaglio presenti all'inizio dell'analisi e dalla pendenza dell'incremento lineare durante la crescita. Il TDT è calcolato e registrato dal programma sulla base di differenti intervalli di concentrazione dei microrganismi-bersaglio.

Controllo di qualità

Sono stati effettuati, come previsto dai nostri sistemi di controllo di qualità, controlli positivi e negativi. A questo scopo sono stati usati come ceppi di riferimento *E. coli* WR1 (NCTC 13167) e *Enterobacter cloacae* WR3 (NCTC 13168). I risultati del controllo di qualità non hanno mostrato anomalie.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Percentuali di conferma degli isolati

Sono state sottoposte a conferma 416 colonie (Tab. I): 189, delle 195 colonie derivanti dalle provette positive al test CA/E. *coli*, sono state attribuite ad *E. coli* dai saggi di conferma; 217, delle 221 colonie derivanti dalle provette negative, non sono state confermate come appartenenti alla specie *E. coli*. Questi risultati consentono quindi di affermare che il test CA/E. *coli* ha fornito una bassa percentuale di falsi positivi/negativi (2,4%). Tutti i ceppi isolati dalle provette erano

Tab. I. Percentuale di conferma degli isolati rilevati con il metodo Colifast/*E. coli*[®] dalle provette risultate positive e negative.

Metodo Colifast/ <i>E. coli</i>	n° di colonie presuntive	n° di colonie confermate	(%)
β -D-glucuronidasi ⁺	195	189	(97%)
β -D-glucuronidasi ⁻	221	217	(98%)
Totale	416	406	(98%)

Tab. II. Risultati ottenuti dal conteggio delle provette confermate positive (β -D-glucuronidasi⁺) e negative (β -D-glucuronidasi⁻), combinando in coppie le reazioni biochimiche per lattosio e indolo.

Colifast / <i>E. coli</i>	n° di colonie confermate	LAC / IND n° di isolati (%)			
		+ / +	+ / -	- / +	- / -
β -D-glucuronidasi ⁺	189	135 (71)	34 (18)	15 (8)	5 (3)
β -D-glucuronidasi ⁻	217	28 (13)	158 (73)	12 (6)	19 (9)
Totale	406	163	192	27	24

LAC : lattosio; IND : indolo

citocromossidasi negativi.

In tabella II è riportato il numero totale di colonie confermate suddiviso sulla base dei profili biochimici ottenuti dalle prove di fermentazione del lattosio e di produzione dell'indolo. Un'alta percentuale (71%) di isolati β -D-glucuronidasi⁺ ha mostrato una reazione positiva ad entrambi i test, mentre tra gli isolati β -D-glucuronidasi⁻ prevalevano i ceppi con profilo LAC⁺ / IND⁻ (73%). Dalle provette β -D-glucuronidasi⁻ è stata isolata una percentuale maggiore di ceppi indolo/lattosio negativi rispetto alle provette β -D-glucuronidasi⁺ (9% e 3%, rispettivamente).

Tab. III. Numero e specie dei microrganismi identificati rilevati nelle provette positive/negative; è anche riportata la reazione ai singoli test biochimici.

Provette β -D-glucuronidasi ⁺	Indolo/lattosio	n° isolati identificati
<i>Escherichia coli</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	63
<i>Escherichia coli</i>	Ind ⁺ Lac ⁻	7
<i>Escherichia coli</i>	Ind ⁻ Lac ⁺	6
<i>Citrobacter freundii</i>	Ind ⁻ Lac ⁺	3
<i>Citrobacter braakii</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	1
<i>Kluyvera</i> spp.	Ind ⁺ Lac ⁺	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	1
Totale		82

