

## IGIENE AMBIENTALE



Nonostante il titolo, riferito alle acque minerali, questo lavoro rappresenta una rassegna puntuale ed aggiornata sull'intero gruppo dei coliformi e sul loro significato di indicatori di contaminazione fecale in tutti gli ambienti acquatici. Sebbene la ricerca e il conteggio dei coliformi, fecali e non, siano ampiamente effettuati in tutti i laboratori da molti decenni, le usuali temperature di coltura non sono quelle ottimali. Raramente, inoltre, la loro identificazione viene spinta fino a livello della specie e raramente, nell'espressione del giudizio, si tiene conto dell'ecologia e del significato indicatore di ciascuna specie. Riteniamo quindi tutt'altro che superfluo pubblicare la traduzione di questa rassegna di H. Leclerc, comparsa sul n. 5-6 (sett.-dic. 1990) della Rivista Italiana d'Igiene (Atti del meeting internazionale sulle "Acque minerali naturali", Pisa, 23-24-25 Maggio 1990) col titolo "Indicateurs bactériens et controle de qualité des eaux minérales naturelles".

# Indicatori batteriologici e controllo di qualità delle acque minerali naturali

H. Leclerc<sup>1</sup>

Traduzione di Carlo Francalanci<sup>2</sup> e Enrico Papini<sup>3</sup>

La qualità delle acque minerali naturali può essere valutata utilizzando tre categorie principali di indicatori batterici.

Gli indicatori di specificità biologica, rappresentati da batteri eterotrofi oligotrofi, caratterizzano l'acqua alla sorgente e, in seguito, quella imbottigliata. Le altre due categorie sono, invece, l'espressione di una contaminazione e possono quindi comportare un rischio potenziale per il consumatore.

Gli indicatori di contaminazione tecnologica sono

batteri che si introducono nell'acqua lungo le condotte di adduzione, nei serbatoi o nel corso dell'imbottigliamento. I lavori di SCHMIDT-LORENZ<sup>50,51</sup> e di LECLERC e MOSSEL<sup>37</sup> rappresentano un approccio alla soluzione di questo problema.

La terza categoria è quella degli indicatori di contaminazione fecale, universalmente utilizzati nel controllo batteriologico dell'acqua e degli alimenti, acque minerali naturali comprese.

L'obiettivo di questo lavoro è limitato ai soli indicatori di contaminazione fecale.

Gli immensi progressi compiuti negli ultimi 20 anni nel campo della tassonomia batterica, in particolare per le Enterobacteriaceae (e, di conseguenza,

<sup>1</sup> Università di Lille, Facoltà di Medicina

<sup>2</sup> ARPAT, Dipartim. di Arezzo, Viale Maginardo 1 - 52100 Arezzo

<sup>3</sup> ARPAT, Dipartim. di Arezzo (tirocinante)

nella loro ecologia), impongono una rivisitazione del concetto di indicatori di contaminazione fecale, sia nei suoi contenuti che nel suo utilizzo.

Come esempio di studio verrà preso un gruppo sul quale le nostre conoscenze sono particolarmente progredite: quello degli indicatori coliformi.

## I. Aspetti batteriologici

### I.1. CLASSIFICAZIONE

*Escherichia Coli* è stata descritta nel 1885 da ESCHERICH<sup>12</sup> col nome di *Bacterium Coli*.

Più o meno nello stesso periodo sono state descritte altre specie dello stesso significato: *Klebsiella pneumoniae*, citata per la prima volta da ZOPF<sup>59</sup> nel 1885 sotto il nome di *Bacterium pneumoniae crouposae* ed *Enterobacter cloacae*, descritta da JORDAN<sup>30</sup> nel 1890 come *Bacterium cloacae*. Un po' più tardi, nel 1928, BRAAK<sup>3</sup>, nella sua tesi di laurea, descriveva *Bacterium freundii*, conosciuto oggi come *Citrobacter freundii*.

Il termine di coliforme, che raggruppa queste specie ed altre apparentate, venne utilizzato inizialmente da batteriologi inglesi<sup>1, 8, 25, 38, 48, 49, 55</sup>. Negli Stati Uniti venne proposto da BREED e NORTON<sup>4</sup> per indicare i batteri fermentanti il lattosio, ricercati come indicatori di contaminazione delle acque. In quel periodo si utilizzavano comunemente e indistintamente i termini di "coliformi" o "gruppo colon"<sup>31</sup> o "*coli-aerogenes*"<sup>54</sup> o, ancora, *Escherichia-aerobacter*<sup>53</sup>.

Oggi, attenendosi alle definizioni ammesse sul piano internazionale (ISO) i coliformi sono dei bacilli: Gram negativi, non sporigeni, ossidasi negativi, aerobi o anaerobi facoltativi, capaci di moltiplicarsi in presenza di sali biliari o di tensioattivi e capaci di fermentare il lattosio con produzione di acido e gas in 48 ore ad una temperatura di 35-37 °C ( $\pm 0,5$  °C).

Il termine di *coliformi termotolleranti* si riferisce ai coliformi aventi le stesse proprietà a 44 °C; quello di "*E. coli presunti*" riguarda i coliformi termotolleranti che producono indolo a 44 °C a partire dal triptofano; *E. coli*, infine, è un "*E. coli presunto*" rosso metile +, acetoina -, citrato -, KCN -, e dotato di una glutammico decarbossilasi.

Sulla base degli studi di tassonomia tradizionale, la conoscenza del gruppo dei coliformi non ha fatto progressi fino al passato recente (1975-1980): la maggior parte degli autori descriveva le nuove forme

qualificandole come atipiche, trovandosi nell'impossibilità di inquadrarle negli schemi esistenti. Noi stessi, nel corso di precedenti studi sulle *Enterobacteriaceae pigmentate*<sup>32</sup>, su alcuni enterobatteri  $\beta$  galattosidasi +<sup>33</sup>, sulle *Hafnia*<sup>34</sup> e sui *Citrobacter*<sup>35</sup>, abbiamo segnalato la loro esistenza. Tutto il periodo precedente, circa un secolo, pur essendo stato relativamente fecondo per la classificazione di alcuni gruppi di enterobatteri, in particolare dei "patogeni" per l'uomo e per gli animali (*Salmonella*, *Shigella*), è stato praticamente infecondo per la conoscenza delle specie che vegetano nelle acque, nel suolo, sulle piante, ecc. e, di conseguenza, sul loro ruolo come indicatori di contaminazione.

Lo sviluppo dei moderni metodi tassonomici, numerico, genetico (ibridazione DNA/DNA), molecolare (studi immunologici sulle proteine), ha radicalmente trasformato la classificazione dei batteri, in particolare quella delle Enterobacteriaceae e – ancor più precisamente – quella degli enterobatteri detti "Coliformi". Tra tutti gli approcci tassonomici che tentano di definire la specie batterica, quello genetico – che porta, senza alcun dubbio, il maggior numero d'informazioni perché s'indirizza all'insieme del genoma del batterio – è considerato il più importante. In accordo con BRENNER<sup>5</sup> e GRIMONT<sup>23,24</sup>, la specie può essere definita come un gruppo di ceppi aventi almeno il 70% di omologia genomica alla temperatura ottimale di reazione ( $T_m + 25$  °C) ed un  $DT_{m(e)}$ , cioè un'instabilità termica degli ibridi, lieve (meno di 5 °C). Fra specie differenti, l'omologia è abitualmente inferiore al 60% e l'instabilità termica degli ibridi è superiore a + 7 °C. All'interno della specie si possono riconoscere dei sottoinsiemi caratterizzati da particolarità biochimiche (biotipi), immunologiche (sierotipi), tossinogene (tossitipi) o da schemi di sensibilità (lisotipi, antibiotipi, ...).

I numerosissimi lavori di tassonomia degli enterobatteri coliformi non potranno essere analizzati in questa rassegna. È pertanto fondamentale riportare l'elenco delle specie corrispondenti alla definizione dei coliformi o che possono corrispondere a questa definizione in quanto batteri fermentanti il lattosio e provvisti quasi sempre di una  $\beta$  galattosidasi.

Le tabelle 1 e 2, che sintetizzano questi dati, permettono di misurare l'incredibile distanza che è stata percorsa in pochi anni grazie ai nuovi approcci

**Tab. 1.** Enterobatteri coliformi: classificazione tradizionale.

Specie	Sinonimi
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella mobilis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	-
<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Levinea malonatica</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Levinea amalonatica</i>

tassonomici. Si comprende meglio perché, nel passato, numerosi enterobatteri detti “coliformi” venivano classificati come irregolari o atipici. Si trattava, infatti, di nuove specie che le tecniche di studio convenzionali erano incapaci di distinguere e di classificare.

Tutte queste specie sono  $\beta$  galattosidasi + con una bella costanza e, poiché la fermentazione del lattosio in 24 o 48 ore non è stata riscontrata con una frequenza così elevata, si può ritenere che il criterio della  $\beta$  galattosidasi sia certamente più caratterizzante del gruppo coliformi che non quello della fermentazione del lattosio.

## I.2. IDENTIFICAZIONE

La nuova classificazione dei coliformi ha importanti conseguenze sui metodi messi a punto per la loro ricerca e, soprattutto, per la loro identificazione. I tassonomisti “puristi” si sono sempre opposti con forza alla nozione di coliformi poiché questo termine comprende una grande diversità di specie tassonomiche che possono avere una grande diversità di significati. Tuttavia gli igienisti, pur perfettamente coscienti di queste difficoltà e di questa ambiguità, hanno utilizzato questo concetto – indispensabile per semplificare i metodi d’analisi – sperando, senza esserne certi, che conduca a interpretazioni giustificabili. La rivoluzione tassonomica di questi ultimi anni può permettere di riconciliare gli uni e gli altri, sia perché il gruppo “coliformi” è oggi perfettamente conosciuto sul piano tassonomico, sia perché esistono ormai metodi semplici d’identificazione delle differenti specie.

I metodi tradizionali d’identificazione si basano su chiavi dicotomiche che attribuiscono arbitrariamente un peso ai caratteri. Questi sistemi gerarchizzati con-

ducono necessariamente ad errori di diagnosi tenuto conto delle eterogeneità fenotipiche delle specie e della esistenza di ceppi atipici<sup>29</sup>. L’attuale inflazione delle specie di Enterobacteriaceae aumenta ulteriormente i rischi di errore. La maggior parte delle nuove specie descritte, infatti, non può essere identificata con i test tradizionali, come l’IMVIC.

