

---

---

## LABORATORIO

---

---



# VALUTAZIONI SULL'UTILIZZAZIONE DI TERRENI DI COLTURA PER LA RICERCA DEI COLIFORMI TOTALI NEL CONTROLLO DI QUALITA' DELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

G. Merlo\*, E. Borgi\*, M. Garizio\*, T. Lunardi\*, S. Caramello\*\*

### INTRODUZIONE

Il D. P. R. 236/88 prescrive tra le norme tecniche per la ricerca dei coliformi totali l'utilizzo del terreno m-Endo agar. Da anni si disquisisce sia sulla validità di questo indice di qualità microbiologica per le acque destinate al consumo umano, sia sulla validità di questo terreno per la ricerca dei coliformi totali in acque clorate. E' opinione di parecchi Autori, infatti, che l'm-Endo sia un terreno molto selettivo, con il rischio quindi di produrre molti risultati falsi negativi.

L'esperienza e molti lavori pubblicati in proposito, insegnano inoltre che la distinzione tra colonie metalliche e non, non è così netta ed è quindi poco valida l'indicazione di legge che indica il conteggio solo delle colonie con tale caratteristico aspetto (MINELLI et al.,

1990).

Risulterebbe inoltre bassa la percentuale di recupero dei coliformi danneggiati dai processi di disinfezione (injured) (DI GIROLAMO, 1992) e basso il tasso di riconoscimento e di discriminazione dei coliformi dai non coliformi. Uno degli aspetti più significativi è rappresentato, infatti, dalla natura inibitoria degli ingredienti selettivi, nei terreni di tipo m-Endo, (DI GIROLAMO, 1992) verso la crescita dei coliformi stressati.

Molti sono i fattori fisici e chimici che, nelle acque potabili, sono noti per causare danni sub-letali alle cellule batteriche: il cloro e altri biocidi, alte concentrazioni di metalli, quali il rame e lo zinco che possono essere costituenti delle condotte, eccessi di temperatura e di pH, interazioni con altri batteri (McFETERS et al., 1986).

Il danneggiamento delle cellule batteriche viene

---

\* Azienda Acquedotto Municipale di Torino.

\*\* Istituto di Igiene - Università di Torino.

---

definito come una conseguenza fisiologica subletale dell'esposizione a stress, che causa una diminuzione nella capacità dei microrganismi di crescere normalmente nelle condizioni che di solito sono soddisfacenti per le cellule intatte. È stato dimostrato che lo 0,1% di desossicolato insieme allo 0,5% di sodio lauril solfato inibisce la crescita del 70% dei coliformi danneggiati (DI GIROLAMO, 1992). Bisogna tenere conto inoltre del fatto che le cellule injured assumono forma diversa e, secondo alcuni Autori, non verrebbero trattenute dalle membrane di porosità  $0,45\mu$  che vengono normalmente utilizzate nella tecnica delle membrane filtranti (VOLTERRA, 1992).

In riferimento alla normativa C.E.E. (Direttiva della Comunità Economica Europea 80/778) ed alla legislazione di altri paesi europei quali la Francia, si è visto che una valida alternativa all'utilizzo del terreno m-Endo è rappresentata dall'uso del Tergitol 7.

Il Tergitol 7 è raccomandato come terreno per i coliformi stressati dagli Standard Methods Americani. I componenti del terreno sono: estratto di lievito, peptone, lattosio, tergitol 7, poliossietilene, blu di bromotimolo, porpora di bromocresolo, agar, acqua distillata. Il terreno risulta inoltre di più facile preparazione e meno rischioso per gli utilizzatori in quanto non contiene la fucsina basica, sostanza notoriamente cancerogena.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo gennaio-giugno 1992 sono stati analizzati 363 campioni di acqua potabile e non, provenienti da diversi impianti di produzione dell'Azienda Acquedotto Municipale di Torino. I campionamenti sono stati effettuati mediante l'utilizzo di bottiglie Abba alle quali erano stati preventivamente addizionati 0,2 ml di tiosolfato di sodio al 10%.

L'analisi è stata svolta utilizzando la tecnica delle membrane filtranti con filtri di porosità di  $0,45\mu$ . Le colture sono state effettuate in parallelo sia su terreno m-Endo broth (Difco) sia su terreno Tergitol 7 (Merck) incubati a  $37 \pm 1$  °C per 24h. Le successive prove di conferma sono state eseguite sulle colonie metalliche e non, cresciute sul terreno m-Endo broth e sulle colonie gialle cresciute sul terreno Tergitol 7. Laddove si avevano crescite numerose sono state sottoposte a conferma alcune colonie per piastra.

Il procedimento utilizzato è stato il seguente:

- Passaggio delle colonie su agar di arricchimento a becco di clarino (Nutrient Agar per 24h a  $37 \pm 1$  °C);
- Brodi verde brillante e lauril-solfato a  $37 \pm 1$  °C per 48h;
- Test biochimico dell'ossidasi su dischetti;
- Identificazione biochimica mediante gallerie API 20 E e API 20 NE a seconda dei risultati ottenuti con il test dell'ossidasi.