Provette β -D-glucuronidasi ⁻	Indolo/lattosio	n° isolati identificati
<i>Escherichia coli</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	3
<i>Escherichia coli</i>	Ind ⁻ Lac ⁺	1
<i>Citrobacter koseri</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	1
<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	3
<i>Enterobacter intermedius/cloacae</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	1
<i>Escherichia fergusonii</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	5
<i>Pantoea</i> spp.	Ind ⁺ Lac ⁺	1
<i>Salmonella arizonae</i>	Ind ⁺ Lac ⁺	1
<i>Morganella morganii</i>	Ind ⁺ Lac ⁻	5
<i>Citrobacter freundii</i>	Ind ⁻ Lac ⁻	9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ind ⁻ Lac ⁺	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ind ⁻ Lac ⁺	5
<i>Enterobacter intermedius</i>	Ind ⁻ Lac ⁺	1
<i>Klebsiella pneum. pneumoniae</i>	Ind ⁻ Lac ⁺	4
<i>Salmonella</i> spp.	Ind ⁻ Lac ⁻	1
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	Ind ⁻ Lac ⁻	1
Totale		44

Ind⁺: indolo positivo; Ind⁻: indolo negativo
Lac⁺: lattosio positivo; Lac⁻: lattosio negativo

Identificazioni biochimiche degli isolati da CA/*E. coli*

Nella tabella III sono riportate le specie identificate (coi test miniaturizzati del sistema Vitek) e riferite al 30% degli isolati da CA/*E. coli*. In tabella sono anche forniti i singoli risultati delle prove biochimiche effettuate. Tutti gli isolati positivi/negativi appartenevano alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, fatta eccezione per un ceppo (*Aeromonas hydrophila*) isolato dalle provette β -D-glucuronidasi⁻. L'80% delle specie identificate, isolate dalle provette β -D-glucuronidasi⁺, erano positive ad entrambe le prove di conferma, indolo e fermentazione del lattosio. Tra gli isolati dalle provette β -D-glucuronidasi⁻ è stata registrata una percentuale più bassa (36%) di specie positive ad entrambe le prove. In questo caso, sono stati identificati alcuni *E. coli* falsi-negativi (il 9% dei 44 ceppi identificati), uno dei quali è risultato indolo-negativo. Tra gli isolati β -D-glucuronidasi⁻, risultati positivi ad entrambe le prove di conferma, prevaleva *Klebsiella oxytoca* (11%) e tra i ceppi indolo-negativi è stata rilevata un'alta percentuale di *Citrobacter freundii* (20%).

Specificità e sensibilità

In accordo con la norma UNI ENV ISO 13843, sono state calcolate la sensibilità e la specificità del metodo che sono risultate il 98% e 97%, rispettivamente.

TDT e risultati finali

Rispetto ai campioni con cariche microbiche più basse, per i campioni che presentavano una più alta concentrazione di *E. coli* (> 3/100 mL), le analisi si sono completate più rapidamente. La figura 1 riporta i valori, espressi in percentuale, del numero di analisi cumulate, completate nel tempo, per i due diversi intervalli di concentrazione di *E. coli* ($\leq 3/100$ mL e >3/100 mL). Dalla rappresentazione grafica risulta evidente che, per i campioni di acqua contenenti concentrazioni del microrganismo-target più elevate, la chiusura dell'analisi avviene in tempi più rapidi. Infatti, alla decima ora risulta che già il 100% dei campioni con concentrazioni di *E. coli* >3 UFC/100 mL aveva completato l'analisi, contro l'82,4% dei campioni con concentrazioni di *E. coli* pari a $\leq 3/100$ mL. Il risultato definitivo per il 100% dei restanti campioni è stato raggiunto progressivamente, con termine alla diciottesima ora durante la quale lo strumento ha completato la lettura anche degli ultimi campioni (2%) che presentavano concentrazioni medie pari a 1,3 UFC/100 mL.