Nell’esempio delle tabelle 3 e 4, in effetti, si nota che i caratteri chiave “rosso di metile” e “acetoina” dei test IMVIC (Indolo; Rosso Metile; Voges Proskauer; Citrato) non hanno alcun valore discriminante per l’identificazione di *Klebsiella pneumoniae* e di *Enterobacter cloacae*.

I taxa D e J, pur essendo rispettivamente RM + e acetoina -, RM + e acetoina +, appartengono senza dubbio alla specie *Klebsiella pneumoniae*. Analogamente, il taxon E, RM - e acetoina -, è un biotipo di *Enterobacter cloacae*. Il carattere aleatorio di questi test è stato già sottolineato in numerose occasioni, in particolare nei lavori di DUNCAN e RAZZEL<sup>9</sup> e di BROWN e SEIDLER<sup>6</sup>.

Un altro esempio di queste difficoltà, evidenziato nel lavoro di GAVINI<sup>18</sup>, è riportato nella tabella 5: diversi ceppi di enterobatteri, che secondo i test IMVIC appartengono alla specie *E. coli*, presentano in realtà percentuali di omologia genetica con questa specie (ibridazione DNA/DNA) estremamente basse.

Si tratta, in effetti, di specie nuove. Inversamente, alcuni ceppi di *E. coli* possono presentare caratteri atipici a determinismo plasmidico come presenza di H<sub>2</sub>S, di ureasi, di tetrionato reductasi, fermentazione di saccarosio e di raffiniosio, utilizzazione di citrato (tests IMVIC); anche in questo caso i sistemi dicotomici falliranno nell’identificazione.

In conclusione, l’insieme dei nostri lavori mostra che i test IMVIC non possono essere considerati criteri utilizzabili per l’identificazione dei coliformi. Per sopperire a questi inconvenienti, i sistemi di identificazione attuali, di tipo probabilistico, non sono più basati su una gerarchia di caratteri, ma sul confronto fra il profilo dei ceppi studiati in rapporto a quello di ceppi tipo delle specie repertate e classificate.

Nei sistemi commerciali attuali (kit automatici) questi profili contengono un certo numero di caratteri selezionati, perché fortemente discriminanti. Sulla base dei nostri lavori di tassonomia noi abbiamo potuto stabilire un programma d’identificazione selezionan-

Tab. 2. Enterobatteri coliformi: classificazione contemporanea.

Genere / Specie		$\beta$ galattosidasi (%)	Fermentazione lattosio in 24 e 48 h (% ceppi)	Origine
	<i>Budvicia aquatica</i>		100	ambientale
BUTTIAUXELLA	<i>B. agrestis</i>	100	100	ambientale
CEDECEA	<i>C. davisae</i>	90	19	clinica
	<i>C. lapagei</i>	99	60	clinica
	<i>C. neteri</i>	100	35	clinica
CITROBACTER	<i>C. freundii</i>	95	50	fecale
	<i>C. diversus (L. malonatica)</i>	96	35	fecale
	<i>C. amalonaticus (L. amalonatica)</i>	100	50	fecale
	<i>C. amalonaticus</i> biogrupo 1	100	19	clinica
ENTEROBACTER	<i>E. aerogenes (K. mobilis)</i>	100	95	fecale
	<i>E. cloacae</i>	99	93	fecale
	<i>E. agglomerans</i>	90	40	ambientale
	<i>E. gergoviae</i>	97	55	clinica
	<i>E. sakazakii</i>	100	99	clinica
	<i>E. tailorae</i>	100	10	clinica
	<i>E. amnigenus</i> biogrupo 1	91	70	ambientale
	<i>E. amnigenus</i> biogrupo 2	100	35	ambientale
	<i>E. intermedium</i>	100	100	ambientale
ESCHERICHIA	<i>E. coli</i>	95	95	fecale
-SHIGELLA	<i>S. sonnei</i>	90	2	clinica
	<i>E. hermanii</i>	98	45	clinica
	<i>E. vulneris</i>	100	15	clinica
EWINGELLA	<i>E. americana</i>	85	70	clinica
HAFNIA	<i>H. alvei</i>	90	5	ambientale
KLEBSIELLA	<i>K. pneumoniae</i>	99	98	fecale
	<i>K. oxytoca</i>	100	100	fecale
	<i>K. groupe</i>	100	100	clinica
	<i>K. panticola</i>	100	100	ambientale e clinica
	<i>K. ozaenae</i>	80	30	clinica
	<i>K. terrigena</i>	100	100	ambientale
	<i>K. trevisanii</i>			clinica
KLUYVERA	<i>K. ascorbata</i>	100	98	clinica
	<i>K. cryocrescens</i>	100	95	clinica
KOSERELLA	<i>K. trabulsii</i>	100	0	clinica
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	100	100	clinica e ambientale
MOELLERELLA	<i>M. wisconsensis</i>	90	100	fecale
RAHNELLA	<i>R. aquatilis</i>	100	100	ambientale
SALMONELLA	Sorrogroppo 3a (Arizona)	100	15	clinica e fecale
	Sottogruppo 3b (Arizona)	100	85	
SERRATIA	<i>S. marcescens</i>	95	2	clinica e ambientale
	<i>S. marcescens</i> biogrupo 1	75	4	
	<i>S. liquefaciens</i>	93	10	ambientale
	<i>S. rubidaea (S. marinorubra)</i>	100	100	
	<i>S. odorifera</i> biogrupo 1	100	70	clinica
	<i>S. odorifera</i> biogrupo 2	100	97	clinica
	<i>S. plymuthica</i>	70	80	ambientale
	<i>S. ficaria</i>	100	15	fichi
	<i>S. fonticola</i>	100	97	ambientale
	<i>S. grimesii</i>			clinica
YERSINIA	<i>Y. enterocolitica</i>	95	5	ambientale e clinica
	<i>Y. frederiksenii</i>	100	40	ambientale e clinica
	<i>Y. intermedia</i>	90	35	ambientale e clinica
	<i>Y. kristensenii</i>	70	8	ambientale e clinica

**Tab. 3.** Caratteri biochimici (test IMVIC) di *Klebsiella pneumoniae* e dei due taxa D e J: solo i test RM e acetoina differiscono.

	<i>K. pneumoniae</i>	Taxon D	Taxon J
Glucosio GAS	+	+	+
Lattosio	+	+	+
Dulcitololo	D	D	D
Indolo	-	-	-
Rosso di metile	-	+	+
Acetoina	+	-	+
Ureasi	+	+	+
Utilizzazione:			
Citrato	+	+	+
Malonato	+	+ o -	+
Mucate	+	+	+

**Tab. 4.** Caratteri biochimici (test IMVIC) di *Enterobacter cloacae* e del taxa E: solo il carattere acetoina differisce.

	<i>Enterobacter cloacae</i>	Taxon E
KNC	+	+
Indolo	-	-
Rosso di metile	-	-
Acetoina	+	-
Ureasi	+ o -	+ o -
Gelatinasi	(+)	(+)
Malonato	+	+
Tartrato Jordan	- o +	- o +
LDC	-	-
ADH	+	+
ODC	+	+
Tween esterasi	-	-

**Tab. 5.** Enterobatteri identificati come *E. coli* secondo i test IMVIC.

	Ibridazione DNA/DNA
CA <sub>1</sub> (citrato +)	77 ± 2
CA <sub>3</sub> (ureasi +)	88 ± 10
CA <sub>5</sub> (ureasi +)	80 ± 1
	27 ± 1
CB <sub>1</sub>	17 ± 1
	15 ± 1
	29 ± 2
CB <sub>2</sub>	29 ± 2
	26 ± 2
	26 ± 7
CB <sub>3</sub>	29 ± 7
	24 ± 7
	29 ± 4
CB <sub>4</sub>	31 ± 4
	30 ± 3

do tra i 2000-3000 enterobatteri studiati i caratteri più significativi. L'efficacia del sistema, descritto sul piano tecnico da GAVINI e collaboratori<sup>22</sup>, è stata valutata con successo su circa 279 ceppi β galattosidasi + isolati in clinica e identificati comparativamente secondo i metodi API e MICRO ID. Il metodo è stato ugualmente applicato senza alcuna difficoltà tecnica per l'identificazione di 564 ceppi isolati da campioni d'acqua ed è oggi largamente diffuso. La preparazione d'anticorpi monoclonali anti *E. coli* può essere un'alternativa semplice e rapida alla identificazione biochimica, soprattutto se viene dimostrato che essi sono specifici di specie.

### I.3. FISILOGIA; TEMPERATURA DI CRESCITA

La diversa attitudine di crescita dei batteri in funzione della temperatura è nota da molti anni. Si distinguono infatti batteri mesofili, psicofili, psicrotrofi, termotrofi, termofili<sup>40</sup>. Sebbene su tali definizioni gli autori siano lontani dall'essere d'accordo, si potrebbe schematizzare dicendo che i mesofili crescono in modo ottimale alla temperatura di 37 °C; gli psicrotrofi ne sono ugualmente capaci ma si sviluppano anche alle basse temperature mentre gli psicofili hanno un optimum di crescita situato tra 10 °C e 20 °C; i termotrofi e i termofili hanno analoghe caratteristiche, ma a temperature elevate.

Questa attitudine è stata sfruttata con successo per separare i ceppi di coliformi termotolleranti, detti "fecali", dagli altri. Da decenni infatti, test ad alta temperatura sono stati proposti per ricercare i coliformi fecali. Per stabilire questa distinzione conviene scegliere una temperatura di crescita capace di ottenere nel minor tempo il massimo di capacità discriminante tra i ceppi delle due categorie considerate. Le temperature elevate che selezionano i germi fecali sono a priori le più favorevoli perché le più rapide. Questi test ad "alta temperatura", proposti per la prima volta da EIJKMAN nel 1904<sup>11</sup>, sono stati largamente applicati per la ricerca di *Escherichia coli* o dei coliformi fecali<sup>7,13,39,47</sup>. Tutti utilizzano una temperatura di 44 °C o 44,5 °C.

