

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Formazione di biofilm
su materiali a contatto con acqua:
aspetti sanitari e tecnologici**

Lucia Bonadonna, Giuliana Memoli, Gianluca Chiaretti
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
08/19

Istituto Superiore di Sanità

Formazione di biofilm su materiali a contatto con acqua: aspetti sanitari e tecnologici.

Lucia Bonadonna, Giuliana Memoli, Gianluca Chiaretti

2008, 37 p. Rapporti ISTISAN 08/19

La formazione di biofilm negli impianti di distribuzione dell'acqua assume una rilevanza sanitaria particolare se si considera che il continuo rilascio, da parte del biofilm nell'acqua, di microrganismi, potenzialmente anche patogeni, può costituire una fonte di diffusione di contaminazione della rete idrica e un rischio per la salute dei consumatori. L'andamento della formazione di biofilm associati ad acqua è stato seguito attraverso una serie di indagini microbiologiche condotte, in condizioni controllate, su tubi costituiti da materiali che possono essere utilizzati per la distribuzione di acque potabili ai sensi del Decreto del Ministero della Salute n. 174. L'indagine ha evidenziato che, rispetto agli altri materiali selezionati, il biofilm formato su tubi di polietilene reticolato era in grado di sostenere concentrazioni più elevate di microrganismi. Questa caratteristica è stata anche osservata in biofilm sviluppato in condizioni di stagnazione dell'acqua rispetto a biofilm prodotti su superfici in condizioni dinamiche di flusso dell'acqua nei tubi.

Parole chiave: Acqua, ATP, Batteri, Biofilm, Patogeni, Polietilene reticolato

Istituto Superiore di Sanità

Biofilm formation on materials into contact with water: hygienic and technical aspects.

Lucia Bonadonna, Giuliana Memoli, Gianluca Chiaretti

2008, 37 p. Rapporti ISTISAN 08/19

Biofilm formation in man-made water systems has a hygienic concern when it is considered that the continuous detachment of this structure in the water flow, condition representing a potential source of contamination of plumbing and a risk for health, allows also pathogen microorganisms to reach consumers. The trend of biofilm formation was evaluated through series of microbiological analyses performed, under controlled conditions, on pipes made of materials that come into contact with drinking water according to the Decree of Ministry of Health n. 174. The investigation showed that, respect to the other materials, the reticulated polyethylene allows to sustain higher microorganisms concentrations. This characteristic was also observed in biofilms developed in condition of water stagnation compared to biofilm risen on surfaces of pipes under water flow.

Key words: ATP, Bacteria, Biofilm, Pathogens, Reticulated Polyethylene, Water

Per informazioni su questo documento scrivere a: lucia.bonadonna@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bonadonna L, Memoli G, Chiaretti G. *Formazione di biofilm su materiali a contatto con acqua: aspetti sanitari e tecnologici.*
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/19)

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2008

INDICE

Inquadramento generale	1
Acque destinate al consumo umano.....	1
Controlli di qualità delle acque.....	4
Il biofilm.....	8
Formazione di biofilm nell'acqua potabile.....	11
Resistenza dei biofilm ai disinfettanti.....	13
Bioluminescenza.....	14
Materiali utilizzati per la produzione di tubature per il trasporto di acque potabili.....	15
Obiettivi e metodologie	16
Materiali utilizzati nello studio.....	16
Polietilene reticolato (PE-Xb).....	16
Polipropilene (PP-R).....	17
Acciaio al carbonio zincato.....	18
Microrganismi utilizzati nello studio.....	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	19
Conteggio delle colonie.....	21
Fase 1: crescita microbica in ambiente statico.....	21
Conteggio delle colonie a 22 °C.....	22
Determinazione dell'ATP.....	22
Fase 2: isolamento di <i>Pseudomonas</i> e <i>Stenotrophomonas</i> in ambiente statico.....	22
Enumerazione di <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Enumerazione di <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	22
Fase 3: crescita microbica in condizioni dinamiche.....	23
Risultati	24
Fase 1: conteggio delle colonie a 22 °C in ambiente statico.....	24
Determinazione dell'ATP in ambiente statico.....	24
Fase 2: isolamento di <i>Pseudomonas</i> e <i>Stenotrophomonas</i> in ambiente statico.....	26
Fase 3: conteggio delle colonie a 22 °C in condizioni dinamiche.....	29
Determinazione dell'ATP in condizioni dinamiche.....	29
Bibliografia	35

INQUADRAMENTO GENERALE

Acque destinate al consumo umano

Il concetto di salubrità dell'acqua potabile risale al XIX secolo, ma è nel secolo scorso che sono stati stabiliti adeguati criteri per definirne la qualità.