Sono state tipizzate 130 colonie che provenivano da acque potabili o da acqua grezza derivante dal fiume Po e dal torrente Stura di Viù come di seguito schematizzato:

A=Acque grezze superficiali;

B=Acque in uscita dagli impianti di potabilizzazione Po-2 e Po-3;

C=Acque prelevate da fontanelle della rete idrica di distribuzione della città di Torino;

D=Acque provenienti da serbatoi di accumulo della città di Torino;

E=Acque provenienti da reti idriche di comuni gestiti dall'A.A.M. di Torino.

Per le acque in uscita dall'impianto di potabilizzazione è stata dosata anche la quantità di biossido di cloro residuo dopo il trattamento finale di disinfezione. (Fig. 1). Il disinfettante è stato dosato per via spettrofotometrica utilizzando il metodo alla difenil-parafenilen-diammina.

## RISULTATI

In tabella 1 sono raccolti i risultati relativi alle diverse prove di conferma effettuate mediante identificazione biochimica con API. Sono state riportate le percentuali di identificazione relative ai diversi tipi di acque analizzate.

È rilevante osservare come entrambi i terreni mostrino una perfetta corrispondenza dei risultati per quanto riguarda le acque di origine superficiale (classe A) e quelle della classe E, prelevate dalla rete di distribuzione di comuni nei quali non viene effettuata disinfezione. Nel primo caso si ha corrispondenza sui risultati positivi; nel secondo collimano tutti i dati negativi che, pertanto, non sono stati riportati nella tabella. Per quanto riguarda le acque clorate, invece, si registra una crescita solo su Tergitol 7 con la mancan-

za di concordanze positive sui due mezzi usati. La fig. 1 mostra l'andamento del numero di colonie rilevate su Tergitol 7 e dei valori di biossido di cloro rilevati negli stessi giorni.

La tabella 2 riporta il calcolo della sensibilità e della specificità dei due metodi effettuati con diversi

terreni. E' stata così evidenziata una maggior sensibilità del terreno Tergitol 7 (100%) rispetto all'm-Endo broth (11,4%). Per quanto riguarda la specificità si rileva una lieve differenza a favore del terreno m-Endo broth: 98,9%, contro l'84,8% del Tergitol 7.

I risultati confermano quindi la maggior specificità

Tab. 1

Identificazione biochimica delle colonie saggiate

Classe	Tergitol 7	m-ENDO Agar	Campioni testati e %	
A	<i>Ent. aerogenes</i>	<i>Ent. aerogenes</i>	2	20 %
A	<i>Kleb. gr. 47</i>	<i>Kleb. gr. 47</i>	1	10
A	<i>Haf. alvei</i>	<i>Haf. alvei</i>	1	10
A	<i>Ent. agglomerans</i>	<i>Ent. agglomerans</i>	3	30
A	<i>Citr. freundii</i>	<i>Citr. freundii</i>	3	30
<b>Totale</b>			10	100
B	<i>E. coli</i>	-	11	15,8
B	<i>Ent. aerogenes</i>	-	5	7,2
B	<i>S. odorifera</i>	-	10	14,4
B	<i>Ent. sakazakij</i>	-	2	2,8
B	<i>Ent. agglomerans</i>	-	7	10,0
B	<i>Kleb. pneumoniae</i>	-	7	10,0
B	<i>Ps. paucimobilis</i>	-	2	2,8
B	<i>Aer. salmonicida</i>	-	7	10,0
B	<i>Aer. hydrophilalc.</i>	-	7	10,0
B	<i>X. maltophilia</i>	-	4	5,7
B	<i>Citr. luteola</i>	-	4	5,7
B	<i>E. spp</i>	-	1	1,4
B	<i>V. damsela</i>	-	1	1,4
B	<i>V. fluvialis</i>	-	1	1,4
B	<i>Ps. pneumotropica</i>	-	1	1,4
<b>Totale</b>			70	100,0
C	<i>Aer. spp</i>	-	1	2,3
C	<i>Ps. putida</i>	-	1	2,3
C	<i>Ps. paucimobilis</i>	-	1	2,3
C	<i>Aer. CDC gr. VD</i>	-	1	2,3
C	<i>Aer. hydrophilalc.</i>	-	4	9,3
C	<i>Ps. cepacia</i>	-	1	2,3
C	<i>Proteus vulgaris</i>	-	4	9,3
C	<i>P. versicularis</i>	-	3	6,9
C	<i>Citr. freundii</i>	-	10	23,3
C	<i>Kleb. ozaenae</i>	-	8	18,8
C	<i>Haf. alvei</i>	-	7	16,3
C	<i>E. coli</i>	-	2	4,6
<b>Totale</b>			43	100,0
D	<i>Ent. agglomerans</i>	-	2	28,8
D	<i>Citr. freundii</i>	-	1	14,2
D	<i>S. odorifera</i>	-	1	14,2
D	<i>Aer. hydrophilalc.</i>	<i>Aer. hydrophilalc.</i>	3	42,8
<b>Totale</b>			7	100,0