Lo sviluppo della tassonomia e l'esistenza di numerose nuove specie ci hanno spinto a riesaminare questo aspetto: le tabelle 6 e 7 riassumono i dati estratti da lavori di GAVINI e collaboratori<sup>17, 19, 21</sup>. Le curve di crescita di diverse specie di enterobatteri

**Tab. 6.** Enterobatteri coliformi termotrofi: tempi di generazione (in minuti).

Specie	6°C	8°C	10°C	12°C	14°C	16°C	18°C	20°C	38°C	40°C	41°C	42°C	43°C	44°C	45°C	46°C	47°C
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	367	350	230	109	74	55	35	15	15	15	16	20	31	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	295	150	98	81	47	15	15	17	20	28	-	-	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	-	-	270	170	123	80	52	22	32	41	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	-	392	270	186	156	93	54	15	15	15	15	15	15	18	33	49
<i>Escherichia coli</i>	-	-	615	288	165	115	94	49	19	34	40	48	57	60	99	+	+
<i>Kluyvera ascorbata</i>	-	438	325	166	105	62	59	39	15	17	17	32	48	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	523	260	132	88	62	48	12	12	13	13	15	18	46	+	-
<i>Levinea amalonatica</i>	-	-	-	330	195	136	105	52	18	17	19	24	36	65	-	-	-

+ crescita; - assenza di crescita

**Tab. 7.** Enterobatteri coliformi psicrotrofi: tempi di generazione (in minuti).

Specie	1°C	2°C	4°C	6°C	8°C	10°C	12°C	14°C	16°C	18°C	20°C	30°C	38°C	40°C
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1219	782	538	363	170	155	105	96	80	62	40	20	48	-
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-	-	795	472	260	220	165	115	100	70	52	-	31	117
<i>Enterobacter intermedium</i>	-	-	-	593	240	212	161	90	86	58	32	-	34	66
<i>Klebsiella terrigena</i>	-	-	-	697	214	204	172	103	87	73	49	-	28	69
<i>Rhanella aquatilis</i>	1010	650	515	293	210	176	140	105	89	70	40	30	100	-
<i>Serratia fonticola</i>	952	711	478	420	205	174	120	93	79	60	41	25	38	-
<i>Serratia odorifera</i>	-	-	605	512	210	201	167	103	89	59	47	-	52	88
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	610	450	230	170	140	112	84	65	56	36	24	27	-

+ crescita; - assenza di crescita

conosciuti e di altri recentemente denominati sono state studiate a varie temperature (da 1 °C a 44 °C e a 47 °C) con un fotometro automatico gestito da micro-processore che fornisce le caratteristiche di crescita (tasso di crescita-tempo di generazione),

A titolo d'esempio, è interessante, nelle figure 1 e 2, confrontare le curve di crescita di specie che si coltivano ad alta e a bassa temperatura. Come si può constatare dalla tabella 6, la temperatura di 44 °C – che è quella abitualmente impiegata – impedisce la crescita di un numero importante di ceppi fecali; ciò conferma le nostre osservazioni precedenti<sup>17, 19, 21</sup> e quelle di altri autori<sup>41</sup>.

È dunque sempre possibile distinguere due categorie di coliformi, con alcune precisazioni:

- gli uni hanno una temperatura ottimale di crescita situata tra 36 e 38°C (probabilmente 37°C); essi sono capaci di moltiplicarsi a temperature elevate, sempre a 41 °C e spesso a 44 °C (in 16 ore in brodo nutritivo); essi sono invece incapaci di svilupparsi a 4 °C in 30 giorni; si tratta dei coliformi termotrofi, spesso chiamati termotolleranti. I coliformi fecali appartengono a questa categoria ma sarebbe azzardato pretendere che questa categoria comprenda esclusivamente coliformi fecali:
- gli altri hanno una temperatura ottimale di crescita compresa tra 30 °C e 34 °C (probabilmente 32 °C); si moltiplicano rapidamente a 4 °C in 2-4 giorni e a 10 °C in un giorno; sono invece incapaci di svilupparsi a 41 °C e, ancor meno, a 44 °C; si tratta dei coliformi psicrotrofi nel senso definito

nel lavoro di MOSSEL e SWART<sup>41</sup>, STOCES, INGRAM<sup>28</sup> e MORITA<sup>40</sup> che non fanno parte della flora fecale degli animali a sangue caldo.

## II. Aspetti ecologici

### II.1. HABITAT FECALE

Il tubo digestivo dell'uomo costituisce un vasto ecosistema microbico composto essenzialmente da comunità di microrganismi autoctoni o indigeni che possono essere contaminate da microrganismi alloctoni semplicemente in transito o che si insediano in un habitat lasciato vacante.

La flora più studiata, quella fecale, rappresenta il bilancio delle fermentazioni cecali e delle putrefazioni coliche associate alla disidratazione sigmoidiana. Sebbene questa flora sia stata oggetto di una moltitudine di lavori, nessuno di questi fa riferimento ad enterobatteri diversi da *Escherichia coli*. In effetti, la predominanza di *E. coli* rispetto agli altri enterobatteri è tale da impedire, nella maggior parte dei casi, il loro isolamento e quindi il loro riconoscimento. In questo ambito possono rivelarsi utili le sole analisi quantitative realizzate con l'aiuto di terreni selettivi. Per questa ragione, abbiamo affrontato lo studio della distribuzione dei coliformi nei materiali fecali avvalendoci di due terreni, uno per *E. coli* (agar lattosato) e l'altro per le altre specie appartenenti ai generi *Klebsiella*, *Citrobacter-Levinea* ed *Enterobacter*.

Le tabelle 8 e 9 sintetizzano i risultati riguardanti, in particolare, la frequenza e le concentrazioni delle diverse specie<sup>36</sup>. Gli enterobatteri isolati diversi da *E.*

Tab. 8. Flora fecale umana: studi quantitativi.

Gruppo	specie	UFC/g	%	Frequenza
Batteri totali (aerobi + anaerobi)	...	$1,5 \cdot 10^{10}$	30	
Batteri aerobi	...	$7 \cdot 10^8$	30	
Aerobi Gram negativi	<i>E. coli</i>	$4 \cdot 10^8$	30	costante
	<i>Citrobacter-Levinea</i>	$1 \cdot 10^6$	20	elevata
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$4 \cdot 10^4$	14	media
	<i>Enterobacter cloacae</i>	$1 \cdot 10^5$	3	rara
Anaerobi Gram negativi	<i>Bacteroides</i>	$1 \cdot 10^{10}$	30	costante
	<i>Lactobacillus</i>	$1 \cdot 10^9$	30	costante
Anaerobi Gram positivi	<i>Clostridium</i>	$4 \cdot 10^6$	23	elevata
Lieviti	...	$5 \cdot 10^4$	20	elevata
Muffe	...	$4 \cdot 10^4$	16	media

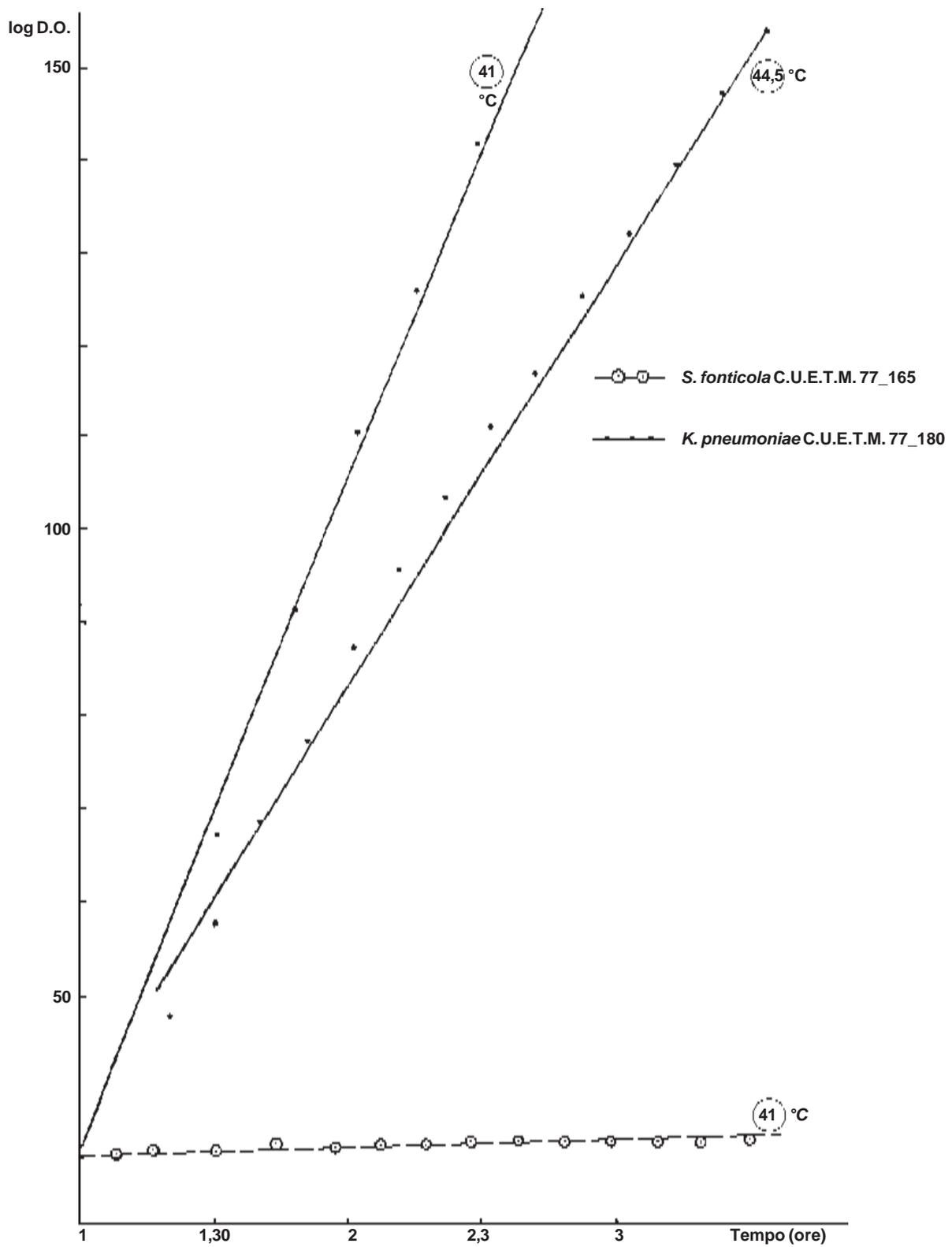


Fig. 1. Curve di crescita di *S. fonticola* (psicrotrofi) e *K. pneumoniae* (termotrofi) a temperature alte