D'altra parte, come si evince dalle figure 2 e 3, nei campioni confermati e con concentrazioni maggiori di *E. coli*, il TDT, corrispondente a 7 ore e 52 min, e il tempo effettivo di chiusura delle gran parte delle analisi

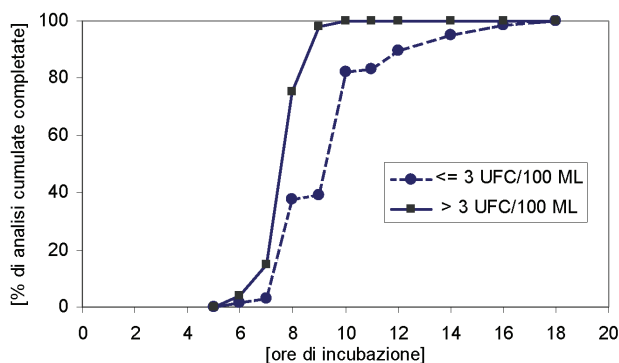


Fig. 1. Analisi completate cumulate, valore espresso in percentuale sul totale, nel tempo, per i due diversi intervalli di concentrazione di *E. coli*.

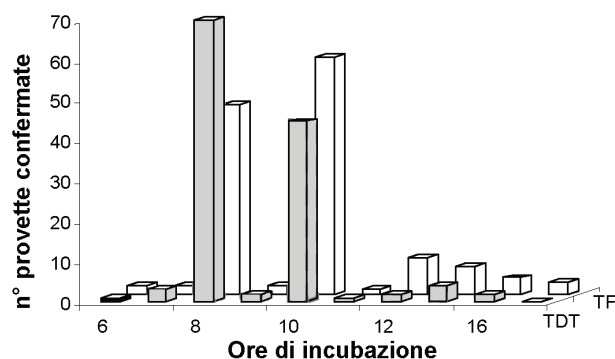


Fig. 2. Tempo di Rilevamento (TDT) e tempo finale di chiusura delle analisi (TF) per i campioni contenenti ≤ 3 *E. coli* confermati /100 mL.

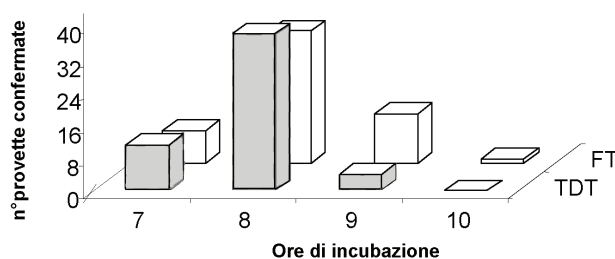


Fig. 3. Tempo di Rilevamento (TDT) e tempo finale di chiusura delle analisi (TF) per campioni contenenti > 3 *E. coli* confermati /100 mL.

sono risultati quasi coincidenti, mentre, nel caso di campioni con conte più basse, l'intervallo di tempo tra la fase di "preavviso" e quella della chiusura della maggior parte delle analisi era leggermente più ampio (9 ore e 6 min per il TDT e 9 ore e 53 min per la chiusura dell'analisi).

I dati riportati in questo studio sono parte dei risultati ottenuti durante un progetto europeo nel quale è stato valutato il metodo Colifast® Analyzer per il rilevamento di alcuni microrganismi indicatori di qualità dell'acqua.

Ad oggi, con l'uso dei metodi colturali convenzionali, la valutazione delle caratteristiche microbiologiche dell'acqua è disponibile dopo un minimo di 18 - 24 ore. Inoltre, come stabilito dalle procedure analitiche, per i metodi colturali standardizzati, è d'obbligo lo svolgimento di prove di conferma con conseguente ulteriore allungamento dei tempi per ottenere i risultati definitivi. Di contro, la tecnologia CA, fornisce buoni risultati e molti vantaggi. Il metodo mostra un'alta specificità e sensibilità ed è poco influenzato dalla presenza dei microrganismi interferenti presenti nei campioni (3% di isolati falsi-positivi).