L'acqua per il consumo umano deve possedere specifiche caratteristiche organolettiche e, soprattutto, il suo utilizzo non deve costituire un rischio per la salute; deve quindi essere priva di agenti patogeni e di sostanze chimiche pericolose. L'acqua potabile non serve solo per dissetarsi, ma è anche utilizzata per la preparazione di alimenti e bevande in ambito domestico e nelle industrie alimentari per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o sostanze destinate al consumo umano. Inoltre, è utilizzata per l'igiene personale, per il lavaggio di alimenti, per la pulizia degli indumenti, delle stoviglie e della casa. Viene anche impiegata per attività agricole, industriali ed usi civili, in settori di utilizzo a cui potrebbe essere destinata acqua con caratteristiche di qualità meno rigorose.

In questo modo, è stato calcolato che, a livello mondiale, il fabbisogno complessivo ripartito pro capite ammonta a circa 70-400 l/giorno, con ampie variabilità, funzione delle diverse aree geografiche.

In questi ultimi anni, da tutte le organizzazioni coinvolte in attività di gestione e controllo delle acque è stata richiamata l'attenzione al grave e pressante problema delle carenze idriche, legate all'ormai riconosciuto cambiamento climatico globale. Infatti, l'acqua viene ancora utilizzata senza tenere conto della sua crescente scarsità e sebbene, essa sia al momento attuale ancora adeguata alle necessità, circa un terzo della popolazione mondiale vive in Paesi segnati da periodiche deficienze idriche. Circa un miliardo e 400 milioni di persone risentono di condizioni di scarsità d'acqua e si calcola che nel 2020 la popolazione interessata dal fenomeno raggiungerà i 3 miliardi e 600 milioni. La domanda di acqua è triplicata dal 1950 ad oggi e le previsioni sono che essa raddoppi nei prossimi 50 anni. È stato quindi ipotizzato che, se non interverranno inversioni di tendenza nello sfruttamento delle risorse idriche, la domanda potrà superare la disponibilità prima del 2050 con il rischio conseguente di un abbassamento della qualità della vita e ritardi nello sviluppo economico e sociale a livello mondiale. In un ambito di risparmio idrico, già da alcuni decenni, soprattutto negli Stati Uniti, sono stati realizzati opere ed investimenti in attività di recupero e riutilizzo delle acque usate e, per tutti i settori, da quelli agricoli e industriali a quello civile, sono stati fissati requisiti di qualità dell'acqua per il riuso.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha lanciato da tempo l'allarme su scarsità e qualità dell'acqua potabile. Infatti, per la maggior parte delle popolazioni povere del mondo, una delle più gravi minacce è rappresentata dall'utilizzo di acqua non rispondente ai requisiti di potabilità. È stato stimato che più di un miliardo di persone, inclusi alcune decine di milioni di europei non hanno, in realtà, accesso ad acqua con idonee caratteristiche di qualità e ogni anno circa 5-10 milioni di individui muoiono per cause idrosanitarie dirette e 30 milioni per effetti direttamente riconducibili a carenze idriche.

Sulla base dei requisiti stabiliti dalle normative, nel mondo occidentale, è comunque riconosciuto che l'acqua distribuita attraverso una rete idrica, e in uscita dai rubinetti, sia adatta all'uso potabile.

Da uno studio svolto nel Regno Unito è emerso che il 70% dei consumatori è soddisfatto della qualità dell'acqua e che tre utenti su quattro bevono direttamente acqua di rubinetto (1). A questo proposito, tuttavia, è bene ricordare che l'Italia è il maggiore consumatore mondiale di acqua minerale, sebbene la qualità igienico-sanitaria dell'acqua potabile a disposizione sia

mediamente superiore a quella di molti Paesi europei. Diverse aziende di servizi idrici si stanno tuttavia, negli ultimi tempi, adoperando per incentivare, tra la popolazione, l'uso di acqua del rubinetto e, contemporaneamente, per la diffusione e l'applicazione di dispositivi per il risparmio idrico in ambito domestico e negli esercizi pubblici.