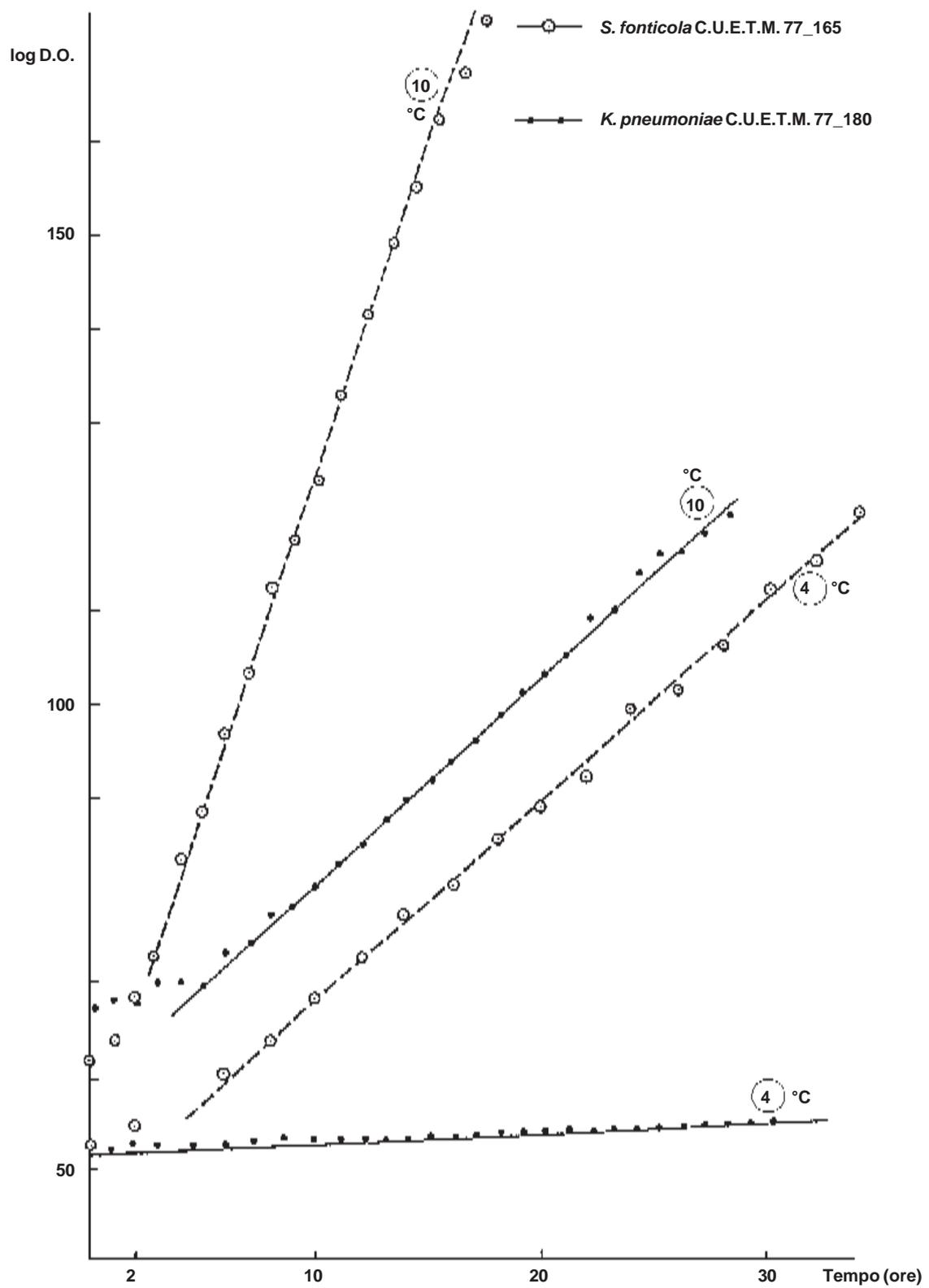


Fig. 2. Curve di crescita di *S. fonticola* (psicrotrofi) e *K pneumoniae* (termotrofi) a temperature basse.

**Tab. 9.** Flora fecale umana (adulti)

Flora	Genere o specie	conc./g
<b>DOMINANTE</b>	<b>ANAEROBI E BACILLI LATTICI</b>	
	<i>Bacteroides</i>	10 <sup>9</sup> - 10 <sup>10</sup>
	<i>Bifidobacterium</i>	10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>
	<i>Lactobacillus</i>	10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>
<b>SUB-DOMINANTE</b>	<b>AEROBI</b>	
	<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>
	Enterococco	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>
<b>FLUTTUANTE</b>	<b>BATTERI GRAM NEGATIVI</b>	
	<i>Citrobacter-Levinea</i>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>
	<i>Klebsiella</i>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>
	<i>Enterobacter</i>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>
	<i>Proteus-Providencia</i>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>
	<b>BATTERI GRAM POSITIVI</b>	
	<i>Clostridium</i>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>
	<i>Staphylococcus</i>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>
	<i>Bacillus</i>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>
	<b>LIEVITI</b>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>
<b>FUNGI</b>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	

*coli* corrispondono a specie ben conosciute dei generi *Citrobacter-Levinea*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Va precisato che questo lavoro, che risale al 1980, non aveva l'obiettivo di ricercare sistematicamente specie insolite; pertanto le identificazioni sono state tutte ottenute con una fortissima probabilità. Appare dunque poco probabile, allo stato attuale delle nostre conoscenze, che l'una o l'altra delle nuove specie appartenga alla flora fecale autoctona. È auspicabile la realizzazione di studi ecologici in questo campo.

## II.2. DISTRIBUZIONE NELL'AMBIENTE

I risultati dei nostri studi sulla distribuzione delle differenti specie di coliformi nell'ambiente acquatico e tellurico<sup>17, 19, 21</sup> sono riassunti nelle tabelle 10 e 11.

Tenendo conto della contaminazione fecale o meno degli ambienti studiati, è possibile distinguere chiaramente due categorie di coliformi. La prima comprende le specie già note dei generi *Citrobacter* e *Levinea*, *Klebsiella pneumoniae* ed *Enterobacter cloacae*, rinvenibili abitualmente nei materiali fecali umani o

**Tab. 10.** Habitat e temperature di crescita degli enterobatteri acetoina negativi (apparentati a *Citrobacter*).

Specie	Feci	Acque usate	Acque superfic.	Acque potabili	Terre vergini	Crescita a 4°C	Crescita a 41°C	Crescita a 44°C
<i>Levinea malonatica</i>	+	+	-	-	-	0%	100%	75%
<i>Levinea amalonatica</i>	+	+	+	-	-	0%	100%	80%
<i>Citrobacter freundii</i> (biotipo H <sub>2</sub> S)	+	+	+	-	-	40%	100%	67%
<i>Serratia fonticola</i>	-	-	-	+	+	100%	0%	0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	30%	100%	70%
<i>Enterobacter cloacae</i> (acetoina -)	+	+	+	-	-	0%	100%	80%
<i>Buttiauxella agrestis</i>	-	-	-	+	+	90%	0%	0%

**Tab. 11.** Habitat e temperature di crescita degli enterobatteri acetoina positivi (apparentati a *Enterobacter*).

Specie	Feci	Acque usate	Acque superfic.	Acque potabili	Terre vergini	Crescita a 4°C	Crescita a 41°C	Crescita a 44°C
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	-	9%	100%	46%
<i>Enterobacter intermedium</i>	-	-	-	+	+	91%	0%	0%
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	95%	0%	0%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-	-	-	+	+	86%	0%	0%
<i>Hafnia alvei</i> (biotipo lattosio -)	-	+	+	+	-	100%	42%	0%
<i>Hafnia alvei</i> (biotipo lattosio +)	+	+	-	-	-	100%	75%	0%

animali, nelle acque usate, nelle acque superficiali inquinate e mai isolate dalle acque potabili (non inquinate e controllate) o da terre vergini. La seconda corrisponde a specie nuove come *Serratia fonticola*, *Buttiauxella agrestis*, *Enterobacter intermedium*, *Enterobacter amnigenus*, *Klebsiella terrigena*, *K. trevisanii* che, al contrario, provengono unicamente da acque potabili e da terre vergini. Questi studi mostrano chiaramente l'esistenza di una relazione privilegiata tra il biotipo dei ceppi e la loro nuova appartenenza tassonomica.

La notevole frequenza di isolamento di queste specie dalle acque, in particolare dalle reti acquedottistiche, ci ha indotto a studiare la loro distribuzione mondiale<sup>20</sup> esaminando 1017 ceppi di coliformi isolati da acque potabili provenienti da 23 laboratori ripartiti su più continenti (8 in Francia; altri 8 in Europa; 3 in Africa del Nord: Algeria, Tunisia, Marocco; 2 in Canada; 2 in America del Sud). La tabella 12 mette in evidenza la varietà delle specie isolate e la larga distribuzione dei ceppi non fecali (così come indicato nelle nostre osservazioni preliminari) in paesi e continenti differenti e nei più diversi orizzonti geografici e climatici.

### II.3. DINAMICA DELLE POPOLAZIONI DI COLIFORMI NELL'AMBIENTE ACQUATICO

È possibile studiare la dinamica delle popolazioni microbiche nell'ambiente acquatico, in particolare quella dei coliformi, grazie a bacini sperimentali (lagunaggio) nei quali il flusso idrico può essere seguito mediante marcatori e le cellule batteriche e le particelle virali possono essere ricercate e quantificate in funzione del tempo di ritenzione. In un bacino alimentato da un'acqua di fiume fortemente inquinata le abbondanti popolazioni di "bioindicatori" possono essere seguite nella loro evoluzione spazio-temporale. I risultati ottenuti nel corso di una sperimentazione<sup>57, 58, 59</sup> con una modesta portata influente di acqua inquinata (2,6 l/min) e un tempo di permanenza elevato sono interpretati graficamente (figura 3) secondo la teoria di MARAIS e SHAW<sup>57</sup>, espressi cioè come percentuali di sopravvivenza in funzione dei tempi di ritenzione.