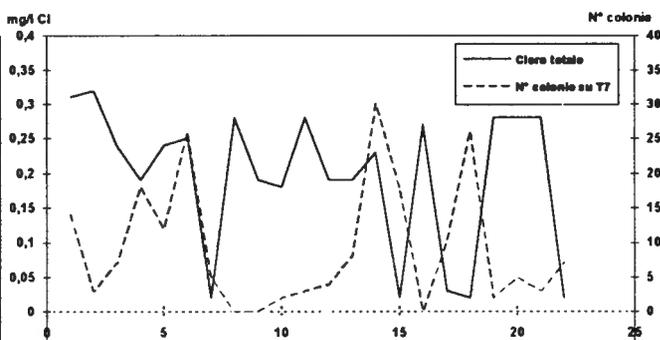


Fig. 1 Valori di Cloro totale (mg/l) e numero di colonie cresciute su Agar T7 (impianto Po-3)

Tab. 2

Calcolo della sensibilità e della specificità dei due terreni di coltura saggiati

VP = veri positivi; VN = veri negativi  
 FP = falsi positivi; FN = falsi negativi  
 Sensibilità = VP/(VP+FN)  
 Specificità = VN/(VN+FP)

		TERGITOL 7 Agar		
VP	FP	92	41	Sensibilità = 92/92 = 100 % Specificità = 230/(230+41) = 84,8 %
FN	VN	0	230	
		m-ENDO Agar		
VP	FP	10	3	Sensibilità = 10/(10+77) = 11,4 % Specificità = 273/(273+3) = 98,9 %
FN	VN	77	273	
		Sensibilità	Specificità	
Tergitol 7		100 %	84,8 %	
m-ENDO		11,4 %	98,9 %	

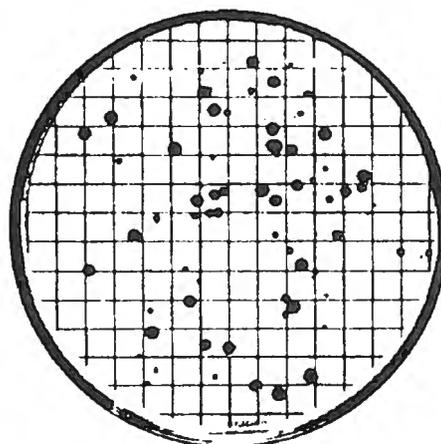
del terreno di legge e confermano la sua validità nell'utilizzo su acque prive di trattamento di disinfezione (EVANS T.M. et al., 1981) (acqua grezza del fiume Po e del torrente Stura di Viù), ma evidenziano d'altro canto, la maggior efficienza del secondo terreno su acque clorate con la probabile presenza di batteri "injured" (DI GIROLAMO et al., 1989).

## CONCLUSIONI

La valutazione dei risultati ottenuti permette di affermare con una certa sicurezza la validità del terreno Tergitol 7 per controlli acquedottistici interni, in quanto consente di ridurre il numero dei risultati falsi negativi.

L'alta specificità e la bassa sensibilità del terreno m-Endo broth, attualmente utilizzato, rischiano infatti di nascondere alcuni problemi di contaminazione, soprattutto nel caso di acque trattate mediante disinfezione con cloro e biossido di cloro. Il terreno m-Endo broth mantiene la sua validità per l'enumerazione dei coliformi totali su acque grezze superficiali o di pozzo che non vengono successivamente sottoposte a clorazione.

E' auspicabile quindi una modifica del D.P.R. 236/88 che fornisca un'alternativa all'utilizzo di questo terreno nelle metodiche per la ricerca dei coliformi totali nelle acque destinate al consumo umano, come d'altronde già suggerito dalla normativa CEE N° 80/778.



## BIBLIOGRAFIA

AWWA, APHA, WPCF - 1989. Standard methods for the examination of water and waste water, 17th edition.

American Public Health Association Inc., New York.

DI GIROLAMO I. - 1992. Il terreno m-Endo e la colimetria.

Atti del seminario "Aspetti microbiologici e tossicologici delle acque", Regione Piemonte, 30-31 gennaio 1992: 15-29.

DI GIROLAMO I., DE MATTIA M. - 1989. Tecniche per la ricerca dei parametri microbiologici di base.

*Microbiologia delle acque potabili*, 1: 5-18

EVANS T.M., LE CHEVALLIER M.W., WAARVICK C.E., SEDLER R.J. - 1981. Coliform species recovered from untreated surface water and drinking water by membrane filter, standard and modified M.P.N. techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 657.

MC FETERS G.A., KIPPIN G.S., LE CHEVALLIER M.W. - 1986. Injured coliform in drinking water.

*Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 1.

MINELLI L., RAFFAELLI G., CAVALLARI E., GRANDI M. - 1990. Valutazioni delle caratteristiche colturali dei coliformi nel controllo delle acque potabili.

*L'Igiene Moderna*, 94: 68-76.

VOLTERRA L. - 1992. Atti del seminario "Aspetti microbiologici e tossicologici delle acque", Regione Piemonte, 30-31 gennaio 1992: 1-7.