Dall'analisi dei risultati, ottenuti combinando entrambe le caratteristiche biochimiche, LAC e IND, è stato evidenziato che, tra i ceppi β -D-glucuronidasi⁺, l'89% degli isolati erano lattosio-positivi e il 42% positivi per il test per la produzione di indolo. Viceversa, e come era facilmente prevedibile, solo il 9% degli isolati β -D-glucuronidasi⁻ è risultato indolo-positivo ed una percentuale simile è rappresentata dai ceppi che hanno fornito reazioni negative ad entrambe le prove, mentre l'86% degli isolati sono risultati lattosio e indolo positivi. Questo potrebbe far presumere che la maggior parte dei ceppi β -D-glucuronidasi⁻ possa appartenere al gruppo dei coliformi come è anche emerso dalle identificazioni biochimiche degli isolati. In questo caso, sulla base dei profili biochimici, è stata osservata una variabilità tra le specie identificate. Infatti, sono stati isolati *E. coli* indolo/lattosio e β -glucuronidasi negativi, come pure sono stati identificati ceppi di *C. freundii* e *Kl. oxytoca* β -glucuronidasi negativi e positivi.

Lo studio svolto è in accordo con risultati ottenuti da altri autori (LECLERC *et al.*, 2001) che riportano che diverse tra le specie ambientali di coliformi possono dare risposte atipiche ai test biochimici.

Oltre agli alti livelli di specificità e sensibilità calcolati, la tecnologia CA si caratterizza per la possibilità di analizzare, contemporaneamente, 76 campioni diversi. Inoltre, dimostra una rapidità maggiore nel fornire la risposta alle analisi, rispetto a metodi colturali standardizzati (ad esempio, UNI EN ISO 9308-3) che, anche per la necessità di eseguire reazioni di conferma degli isolati (ad esempio UNI EN ISO 9308-1), impiegano tempi più lunghi. Questo parametro significativo, risul-

tato inversamente proporzionale al livello di contaminazione del campione, consente di ottenere in un numero inferiore di ore, rispetto ad altre tecniche, non solo i risultati di campioni con un grado elevato di contaminazione, ma anche gli esiti degli esami di campioni in cui sono presenti più basse concentrazioni del microrganismo-target. Nella nostra indagine i campioni con concentrazioni di *E. coli* maggiori (4÷150 UFC/100 mL) raggiungevano, per la gran parte (76%), il risultato finale entro 8 ore che, di qualche minuto, era preceduto dal raggiungimento della soglia di fluorescenza impostata (100 ppb) per il TDT. Nel caso dei campioni che presentavano conte più basse, l'intervallo di tempo tra la fase di "preavviso" e quella della chiusura della maggior parte delle analisi (superiore al 50%) era invece più ampio (circa un'ora).

Un sistema analitico rapido dovrebbe essere abbastanza sensibile da mettere in evidenza il più basso livello rilevabile di microrganismi (1 unità microbica in

un dato volume) nel 50% del tempo richiesto da un metodo di riferimento, e con una specificità non inferiore al 90% (NIEMELÄ, 2000; GEORGE *et al.*, 2000).

Il metodo utilizzato in questo studio presenta queste caratteristiche. Infatti, con valori di specificità del 97%, alla diciottesima ora, erano stati ottenuti, senza necessità di conferme, risultati finali anche per il 100% dei campioni con un basso carico microbico (concentrazioni medie pari a 1,6 UFC/100 mL) e la "notifica" della presenza di contaminazione, utile per effettuare controlli integrativi e adottare misure idonee per ripristinare la buona qualità dell'acqua, è stata registrata, per il 72% dei campioni, entro le 10 ore di incubazione.