Si può supporre che le popolazioni di coliformi si evolvano nell'ambiente in funzione dei loro biotipi d'origine, della loro propria fisiologia, legata probabilmente alla loro appartenenza tassonomica. Si osserva infatti una grande differenza nel decadimento

**Tab. 12.** Ripartizione degli enterobatteri coliformi in funzione dell'origine dell'acqua e della sua distribuzione.

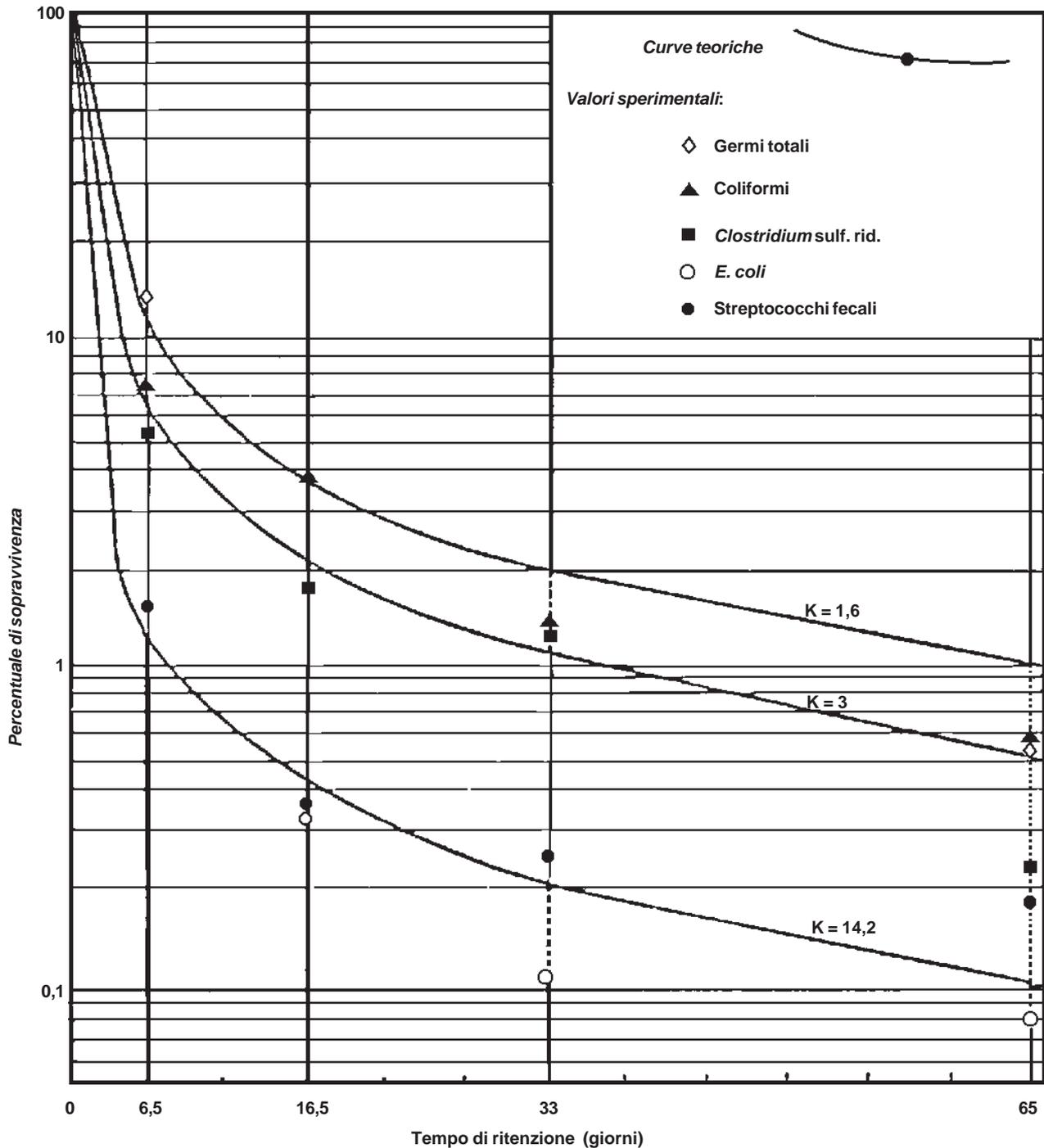
Origine Tipi	Tot.	% <sup>a</sup>	Sorgenti		Pozzi		Trivellazioni		Fiumi		Laghi	
			D	F	D	F	D	F	D	F	D	F
↓Specie n° ceppi→	1017	100	119	186	163	178	61	57	12	226	12	3
<i>C. freundii</i>	184	18	15	25	38	29	29	18	1	28	1	0
<i>E. agglomerans</i> <sup>b</sup>	113	11	13	12	12	6	5	2	1	62	0	0
<i>S. fonticola</i> <sup>b</sup>	86	8	12	12	2	53	0	0	3	1	3	0
<i>R. aquatilis</i> <sup>b</sup>	73	7	5	53	4	9	0	0	0	0	2	0
<i>E. cloacae</i>	68	7	0	8	16	5	5	2	1	31	0	0
<i>K. trevisanii</i> <sup>b</sup>	63	6	3	1	13	5	0	7	4	29	1	0
<i>K. oxytoca</i>	50	5	3	4	7	4	2	4	0	26	0	0
<i>E. amnigenus</i> <sup>b</sup>	46	5	10	7	12	5	1	2	0	8	1	0
<i>K. terrigena</i> <sup>b</sup>	44	4	8	11	8	6	4	2	0	4	1	0
<i>E. coli</i>	36	4	1	10	6	10	0	3	6	0	0	0

*K. pneumoniae* (2%); *B. agrestis* (2%); *H. alvei* (2%); *S. liquefaciens* (2%); *E. sakazakii* (1%); *E. intermedium* (1%); *K. mobilis* (1%); *S. plymuthica* (1%); *S. marcescens* (1%); *Y. intermedia* (1%); *Y. enterocolitica* (1%); *Y. frederiksenii* (1%); non identificati (10%).

<sup>a</sup> percentuale sul numero totale di ceppi (1017)

<sup>b</sup> ceppi non fecali D= distribuzione; F= captazione

## Dinamiche di popolazione e qualità della acque



**Fig. 3.** Evoluzione delle differenti specie batteriche. Le curve sono calcolate a partire dall'equazione di MARAIS e SHAW ( $N/N_0 = 100 / (KR + 1)$ ).

( $N/N_0$ ) = percentuale di sopravvivenza,

K = costante d'eliminazione, R = tempo di ritenzione.

fra le popolazioni di *Escherichia coli* e quelle dei coliformi, con costanti di eliminazione rispettivamente di 19,2 ( $K_1$ ) e di 3 ( $K_2$ ). I fattori suscettibili di spiegare questi effetti di autodepurazione sono di ordine fisico (temperatura, pH, energia solare incidente, energia radiante trasmessa), chimico (concentrazione di ossigeno e di materie organiche) e biologico (clorofilla, predatori). Sembra che i nuovi dati tassonomici permettano di interpretare queste differenze d'eliminazione fra *E. coli* e coliformi. In effetti, gli *E. coli* ospiti dell'intestino umano ed animale non possono sopravvivere in un ambiente ostile, troppo differente dal loro habitat naturale. I coliformi, soprattutto le nuove specie isolate nell'ambiente acquatico, hanno sicuramente un vantaggio ecologico maggiore rispetto ad *E. coli* sia in termini di sopravvivenza sia, più verosimilmente, per la loro facoltà di moltiplicarsi a temperature che non sono loro necessariamente sfavorevoli. Questa ipotesi potrebbe spiegare l'inversione del rapporto coliformi/*E. coli* che,

attestato da 1:1000 a 1:10000 nei materiali fecali, diviene uguale a 1:1 o superiore a uno nelle acque usate e dell'ordine di 10:1 e perfino 100:1 nell'ambiente recettore (fiumi, laghi, stagni, estuari, litorali).

Questo andamento dell'evoluzione microbica è ancora più netto nel caso di certi effluenti industriali ricchi in materie organiche, come quelli provenienti da industrie conserviere, distillerie, cartiere, ecc.<sup>2, 10, 26, 52</sup> I coliformi isolati da questi effluenti, in assenza di ogni contaminazione fecale, potrebbero appartenere proprio a queste nuove specie.

#### II.4. COLONIZZATORI. PATOGENI OPPORTUNISTI

Molte di queste nuove specie sono state isolate e descritte pressoché esclusivamente in clinica, come mostra la tabella 13, che precisa l'origine dei campioni. Si tratta, evidentemente, di germi "colonizzatori" che contaminano i malati e la loro flora, o si moltiplicano nei campioni. Essi sono particolarmente frequenti nell'espettorato e nelle piaghe e, in certe occa-

Tab. 13. Enterobatteri coliformi isolati in clinica.

	Sangue	Liquor cef.-rac.	Espettorato	Urina	Feci	Piaghe
<b><i>Cedecea</i></b>						
<i>C. davisae</i>	-	-	+++	-	+	+
<i>C. lapagei</i>	-	-	+++	-	-	-
<i>C. neteri</i>	+	-	+	-	-	+
<b><i>Enterobacter</i></b>						
<i>E. gergoviae</i>	+	-	+++	+	-	+
<i>E. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+	+++
<i>E. taylorae</i>	-	-	+	+	+	+++
<b><i>Escherichia</i></b>						
<i>E. hermanii</i>	+	+	+	+	+++	+++
<i>E. vulneris</i>	+		+	+		+++
<b><i>Ewingella</i></b>						
<i>E. americana</i>	++	-	+++	+	+	++
<b><i>Kluyvera</i></b>						
<i>K. ascorbata</i>	+	-	+++	++	++	-
<b><i>Koserella</i></b>						
<i>K. trabulsii</i>	-	-	+++	-	+	+++
<b><i>Leclercia</i></b>						
<i>L. adecarboxylata</i>						
<b><i>Serratia</i></b>						
<i>S. odorifera 1</i>	-	-	+++	-	+	+
<i>S. odorifera 2</i>	++	+	+++	+	+	+

sioni, possono rivelarsi patogeni. Sono quindi batteri patogeni opportunisti che infettano solo soggetti le cui difese locali o generali sono diminuite, sia per un deficit immunitario reale, sia in seguito a terapia immunodepressiva. Questi malati sono particolarmente frequenti in certi reparti ospedalieri detti "a rischio". L'isolamento privilegiato di certi germi opportunisti nell'ambiente ospedaliero è dovuto in parte alla maggior frequenza di questi malati "recettori" e in parte al miglioramento dei metodi di diagnostica che prendono in considerazione le nuove specie man mano che vengono descritte.

Questo potere patogeno opportunistico ha una relazione privilegiata con lo stato dell'organismo, non con una specie batterica. Tutte le specie riconosciute come indicatori, appartenenti ai generi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter-Levinea*, elencate nelle tabelle 1 e 2 sono state descritte come patogeni opportunisti da molto tempo. Oltre ad esse, anche le specie che sembrano specificatamente legate all'habitat acquatico possono rivelarsi opportuniste. È così, per esempio, per *Klebsiella planticola* (*K. trevisanii*) che abbiamo isolato frequentemente dalle acque superficiali, di scarico, potabili e dai terreni vergini e che si incontra oggi nell'ambiente ospedaliero, come "colonizzatore", e nelle infezioni nosocomiali. Non sembra dunque che questa capacità di potere patogeno opportunistico possa essere presa in considerazione nella nostra riflessione sugli indicatori batterici.