Oltre al rischio correlato alla presenza di inquinanti chimici, non solo di natura antropica, ma anche di origine geologica naturale o di sottoprodotti della disinfezione, il rischio più facilmente associabile all'uso di acqua contaminata è tradizionalmente messo in relazione alla presenza di microrganismi patogeni, anche di origine ambientale (2). Microrganismi opportunisti e patogeni per l'uomo e per gli animali possono, infatti, raggiungere le falde acquifere e più facilmente contaminare i corpi idrici superficiali utilizzati come acque da destinare al consumo umano, e ritrovarsi, occasionalmente, nelle acque in distribuzione.

Anche se le patologie più frequentemente associate al consumo di acqua contaminata sono a prevalente manifestazione gastroenterica, altre affezioni possono essere anche dovute ad inalazione e contatto con acqua contaminata. Le gastroenteriti idrodifuse sono evidenti per la natura stessa dei sintomi e per la caratteristica di avere un livello di diffusione elevato (50% degli esposti). Inoltre, se è pur vero che il rischio infettivo, correlato alla presenza nelle acque di microrganismi patogeni che producono malattie di natura enterica, è ancora molto elevato nei Paesi meno sviluppati, nei Paesi industrializzati, è stato registrato un declino delle patologie legate alla diffusione dei più tradizionali patogeni enterici (*Salmonella*, *Vibrio*). Questa riduzione è stata possibile, soprattutto, alla messa in opera di adeguati processi di trattamento e di disinfezione delle acque, alla definizione di requisiti di idoneità all'uso e alle attività di controllo della qualità dell'acqua. Se da una parte si assiste ad una diminuzione delle patologie a carattere gastroenterico, dall'altra, altre patologie associabili all'uso dell'acqua sono state segnalate negli ultimi decenni, alcune delle quali causate da agenti di zoonosi (criptosporidiosi, microsporidiosi, campilobacteriosi), altre, da opportunisti ambientali (micobatteriosi) anche a carattere respiratorio (legionellosi).

Tuttavia, tranne che negli USA e in alcuni Paesi europei, ancora poco applicati sono i sistemi di sorveglianza delle malattie di origine idrica, e quindi i dati epidemiologici riferibili all'area occidentale costituiscono una sottostima della reale diffusione di malattie idrotrasmesse.

A definire la materia inerente la qualità delle acque in Europa sono state presentate negli anni più recenti, e sono attualmente in vigore, due importanti ed innovative normative, la Direttiva 2000/60/CE e la Direttiva 98/83/CE. La prima istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, prefiggendosi una serie di obiettivi che hanno come priorità la prevenzione e la riduzione dell'inquinamento, la seconda è relativa specificamente alla qualità delle acque destinate al consumo umano.

Nel nostro Paese, il Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 (3), integrato dal DL. vo 2 febbraio 2002, n. 27 (4), atti di recepimento della Direttiva 98/83/CE (5), definisce i criteri tecnici e le procedure utili per il controllo della qualità delle acque destinate al consumo umano. Il DL. vo n. 31/01 ha introdotto alcuni aspetti di sostanziale innovazione nel quadro della protezione della salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque, fissando, secondo quanto stabilito dalla direttiva europea, come criterio base per il controllo, l'osservanza di un numero limitato di parametri essenziali e cautelativi (allegato I parte A e B) e di altri parametri, "indicatori" di variazioni anomale della qualità dell'acqua (allegato I, parte C).

Un'acqua per rispondere ai requisiti di potabilità, nella gran parte dei casi, prima della sua immissione nella rete idrica di distribuzione, viene sottoposta a trattamenti fisici e chimici per la rimozione di sostanze e composti chimici e agenti microbici.

Acque di falda o acque superficiali (da laghi, fiumi, bacini), potenzialmente contaminate per infiltrazione di inquinanti attraverso suoli contaminati, per immissione di acque di scarico non

adeguatamente depurate, di scarichi puntuali, di rifiuti animali, ecc. hanno la necessità di essere trattate adeguatamente per rispondere ai requisiti di potabilità. Processi di filtrazione e impiego di disinfettanti, generalmente quelli alogenati, rappresentano le diverse fasi di trattamento per rendere un'acqua idonea all'uso potabile. La disinfezione dell'acqua è la barriera finale sia per la sua potabilizzazione sia per il mantenimento delle sue caratteristiche igienico-sanitarie durante la distribuzione in rete.