Ringraziamenti

Questo studio è stato parzialmente eseguito con i fondi del Progetto europeo DEMOWATERCOLI" QLK1-2000-01209.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS M.R., GRUBB S.M., HAMER A., CLIFFORD M.N., 1990. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β -glucuronidase activity. *Applied Environmental Microbiology*, **56**: 2021-2124.
- ALLAERT VANDEVENNE C., MURRIN K., BULLOCK S., JONAS A., WARDEN P., FRICKER C., 2005. False positive results with ISO method for *E. coli* in water. In: 2nd WeKnow Conference. Bratislava, 3-15 June 2005.
- BARONE E., DI PARDO L., MELLONI A., CHIARETTI G., BONADONNA L., MANUPPELLA A., 2007. Attendibilità di metodi utilizzati per la determinazione di coliformi ed *Escherichia coli* in acque da destinare al consumo umano. *Biologia Ambientale*, **21**: 37-42.
- BERNASCONI C., VOLPONI G., BONADONNA L., 2006. Comparison of three different media for the detection of *E. coli* and coliforms in water. *Water Science & Technology*, **54**: 141-145.
- 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 Limited, Cambridge: 161-182.
- BONADONNA L., CATALDO C., COCCIA A.M., CHIARETTI G., SEMPRONI M., 2006. Evaluation of the phenotypic characteristics of coliform bacteria recovered with two methods: the European Drinking Water Directive reference method and the Colilert 18/Quanti-Tray™ system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **22**: 629-634.
- BONADONNA L., OTTAVIANI M., 2007. *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.L.vo 31/2001. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/5).
- EDBERG S.C., KONTRICK C.M., 1986. Comparison of β -glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, **24**: 368-371.
- FRAMPTON E.W., RESTAINO L., 1993. Methods for *Escherichia coli* in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**: 223-233.
- GAVINI F., LECLERC H., MOSSEL D.A.A., 1985. Enterobacteriaceae of the «coliform group» in drinking water: identification and worldwide distribution. *Systematic in Applied Microbiology*, **6**: 312-318.
- GELDREICH E.E., 1997. Coliforms: a new beginning to an old problem. In: Kay D. and Fricker C.R. (eds.), *Coliforms and E. coli: problem or solution?* The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 3-11.
- GEORGE I., PETIT M., SERVAIS P., 2000. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 404-413.
- LECLERC H., MOSSEL D.A., EDBERG S.C., STRUIJK C.B., 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 201-234.
- MANAFI M., 1996. Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. *Journal of Food Microbiology*, **31**: 45-58.
- NIEMELÄ S.I., 2000. Performance characteristics of microbiological water analysis methods. In: Heinonen P., Ziglio G., Van Der Beken A. (eds.), *Water Quality Measurements Series*. John Wiley & Sons, New York: 277-284.
- OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2003. *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*. OECD/WHO

- Drinking Water Quality Series. London: IWA Publishing.
- RICE E.W., ALLEN M.J., BRENNER K.P., EDBERG S.C., 1991. Assay for β -D-glucuronidase in species of the genus *E. coli* and its applications for drinking-water analysis. *Applied Environmental Microbiology*, **57**: 592-593.
- ROMPRÉ A., SERVAIS P., BAUDART J., RENÉE DE ROUBIN M., LAURENT P., 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, **49**: 31-54.
- SAMSET I.D., HERMANSEN L.F., BERG J.D., 2000. Development of a surveillance system for water treatment processes and hygienic quality of drinking water. In: Proceeding *Drikkevannsforskning mot År*, Trondheim, 5-7 January 2000, Norway.
- SARTORY D.P., HOWARD L., 1992. A medium detecting β -glucuronidase for the simultaneous membrane filtration enumeration of *Escherichia coli* and coliforms from drinking water. *Letter in Applied Microbiology*, **15**: 273-276.
- 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. *Letter in Applied Microbiology*, **34**: 227-231.
- TALLON P., MAGAJNA B., LOFRANCO C., TIN LEUNG K., 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water Air and Soil Pollution*, **166**:139-166.
- TRYLAND I., FIKSDAL L., 1998. Enzyme characteristics of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, **64**: 1018-1023.
- TRYLAND I., SAMSET I.D., HERMANSEN L., BERG J.D., RYDBERG H., 2001. Early warning of faecal contamination of water: a dual mode, automated system for high-(< 1 hour) and low-levels (6-11 hours). *Water Science & Technology*, **43**: 217-220.
- UNI EN ISO 9308-3, 2001. Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi - Metodo miniaturizzato (Numero Più Probabile) per la ricerca ed enumerazione di *E. coli* in acque superficiali e reflue. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione.
- UNI EN ISO 9308-1, 2002. Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi - Metodo di filtrazione su membrana. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione.
- UNI ENV ISO 13843, 2003. Qualità dell'acqua - Guida per la valutazione di metodi microbiologici. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006. *Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first addendum*. Volume 1 - Recommendations. Geneva: World Health Organization.