### III. Epidemiologia

Per valutare il significato degli indicatori dal punto di vista epidemiologico –cioè come fonte di rischi infettivi– ad esempio per il consumatore di acqua contaminata, è necessario il supporto di indagini epidemiologiche che accertino l'esistenza di una correlazione tra la presenza dell'indicatore e la comparsa dell'infezione (maggiore è il numero dei germi indicatori, più frequente è l'infezione).

Sfortunatamente questo tipo di indagine, seducente sul piano teorico, è di difficile realizzazione. Si può citare, ad esempio, la ricerca di PETERSEN e HINES<sup>46</sup> sui tassi di infezioni gastro-intestinali in popolazioni servite da acque di diversa qualità (tabelle 14 e 15).

Nella comunità A, con acqua potabile pessima, il tasso di gastroenteriti nel corso dei 3 mesi d'estate è

del 17,1% cioè circa il doppio di quello riscontrato nella comunità D, E, F, servite da acqua di qualità soddisfacente. La tabella 15 illustra l'effetto dell'acclimazione in aree con acque di scadente qualità.

Più recentemente in Francia, negli anni 1983-84, è stato condotto da FERLEY e coll.<sup>14</sup> uno studio longitudinale di 18 mesi sui rischi digestivi (diarrea, vomito, nausea, dolori addominali) legati al consumo di acqua potabile non conforme alle norme batteriologiche. In alcune regioni rurali francesi, in effetti, permangono comuni alimentati con acqua non trattata di qualità batteriologica fluttuante (talvolta buona, talvolta cattiva). A differenza dei comuni serviti da acque di buona qualità, quelli con popolazioni a rischio rappresentano campioni privilegiati per l'indagine (tabella 16).

Nei 50 comuni selezionati (29272 abitanti), i casi di infezioni digestive acute sono stati registrati dai medici, dai farmacisti e dai maestri per un periodo di 18 mesi durante il quale le acque potabili venivano analizzate per 4 indicatori (batteri totali, coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali). Il rischio relativo, cioè il rapporto tra il tasso di malattia nei soggetti esposti al probabile fattore causale (gruppo cattivo) e il tasso nei non esposti (gruppo buono) è

**Tab. 14.** Infezioni gastro-intestinali e qualità batteriologica dell'acqua potabile: tasso d'infezione.

Comunità	% di campioni + (in tubi)	Tasso di infezione nel corso dei 3 mesi estivi
A	100	17,1
B	90	14
C	72,5	11,9
D	0	9,9
E	2,5	9,1
F	1,7	7,5

**Tab. 15.** Infezioni gastro-intestinali e qualità batteriologica dell'acqua potabile: effetto dell'acclimazione.

	Tasso di infezione nei 3 mesi estivi	
	3 comunità con acqua scadente	3 comunità con acqua di elevata qualità
meno di 2 anni di residenza	21,6	9,4
più di 2 anni di residenza	10,8	8,5

risultato 3,5 per i casi notificati dai medici e dai farmacisti nella popolazione generale e 1,7 per i disturbi osservati dai maestri nei bambini (intervalli di confidenza 95%). Questa differenza tra le popolazioni esposte e non esposte è concordante e significativa, ma non è costante nell'arco di tempo di durata dell'indagine.

Questa indagine confermerebbe sia l'effettiva correlazione degli indicatori scelti ad un reale rischio infettivo, sia la validità della normativa sulle acque potabili. Per confermare quest'ultimo aspetto sarebbe necessario accertare la natura di queste gastro-enteriti. D'altronde, alla luce delle nuove conoscenze tassonomiche, sarebbe auspicabile analizzare la relazione non in rapporto ad una popolazione eterogenea di coliformi, ma rispetto alle singole specie che la costituiscono.

#### IV. Applicazioni dei nuovi dati al controllo batteriologico

Occorre dunque indagare sull'incidenza della presenza di queste nuove specie nei campioni d'acqua potabile e sul loro significato. In uno studio su 8005 campioni d'acqua potabile abbiamo isolato e identificato 564 ceppi di coliformi; i risultati, riassunti nella tabella 17, mostrano che nel 65,5% dei casi i coliformi isolati non sono di origine fecale. Cinque specie rappresentano da sole più del 50% degli isolamenti: le più importanti sono *Buttiauxella agrestis* (24,3%), *Rahnella aquatilis* (8,5%) e *Klebsiella terrigena* (5,3%). Tutti i ceppi di queste specie sembrano provenire da ambienti acquatici (trivellazioni, pozzi, sorgenti) per evolversi, transitare – e probabilmente moltiplicarsi – a livello delle stazioni di pompaggio, dei serbatoi o delle reti di distribuzione, soprattutto quan-

do le acque non sono trattate.

La tabella 18 mostra che, su 8005 campioni d'acqua esaminati, 771 contengono batteri considerati indicatori di contaminazione fecale. Tuttavia, 283 di questi 771 campioni (il 36,7%) contengono coliformi che non hanno alcun significato di contaminazione fecale: ciò dimostra che nel 36,7% dei campioni d'acqua risultati positivi (contenenti cioè dei coliformi) – pari al 3,6% del totale dei campioni analizzati – l'interpretazione analitica data dalle norme della Comunità Europea<sup>43</sup> (che considera queste acque “non potabili”) è errata. Questa percentuale varia secondo l'origine delle acque; essa, in effetti, è del 41,1% per le acque potabili soggette a disinfezione, del 32,4% per quelle non disinfettate e del 57,1% per le acque imbottigliate. Le concentrazioni di coliformi riscontrate nei campioni sono abitualmente basse: il 34% dei 771 campioni considerati conteneva meno di 5 coliformi per 100 ml.

#### V. Indicazioni pratiche e normative.

Sarebbe colpevole per l'igienista ignorare questo insieme di dati, strettamente interdipendenti, di natura batteriologica (tassonomica), fisiologica (temperatura di crescita) e ecologica (distribuzione) che ci invitano a rivedere le nostre concezioni sulla natura degli indicatori e sul loro uso nel controllo batteriologico dell'acqua.

##### V.1. NECESSITÀ DI UNA CLASSIFICAZIONE AGGIORNATA DEGLI INDICATORI

Come tutte le scienze, la tassonomia evolve. La proliferazione delle specie che ne risulta è considerata da alcuni come una spiacevole fonte di confusione. In effetti, come fa osservare BRENNER<sup>5</sup> il problema non è

**Tab. 16.** Disturbi digestivi acuti osservati fra la popolazione generale in gruppi di villaggi con diversa qualità dell'acqua, secondo la fonte d'informazione.

	Gruppo buono	Gruppo variabile	Gruppo scadente	Totale
Persone; settimane	530; 858	824; 576	481; 869	1837; 303
Medici + farmacisti	44	74	139	257
incidenza %	0,08	0,09	0,29	0,14
Medici + farmacisti + maestri (“casi obiettivi”)	213	380	319	912
incidenza %	0,40	0,46	0,66	0,50
Medici + farmacisti + maestri (“tutti i casi”)	431	770	749	1950
incidenza %	0,81	0,93	1,55	1,06

**Tab. 17.** Distribuzione e identificazione dei coliformi nei campioni d'acqua analizzati.

Origine	Trivel- lazioni	Stazioni di pomaggio	Serbatoi	Acquedotti trattati	Acquedotti non trattati	Pozzi	Sorgenti	Acque imbottigliate	Totale
Specie	61	40	78	162	143	30	25	25	564
COLIFORMI NON FECALI (%)									
<i>Buttiauxella agrestis</i>	21,3	30,0	32,0	17,3	34,2	20,0	12,0	4,0	24,3
<i>R. aquatilis</i>	6,6	12,5	5,1	12,4	6,3	6,7	4,0	12,0	8,5
<i>K. terrigena</i>	18,0	7,5	5,1	5,5	4,9	6,7	-	20,0	7,3
<i>E. amnigena</i>	1,6	5,0	6,4	6,8	5,6	6,7	12,0	8,0	6,0
<i>S. fonticola</i>	6,6	12,5	3,85	3,7	4,9	3,3	16,0	-	5,3
<i>K. trevisanii</i>	4,9	2,5	1,3	2,5	1,4	6,7	-	4,0	2,5
<i>E. sakazakii</i>	-	-	2,6	3,0	1,4	3,3	-	-	1,8
<i>E. intermedium</i>	-	-	-	1,25	3,5	3,3	-	-	1,4
<i>S. plymuthica</i>	1,6	-	1,3	1,25	-	-	-	4,0	0,9
<i>S. liquefaciens</i>	-	-	-	1,85	1,4	-	-	-	0,9
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	4,0	-	0,2
ceppi non identificati	4,9	7,5	10,25	6,2	5,6	6,7	4,0	12,0	6,7
% su totale CNF <sup>1</sup>	65,5	77,5	67,9	61,75	69,2	63,4	52,0	64,0	65,8
COLIFORMI DI POSSIBILE ORIGINE FECALE (%)									
<i>E. cloacae</i>	8,2	5,0	12,8	10,5	14,0	10,0	12,0	20,0	11,5
<i>C. freundii</i>	14,7	17,5	12,8	14,2	7,0	10,0	12,0	20,0	11,5
<i>K. oxytoca</i>	3,3	-	1,3	6,8	4,2	10,0	16,0	4,0	5,0
<i>E. coli</i>	6,6	-	5,1	4,3	3,5	3,3	-	-	3,7
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	1,2	2,1	3,3	4,0	12,0	1,8
<i>H. alvei</i>	1,6	-	-	1,25	-	-	4,0	-	0,7
% su totale CF <sup>2</sup>	34,4	22,5	32,0	38,3	30,8	36,6	48,0	36,0	34,2

<sup>1</sup> CNF= Coliformi non fecali;<sup>2</sup> CF= Coliformi di possibile origine fecale**Tab. 18.** Batteri contaminanti le acque dichiarate non potabili secondo le norme europee.

Batteri indicatori	Acque in rete		Acque imbottigliate (91)	Totale (8005)
	disinfettate (5533)	non disinfettate (2381)		
solo CF	125	208	5	338
solo SF	32	39	2	73
solo CNF	132	139	12	283
CNF + SF	6	9	0	15
CNF + CF	13	17	2	32
CF + SF	13	17	0	30
Totale	321	429	21	771

CF= Coliformi non fecali;

SF= Streptococchi fecali;

CNF= Coliformi non fecali, isolati a 37 °C.

quello dell'aumento del numero delle specie, ma quello della loro migliore definizione e della loro accettazione da parte di tutti. Al contrario, l'aumento del numero delle specie deve andare di pari passo con una migliore conoscenza del loro ruolo e del loro significato in ecologia, in epidemiologia, in igiene, ecc. Il gruppo dei coliformi –che comprendeva nel passato numerose specie intermedie o atipiche non identificabili– diviene così un insieme di specie geneticamente distinte e, d'ora in poi, perfettamente identificabili.