Diversi tipi di disinfettanti e sistemi di disinfezione sono in uso nell'industria per il trattamento dell'acqua. Ogni disinfettante presenta vantaggi e svantaggi rendendo in tal modo nessun sistema ideale per tutte le circostanze. Tra le specie chimiche con proprietà disinfettanti/ossidanti impiegate in Italia negli impianti di potabilizzazione, in ordine di utilizzo decrescente figurano: l'ipoclorito di sodio (ca. 61%), il biossido di cloro (ca. 33%), l'ozono (ca. 3%), i raggi ultravioletti (ca. 3%), il cloro gassoso (ca. 2%) e l'ipoclorito di calcio (ca. 1%). Ancora oggi il disinfettante d'uso più comune è quindi il cloro che, a differenza di altri disinfettanti (es. l'ozono), si mantiene come cloro attivo libero nell'acqua, assicurando protezione contro la ricrescita batterica durante la distribuzione in rete e la possibile contaminazione dell'acqua dopo il trattamento di potabilizzazione.

L'azione del cloro sui microrganismi è riconducibile all'alterazione della permeabilità cellulare e al danno che produce a livello degli acidi nucleici e degli enzimi cellulari.

Molti batteri anche patogeni vengono inattivati completamente e rapidamente in presenza di cloro alla concentrazione normalmente impiegata per il trattamento dell'acqua potabile e il cloro attivo libero, nelle concentrazioni stabilite dalla legge (0,2 mg/L di acqua), contribuisce a mantenere condizioni sfavorevoli per la sopravvivenza dei microrganismi durante il passaggio dell'acqua nelle condutture.

Tuttavia, la risposta ai trattamenti di disinfezione è ampiamente diversa in funzione dei diversi gruppi microbici potenzialmente presenti nell'acqua (batteri eterotrofi, batteri indicatori, batteri patogeni, virus, parassiti, protozoi, funghi, alghe, macroinvertebrati) (Tabella 1).

Tabella 1. Azione disinfettante del cloro su alcuni patogeni a 5 °C e pH 6

Microrganismi	[Cl ₂] mg/L	Tempo di inattivazione (min)
<i>Escherichia coli</i>	0,1	0,4
Poliovirus	1,0	1,7
<i>Entamoeba histolytica</i>	5,0	18
<i>Giardia lamblia</i>	1,0	50
<i>Cryptosporidium parvum</i>	80,0	90

(Modificata da Hoff e Akin, 1986)

Mentre alcuni virus e cisti/oocisti di protozoi, quali *Giardia* e *Cryptosporidium*, sopravvivono sostanzialmente più a lungo, batteri come *Escherichia coli*, enterococchi e salmonelle hanno tempi di mantenimento molto più brevi nelle acque disinfettate e ridotta capacità di sopravvivenza.

Nelle acque utilizzate a scopo potabile la flora microbica costituisce comunque una presenza costante. Infatti, se è pur vero che l'acqua potabilizzata è microbiologicamente diversa da quella grezza, essa tuttavia può ancora trasportare, non solo, anche se sporadicamente, microrganismi derivati da contaminazioni esterne o che sono stati in grado di sopravvivere ai processi di trattamento delle acque, ma anche microrganismi che fanno parte della normale flora ambientale naturale, presenti quindi in assenza di qualsiasi tipo di contaminazione.

Sembra che i processi di trattamento delle acque possano anche determinare una pressione selettiva sui microrganismi presenti che possono sviluppare un'ampia gamma di strategie di

sopravvivenza. La più diffusa e conosciuta è quella in base alla quale i microrganismi sopravvivono, rimanendo danneggiati (*injured*), in uno stato quiescente che non ne consente la crescita, e quindi il rilevamento, durante l'esame analitico. È la cosiddetta fase VNC (*viable non culturable*), durante la quale i microrganismi manifestano il danno subito con l'incapacità di crescere sui terreni selettivi determinando risultati "falsi negativi" all'analisi microbiologica. Tuttavia, durante il percorso nella rete di distribuzione e fino al rubinetto, possono venirsi a trovare in condizioni fisiche e spaziali favorevoli, come fondi di rete, tubercoli, superfici dove il flusso dell'acqua è più lento, particolato, rompiflusso, valvole, ecc. Grazie all'attività del substrato su cui si trovano ad aderire che, oltre a limitare l'esposizione ai disinfettanti, può anche concentrare nutrienti per la loro sopravvivenza, possono subire un processo di rivitalizzazione che li rende nuovamente attivi ed in grado di moltiplicarsi. Risultano così nuovamente rilevabili in condizioni standard di laboratorio creando sì una "apparente" condizione di contaminazione dell'acqua in entrata nella rete idrica, ma anche una reale situazione di presenza di microrganismi nelle tubature.

Rilascio di prodotti metabolici microbici, di metalli per fenomeni di corrosione, condizioni che sostengono la crescita/ricrescita batterica nelle reti di distribuzione possono avere quindi conseguenze sulla qualità igienico-sanitaria dell'acqua. Inoltre, la presenza di microrganismi coinvolti in attività di *biofouling* possono influenzare lo sviluppo di processi di biocorrosione e/o provocare un deterioramento delle qualità organolettiche dell'acqua per la produzione di colorazioni anomale e di odori e sapori sgradevoli.

Controlli di qualità delle acque

Quasi 150 anni fa, quando nei Paesi occidentali erano ancora comuni tifo e colera, fu ottenuta la dimostrazione che l'acqua poteva rappresentare un vettore di microrganismi patogeni e fu coniato il termine di "malattie idrodifuse" (6). Tuttavia, nei Paesi industrializzati il moderno concetto di protezione delle risorse idriche, lo sviluppo di tecniche di potabilizzazione sempre più efficaci e i criteri di controllo della qualità delle acque hanno portato alla eradicazione virtuale delle patologie idrodifuse, determinando una progressiva riduzione di quelle causate dai cosiddetti patogeni classici.

Rilevanza sostanziale per la tutela della salute della popolazione assume quindi la disponibilità di acqua con requisiti di idoneità all'uso potabile.

Le caratteristiche stabilite da normative e linee guida per la formulazione del giudizio igienico-sanitario o di qualità delle acque sono basate su un monitoraggio integrato che richiede la determinazione di parametri chimici e microbiologici. Due sono le necessità principali per poter definire la qualità di un'acqua: i) valutare che l'acqua sia esente da sostanze o microrganismi pericolosi, e quindi verificare che il sistema di produzione abbia operato correttamente; ii) verificare che l'acqua sia salubre durante la sua distribuzione nella rete fino al rubinetto.

Per quanto riguarda le caratteristiche microbiologiche, il monitoraggio si basa su esami analitici che prevedono essenzialmente la possibilità di coltivare su idonei substrati, ed in specifiche condizioni di temperatura di incubazione, i microrganismi contenuti in un campione di acqua, utilizzando particolari metodologie finalizzate alla individuazione differenziale di gruppi microbici o di specie che si ritengono significative per stimarne la qualità.

La fase sostanziale dell'esame microbiologico non si fonda tuttavia sulla ricerca diretta dei microrganismi responsabili di malattie, bensì ancora su quella di parametri batterici che costituiscono i cosiddetti indicatori di contaminazione fecale. Infatti, il sistema di monitoraggio della qualità dell'acqua si basa sulla quantificazione degli indicatori di contaminazione fecale

nelle acque, controllo da sempre utilizzato in alternativa a quello diretto dei patogeni. Infatti, quest'ultimo è ancora attualmente irrealizzabile per la impossibilità di individuare, su base routinaria, la presenza/concentrazione di tutti i patogeni potenzialmente presenti nelle acque. In aggiunta, se la ricerca fosse limitata ad un certo numero di patogeni selezionati, la loro assenza non escluderebbe comunque la presenza di altri.

Il principale limite di queste determinazioni risiede nella scarsa disponibilità di metodi che, di routine, permettano di rilevare basse concentrazioni di organismi in grandi volumi di acqua. Anche lunghezza dei tempi di risposta delle analisi e costi per le indagini che richiedono lo svolgimento di prove di conferma biochimiche, sierologiche, di identificazione o anche molecolari rappresentano un vincolo al rilevamento diretto dei patogeni. Oltretutto, i metodi standardizzati a disposizione non sono in grado di determinare, per ogni singolo patogeno, il grado di virulenza. Un aiuto in questo senso potrebbe derivare dall'uso di metodi molecolari che, tuttavia, al momento, non sono standardizzati e normalizzati.