L'accoppiamento dei dati tassonomici con le particolarità fisiologiche ed ecologiche consente di stabilire una classificazione aggiornata degli enterobatteri

coliformi (tabella 19). Questa classificazione, utile nell'igiene e nella sanità pubblica, permette di legare la tassonomia all'interesse igienico o epidemiologico di ciascuna specie. È così chiaro, finalmente, che certe specie –come *E. coli*, *K. pneumoniae* ed *E. cloacae*– sono di origine fecale e che altre –come *Buttiauxella agrestis*, *Rahnella aquatilis* e *Enterobacter amnigenus*– non sono di origine fecale. Le specie appartenenti ai tre gruppi della tabella 19 possono essere semplici colonizzatrici o patogene opportuniste. Alcune sono dei patogeni “specifici”, possono cioè determinare disturbi patologici anche ad individui in buona salute: è il caso di *Yersinia enterocolitica*, delle

**Tab. 19.** Classificazione aggiornata degli enterobatteri coliformi.

Coliformi fecali	Coliformi non fecali	
	acquatici o tellurici	isolati in clinica
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Budvicia aquatica</i>	<i>Cedecea davisae</i>
<i>Citrobacter diversus</i>		<i>Cedecea lapagei</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Cedecea neteri</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter intermedium</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>
	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Enterobacter taylorae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Leclercia adenocarboxylata</i>	<i>Escherichia hermanii</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Escherichia vulneris</i>
	<i>Rahnella aquatilis</i>	
<i>Moellerella wisconsensis</i>		<i>Ewingella americana</i>
	<i>Serratia liquefaciens</i>	
<i>Salmonella</i> (sottogenere III* Arizona)	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Klebsiella trevisanii</i>
	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Klebsiella ozenae</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i> *	<i>Yersinia frederiksenii</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>
	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
	<i>Yersinia kristensenii</i>	
		<i>Koserella trabulsii</i>
		<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Serratia rubidea</i>
		<i>Serratia odorifera</i>
		<i>Serratia grimesii</i>
Tutti eterotrofi o termotolleranti**	Tutti psicrotrofi o psicrotolleranti	Mesofili o termotrofi o psicrotrofi

\* Le *Salmonella* del gruppo III (Arizona) e *Yersinia enterocolitica* sono patogeni specifici

\*\* *Yersinia enterocolitica* è psicrotrofa ma si sviluppa anche a temperature elevate (42 °C)

*Salmonella* del gruppo III (*Arizona*) e di *Shigella sonnei*, responsabili di gastroenteriti o di diarreie.

#### V.2. L'INTERESSE DI UNA IDENTIFICAZIONE

##### A LIVELLO DI SPECIE

L'identificazione di specie, nel gruppo dei coliformi, si basava artificialmente su qualche carattere; PARR<sup>45</sup> aveva portato questa identificazione al suo più alto grado di perfezione con il test IMVIC. I metodi d'identificazione numerica, che poggiano sulla più o meno grande probabilità di un ceppo d'appartenere a un profilo di riferimento, sono invece i soli soddisfacenti. Il programma che noi abbiamo proposto<sup>22</sup> fornisce le migliori identificazioni.

La possibilità, che esiste d'ora in avanti, di esprimere la contaminazione dell'acqua in termini di specie batteriche riconosciute è un passo in avanti nella conoscenza della natura della contaminazione e del suo significato. Questa possibilità dovrà essere esplorata, in particolare nei casi delle acque minerali naturali. È evidente, infatti, che l'isolamento in un'acqua minerale di un ceppo di *Rahnella aquatilis* non può avere lo stesso significato di quello di un ceppo di *Escherichia coli* o di *Klebsiella pneumoniae*.

#### V.3. IL PERMANERE DELL'INTERESSE

##### PER I COLIFORMI TERMOTOLLERANTI

Se ci si riferisce, da una parte, ai criteri fisiologici sopra rammentati e, dall'altra, alle proprietà e ai comportamenti di questi indicatori appare chiaramente che, fra i coliformi, solo quelli termotolleranti ed *E. coli* conservano il loro significato. *E. coli* resta l'indicatore privilegiato, specifico, sensibile, con comportamento quasi simile a quello dei batteri patogeni, facile da identificare con l'aiuto dei metodi probabilistici. La ricerca dei coliformi termotolleranti rappresenta l'alternativa semplificata alla ricerca di *E. coli*. D'altronde, procedendo all'identificazione dei coliformi termotolleranti<sup>44</sup>, ci si accorge che essi sono rappresentati per oltre il 99% da *E. coli*. È più che probabile che –alla temperatura di 44 °C o 44,5 °C, che è quella dei test utilizzati– gli *E. coli* siano avvantaggiati nella crescita rispetto ad altri coliformi termotolleranti compresenti, come mostrato dal nostro lavoro e da quello di NIEMELA e coll.<sup>42</sup> È dunque altrettanto probabile che questa temperatura elimini una certa percentuale di coliformi termotolleranti diversi da *E.*

*coli*, conducendo così a “falsi negativi”. La temperatura ideale di coltura, che sarà sempre un compromesso tra il massimo recupero di coliformi fecali e la massima eliminazione di coliformi non fecali, resta ancora da definire. Quella da noi proposta (41 °C) è, in ogni caso, più vicina alla realtà di quella di 44 °C o 44,5 °C.

Nei casi in cui i test ad alta temperatura risultino positivi, sembra indispensabile procedere all'identificazione dei ceppi termotolleranti con l'aiuto dei metodi probabilistici. I test semplificati per la ricerca e il conteggio dei coliformi termotolleranti non sono metodi d'identificazione ma metodi di screening per rivelare popolazioni o gruppi di specie aventi un significato. L'identificazione nel senso batteriologico del termine non può farsi che a livello di specie. Essa può essere eventualmente completata, a fini epidemiologici e per un approccio più preciso, fino all'identificazione del biotipo, del sierotipo, del lisotipo o del patotipo qualora si tratti di un germe patogeno, cosa che si verifica raramente. L'identificazione di *E. coli* delle specie appartenenti ai coliformi termotolleranti, oggi accessibile a tutti, deve essere il passaggio obbligato (intermedio o conclusivo) per meglio definire e precisare la natura di una contaminazione e, dunque, il suo reale significato.

#### V.4. L'INTERESSE DI UNA “PONDERAZIONE” DEGLI INDICATORI

I dati finora illustrati conducono, naturalmente, a riattualizzare il valore o il significato degli indicatori in quanto specie batteriche. Rapportandosi alla classificazione della tabella 17, si constata che le specie ben note dei generi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* –che sono di origine fecale e appartengono ai coliformi termotolleranti– sono degli indicatori di contaminazione fecale di alto significato e che, pertanto, occorre continuare a prenderle in considerazione.

Tra le specie non fecali è importante distinguere quelle di origine acquatica o tellurica, riscontrabili frequentemente nell'acqua, e quelle isolate in clinica come colonizzatori o patogeni opportunisti. Fra questi ultimi, alcuni si rinvencono raramente e costituiscono più che altro curiosità di laboratorio. Altre sono più frequenti ma, in effetti, tutte le specie elencate sono potenzialmente colonizzatori o patogeni opportunisti.

Queste specie, frequentemente isolate dall'acqua sotto il nome di coliformi totali, non hanno in realtà alcun significato, non essendo di origine fecale.

Questa distinzione fondamentale deve essere tenuta ben presente sia a livello dell'interpretazione che della normativa. Essa suggerisce la necessità di attribuire un peso ben diverso alle specie fecali e non fecali come già avviene, ad esempio, nella normativa sugli alimenti e come potrebbe essere recepita dalla normativa europea sulle acque.

### Conclusioni

I progressi realizzati nel corso degli ultimi venti anni nel campo della tassonomia batterica e delle sue relazioni con l'ecologia acquatica ci inducono a rivedere il concetto di enterobatteri coliformi nel suo contenuto e nel suo significato.

- La classificazione dei coliformi deve essere interamente rivista. Alcuni anni fa il gruppo comprendeva meno di 10 specie (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *oxytoca*, *Enterobacter cloacae* e *aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *diversus* e *amalonaticus*) mentre oggi sono circa 60.
- Tutte queste specie possono essere perfettamente identificate mediante i metodi probabilistici.
- I coliformi si differenziano in due gruppi fisiologicamente ed ecologicamente omogenei: gli uni, termofili (positivi al test ad alta temperatura), sono di origine fecale; gli altri, psicrotrofi, (negativi al test ad alta temperatura), sono di origine ambientale.
- La temperatura più adatta per questa differenziazione è di 41 °C (e non di 44 °C o 44,5 °C).
- I dati tassonomici ed ecologici portano a stilare una classificazione di specie di origine fecale e non fecale, classificazione che potrà essere la base della valutazione della qualità igienica dell'acqua.
- Questa classificazione mostra che solo la ricerca dei coliformi fecali o termotolleranti è significativa e che quella dei coliformi totali non ha senso.
- I metodi di screening (test dell'alta temperatura) per ricercare i coliformi termotolleranti sono indispensabili; essi dovranno essere completati con l'identificazione della specie per confermare la natura della contaminazione.