Quindi il monitoraggio della qualità igienica delle acque si fonda tradizionalmente sulla misura degli indicatori, che non sono di per sé causa di infezioni o malattie, ma sono organismi che dovrebbero "predire" il rischio potenziale legato alla presenza di patogeni.

Per potere assolvere al ruolo di indicatore di contaminazione, è necessario che i gruppi di organismi o le specie selezionati rispondano contemporaneamente a determinati requisiti, primo fra tutti quello di presentare una correlazione dotata di significato statistico con agenti eziologici specifici di malattie. Inoltre, un indicatore deve i) essere presente in alte concentrazioni nelle feci dell'uomo e degli animali a sangue caldo; ii) essere presente esclusivamente là dove è presente il patogeno; iii) avere capacità di rispondere in ugual misura, rispetto ai patogeni, alle condizioni ambientali e agli eventuali trattamenti di disinfezione e di sopravvivere almeno tanto a lungo quanto i patogeni; iv) non essere in grado di moltiplicarsi nell'ambiente; v) essere facilmente rilevabile con metodologie pratiche, ripetibili, economiche e specificatamente selettive.

Tuttavia gli indicatori forniscono soltanto una misura teorica del rischio per la salute umana perché la relazione tra le loro concentrazioni e quelle dei patogeni non è mai costante e comunque i dati desunti dalla ricerca di questi ultimi, le cui concentrazioni nelle acque non sono predittive e sono legate a numerosi fattori, condurrebbero a conclusioni in merito meno attendibili.

Il concetto di indicatore risale al secolo scorso, quando, nel 1854, John Snow, durante uno studio epidemiologico, propose, nell'ambito dei microrganismi presenti in acque contaminate, di selezionare gruppi di batteri che potessero fungere da indicatori di contaminazione e che fossero in relazione alla presenza di microrganismi capaci di indurre patologie. Da oltre un secolo, quindi, vengono utilizzati, come indicatori, gruppi batterici che, vivendo nel tratto gastrointestinale degli animali a sangue caldo e dell'uomo, entrano a far parte del ciclo a trasmissione fecale-orale.

Gli indicatori di contaminazione fecale da ricercare per la definizione della qualità delle acque, per decenni, sono stati rappresentati dai gruppi dei coliformi totali e fecali e degli streptococchi fecali.

Negli ultimi venti anni, tuttavia, è emerso che la presenza dei coliformi nelle acque può essere il risultato di processi naturali legati alla loro diffusione nell'ambiente indipendentemente da qualsiasi condizione di contaminazione. Inoltre, i più recenti metodi analitici concepiti per il loro rilevamento hanno permesso di modificarne lo schema tassonomico, ampliando la definizione funzionale del gruppo e introducendo anche tipiche specie ambientali. All'interno del raggruppamento dei coliformi, la specie *Escherichia coli* sembra, invece, possa rappresentare un indice di contaminazione fecale più significativo e accurato. Infatti, è una specie tassonomicamente definita, ospite del tratto intestinale degli animali a sangue caldo e

dell'uomo e può, per questa caratteristica, costituire un indicatore fecale dotato di maggiore specificità, anche se è ormai evidente che i suoi maggiori limiti risiedono nella non idoneità nel segnalare la presenza di virus e protozoi.

Inoltre, gli studi più recenti hanno individuato negli enterococchi, i microrganismi di più specifica origine intestinale rispetto agli streptococchi fecali. Gli enterococchi hanno quindi sostituito questi ultimi come indicatori batterici che meglio sembrano correlati con la manifestazione di patologie acquisite attraverso l'acqua.

Accanto ad essi, come raccomandato dalle linee guida dell'OMS e stabilito dalle nuove direttive comunitarie, viene quindi indicato *Escherichia coli*, come parametro indicatore di contaminazione fecale, e i coliformi, quali indicatori di generica qualità microbiologica delle acque.

Di seguito vengono delineate brevemente alcune caratteristiche morfologiche, biochimiche e di funzione dei diversi gruppi di indicatori.