### Bibliografia

- (1) ARKWRIGHT J.A. — Natural variation of *B. acidi tactici* with respect to the production of gas from carbohydrates. *J. Hyg.*, **13**: 68-86, 1913.
- (2) BAUER R.R. — History and Background on occurrences of fecal coliforms in industrial wastes. In «The Significance of Fecal Coliforms in Industrial Wastes». R.H. Bordner and B.J. Carrol. eds. (Denvers, Colorado: National Field Investigations Center, Environmental Protection Agency, 1972).
- (3) BRAAK H.R. — Onderzoekingen over Vergisting van Glycerine. Thesis, W.D. Meinema-Uitgeurer, Delft, 1928.
- (4) BREED R.S., NORTON J.F. — Nomenclature for the colon group. *Am. J. Pub. Health*, **27**: 560-563, 1937.
- (5) BRENNER D.J. — Introduction to the family Enterobacteriaceae. p. 1105-1127. In: Starr M.P., Stolp H., Truper H.G.F., Ballows A., Schlegel H.G. The Prokaryotes. A Handbook on Habitat, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. 2. *Springer-Verlag*, Berlin, Heidelberg.
- (6) BROWN C., SEIDLER R.J. — Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Microbiol.*, **25**: 900-904, 1973.
- (7) BUTTIAUX R., SAMAILLE J., PIERENS Y. — L'identification des *Escherichia* des eaux. Test d'Eijkman et production d'indole à 44°C- Test IMVIC. *Ann. Inst. Pasteur (Lille)*, **8**: 137-149, 1956.
- (8) Buxton P.A. — Carriage of coliform bacilli by the oriental hornet. *Vespa orientalis* Fabr. *J. Hyg.*, **19**: 68-71, 1920-21.
- (9) DUCAN D.W., RAZZEL W.E. — *Klebsiella* biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produce. *App. Microbiol.*, **24**: 933-938, 1972.
- (10) EICKHOFF T.C. — *Klebsiella pneumoniae* infection: a review with reference to the water-borne epidemiologic significance of *K. pneumoniae*. Presence in the Natural Environment. Technical Bull. N° 254 (New-York: National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement, Inc., 1972).
- (11) EJKMAN C. — Die Garungsprobe Uber 46°C als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, **37**: 742, 1904.
- (12) ESCHERICH T. — Die Darmbakterien des Neugeborenen und Sauglings. *Fortschr. Med.*, **3**: 515-522, 557-564, 1885.
- (13) FENNEL H. — A single tube confirmatory test for *Escherichia coli* at 44°C. *Proc. Soc. Water Treatm. Exam.*, **21**: 13-20, 1972.
- (14) FERLEY J.P., ZMIROU D., COLLIN J.F., CHARREL M. — Etude longitudinale des risques liés à la consommation d'eaux non conformes aux normes bactériologiques. *Rev. Epidém. et Santé Publ.*, **34**: 89-99, 1986.
- (15) FRENEY J., FLEURETTE J., GRUEP L.D., DESMONCEAUX M.,

- GAVINI F., LECLERC H. — *Klebsiella trevisanii* colonisation and septicaemia. *The Lancet*, **21**: 909, 1984.
- (16) FRENEY J., GAVINI F., ALEXANDRE H., MADLER S., IZARD D., LECLERC H., FLEURETTE J. — Nosocomial infestation and colonisation by *Klebsiella trevisanii*. *J. Clin. Microbiol.*, **23**: 948-950, 1986.
- (17) GAVINI F., FERRAGUT C., LEFEBVRE B., LECLERC H. — Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant on apparentées au genre *Enterobacter*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **127 B**: 317-335, 1976.
- (18) GAVINI F., IZARD D., TRINEL P.A., LEFEBVRE B., LECLERC H. — Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant on apparentées à l'espèce *E. coli*. *Can. J. Microbiol.*, **27**: 1, 98-106, 1981.
- (19) GAVINI F., LECLERC H., LEFEBVRE B., FERRAGUT C., IZARD D. — Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant on apparentées au genre *Klebsiella*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **128 B**: 45-59, 1977.
- (20) GAVINI F., LECLERC H., MOSSEL D.A.A. — Enterobacteriaceae of the «coliform group» in drinking water: identification and worldwide distribution. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**: 312-318, 1985.
- (21) GAVINI F., LEFEBVRE B., LECLERC H. — Positions taxonomiques d'entérobactéries H<sub>2</sub>S- par rapport au genre *Citrobacter*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **127 A**: 275-295, 1976.
- (22) GAVINI F., OGER C., LEFEBVRE B., IZARD D., LECLERC H. — Development of a computer identification system for coliform strains. *J. Appl. Bacteriol.*, **52**: 329-332, 1982.
- (23) GRIMONT P.A.D. — Apport des hybridations ADN/ADN dans la taxonomie des Enterobacteriaceae. *Coll. INSERM «Les bacilles à Gram négatif d'intérêt médical et en santé publique: taxonomie, identification, applications»*, **114**: 49-67, 1983.
- (24) GRIMONT P.A.D. — Taxonomie des *Escherichia*. *Méd. et Mal. Infect.*, 6-10, 1987.
- (25) HAY H.R. — A study of the *Bacillus mucosus* Capsulates group. *J. Hyg.*, **32**: 240-257, 1932.
- (26) HERMAN D.L. — Experiences with coliform and enteric organism isolation from industrial wastes. In «The Significance of fecal coliform in industrial wastes». R. H. Bordner and B. J. Carrol eds. (Denvers, Colorado, National field investigations center, 1972).
- (27) HUSSON M.O., TRINEL P.A., IZARD D., MIELCAREK C., GAVINI F., LECLERC H. — Antigenic specificity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase studied with monoclonal antibodies: immunological characterization of *E. coli* and *Shigella* strains. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **138**: 39-48, 1987.
- (28) INGRAM M. — Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Ann. Inst. Pasteur (Lille)*, **16**: 111-118, 1965.
- (29) IZARD D., HUSSON M., VINCENT P., LECLERC H. — Méthodes rapides et automatiques d'identification des entérobactéries. *Ann. Biol. Clin.*, 419-426, 1983.
- (30) JORDAN E.O. — A report on certain species of bacteria observed in sewage. In: Sedgewick, A report of the biological work of the Lawrence Experiment Station, including an account of methods employed and results obtained in the microscopical and bacteriological investigation of sewage and water. Report on water supply and sewerage (Part. II). *Rep. Mass. Bd. Publ. Hlth*, pp. 821-944, 1980.
- (31) JORDAN H.E. — Editorial statment. The coliform group of bacteria. *J. Am. Water Works Assoc.*, **29**: 1999-2000, 1937.
- (32) LECLERC H. — Etude biochimique d'Enterobacteriaceae pigmentées. *Ann. Inst. Pasteur*, **102** (6): 726-741, 1962.
- (33) LECLERC H. — Etude de bacilles à Gram négatif isolés des eaux présentant one activité β-galactosidase. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **14**: 49-110, 1963.
- (34) LECLERC H., BUTTIAUX R. — Les *Hafnia*. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**: 917-927, 1964.
- (35) LECLERC H., BUTTIAUX R. — Les *Citrobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **16**: 67-74, 1965.
- (36) LECLERC H., MORIAEZ J.C. — Etude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Path. Biol.*, **28** (4): 217-226, 1980.
- (37) LECLERC H., MOSSEL D.A.A., SAVAGE C. — Monitoring non-carbonated («still») mineral waters for aerobic colonization. *Int. Jour. Food. Microbiol.*, **2**: 341-347, 1985.
- (38) LEWIS C.J. — The coliform organisms of water-cress. *Birmingham Med. Rev.*, **81**: 1-10, 1917.
- (39) MACKENZIE E.F.N., TAYLOR E.N., GILBERT W.E. — Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli* type I. *J. Gen. Microbiol.*, **2**: 197-204, 1948.
- (40) MORITA R.J. — Psychrophilic bacteria. *Bact. Rev.*, **39**, 144-167, 1975.
- (41) MOSSEL D.A.A., SWARTH H. — The rapid tentative recognition of psychrotrophic type among Enterobacteriaceae isolated from foods. *J. Appl. Bact.* **23** (2): 185-188, 1960.
- (42) NIEMELA S.I., MENTU J., VAATANEN P., LAHTI K. — Maximum growth temperature as a diagnostic character in Enterobacteriaceae. *Coll. INSERM «Les bacilles à Gram négatif d'intérêt médical et en santé publique: taxonomie, identification, applications»*, **114**: 619-627, 1983.
- (43) OGER C., GAVINI F., DELATTRE J.M., LECLERC H. — A propos des coliformes et de la colimétrie des eaux d'alimentation. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **132 A**: 183-189, 1981.
- (44) OGER C., LECLERC H. — Essai de nouveau tests «haute température» pour la mise en évidence des coliformes fécaux ou

- des *E. coli* dans les eaux. *Microbia*, **3** (1): 47-55, 1977.
- (45) PARR L.W. — Coliform bacteria. *Bact. Rev.*, **3**: 1-37, 1939.
- (46) PETERSEN N.J. and HINES V.D. — The relation of summertime gastrointestinal illness to the sanitary quality of the water supplies in six Rocky Mountain Communities. *Am. J. Hyg.*, **71**: 314-320, 1960.
- (47) PUGSLEY A.P., EVISON L.M., HAMES A. — A simple technique for the differentiation of *E. coli* in water examination. *Water Res.* (Pergamon Press), **7**: 1431-1437, 1973.
- (48) REVIS C. — The stability of the physiological properties of coliform organisms. *Zentr. Bakt. Parasitenk*, II. **26**: 161-178, 1910.
- (49) ROBINSON A.L. — A convenient chart classification of lactose-fermenting *Bacillus coli* (MacConkey's tests) for use in bacteriological examinations of tropical and subtropical supplies. *J. Roy. Naval. Med. Service*, **14**: 104-117, 1928.
- (50) SCHMIDT-LORENZ W., BISCHOFBERGER T., CHA S.K., SCHMITT R. — The bacterial flora and the value of elevated temperature (42°C) count in detecting pollution in bottled natural non-carbonated mineral waters. 13th International Symposium of the International Union of Microbiological Societies, 5-9 Oct. 1987, Halkidiki/Greece.
- (51) SCHMIDT-LORENZ W., JAEGGI N. — Colony counts at 42°C for the evaluation of hygienic quality of bottled natural uncarbonated mineral water. *Microbiol. Aliments Nutrition*, Vol. 1, 377-391, 1983.
- (52) SEDLER R.J., KNITTEL N.D., BROWN C. — Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. *Appl. Microbiol.*, **29**: 819, 1975.
- (53) STANDARD METHODS OF MILK ANALYSIS — 6th Ed. *Am. Pub. Health Assoc. and Assoc. Official Agr. Chem.*, 1934.
- (54) STANDARD METHODS OF MILK ANALYSIS — 8th Ed. *Am. Pub. Health Assoc. and Am. Water Works Assoc.*, 1936.
- (55) STEWART M.J. — A study of the coliform organisms infecting the wounds of war. *J. Hyg.*, **16**: 291-316, 1918.
- (56) STOKES J.L. — General biology and nomenclature of psychrophilic bacteria. pp. 187-192, Gibbons (ed.). Recent progress in microbiology. Toronto, Univ. Of Toronto Press, 1963.
- (57) WALKER J., CARBONNELLE B., LECLERC H. — Auto-épuration microbienne par lagunage. *Wat. Research*, **11**: 17-29, 1977.
- (58) WALKER J., LECLERC H. — Traitement experimental d'épuration d'une eau de surface par lagunage: aspects chimiques et microbiologiques. *Wat. Research*, **7**: 707-728, 1973.
- (59) ZOPF W. — Die Spaltpilze, 3rd ed. *Edward Trewendt*, Breslau, pp. 1-127, 1885.