I coliformi sono microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Sono batteri gram negativi, bastoncellari, con dimensioni che variano da 0,5 a 2 µm di larghezza per 2-4 µm di lunghezza, mobili per la presenza di flagelli peritrichi o immobili, capsulati e non, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni, capaci di fermentare il lattosio con produzione di gas ed acido in 48 ore alla temperatura di 36 °C (coliformi totali) e 44 °C (coliformi fecali). Non possiedono citocromo c, quindi sono negativi al test della citocromoossidasi, sono catalasi positivi e riducono i nitrati; una percentuale prossima al 100% possiede l'enzima β-D-galattosidasi. In anaerobiosi sono in grado di utilizzare il glucosio per via fermentativa (fermentazione acido-mista e/o bitilen-glicolica). Crescono bene nei comuni terreni di coltura. Come tutti i gram negativi possiedono, nella parete cellulare, complessi lipo-polisaccaridici, che costituiscono le endotossine che esercitano vari effetti fisiologici.

I coliformi sono presenti nel materiale fecale di origine umana ed animale ad una concentrazione variabile tra 10⁷ e 10⁹ UFC/g. Tuttavia, poiché sono in grado di colonizzare acque, suoli e vegetazione, la loro ampia diffusione nell'ambiente ha condotto al ridimensionamento del loro ruolo nelle acque che contrasta, alla luce delle conoscenze più recenti, con i requisiti specifici richiesti ad un indicatore di contaminazione fecale. Pertanto, il gruppo non rappresenta più una fonte attendibile di informazioni sulla contaminazione delle acque e la loro presenza non riveste un particolare significato se non quello di indicatore aspecifico o di efficienza dei processi di trattamento che l'acqua subisce (7).

Nel gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ampiamente rappresentato ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, a differenza di batteri coliformi di origine non necessariamente fecale, appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* e alle tante specie di coliformi psicrotrofi che si caratterizzano per uno spiccato potenziale di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente.

Da oltre un decennio la specie *E. coli* è stata riconosciuta come indicatore primario di contaminazione fecale delle acque. Diversi studi internazionali hanno inoltre contribuito a sostenere la necessità di inserire, per la valutazione della qualità delle acque, il parametro *Escherichia coli* nelle linee guida dell'OMS e, come conseguenza, anche nelle più recenti direttive europee. La scelta, motivata dalla netta predominanza di *E. coli* rispetto agli altri coliformi nel materiale fecale e dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei batteri patogeni enterici, è stata ormai accreditata da tutta la comunità scientifica internazionale. Tuttavia, i metodi colturali più classici utilizzati per il suo rilevamento, inadeguati per laboriosità e lunghezza d'esecuzione, poiché non formulati per la sua selezione differenziale, ma per il rilevamento dell'intero gruppo dei coliformi, comportano lunghi tempi per l'acquisizione delle risposte alle analisi che devono, comunque, essere confermate con prove biochimiche aggiuntive. Oltre a ciò, come per i coliformi, è stata

confermata l'ipotesi che parte dei biotipi di *E. coli* presenti nelle acque non sono in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura. Inoltre, alcuni *E. coli* non sono né termotolleranti, né producono indolo in terreni contenenti triptofano. Diversamente, un'alta percentuale di *E. coli* possiede l'enzima β -D-glucuronidasi che ne permette un isolamento selettivo e specifico nei terreni colturali di più recente formulazione (metodi rapidi).

Sebbene i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* siano spesso considerati sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo di microrganismi che venivano compresi sotto l'unica definizione di streptococchi fecali, negli ultimi anni, è stato soggetto ad ampia revisione. Gli studi più recenti hanno distinto, infatti, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, tre generi diversi di cui due – *Enterococcus* e *Streptococcus* – comprenderebbero specie intestinali o di sicura origine fecale che costituiscono gruppi eterogenei caratterizzati dalla distinzione in diverse specie. Sono quindi presenti nelle feci umane ed animali a concentrazioni tra 10^5 ÷ 10^6 UFC/g di feci. La loro proporzione è diversa nelle feci delle diverse specie animali e comunque sempre prevalente rispetto alla loro concentrazione nelle feci umane. Tuttavia, se queste differenze avevano precedentemente consentito di avanzare l'ipotesi di ottenere indicazioni sulla origine fecale dell'inquinamento, anche sulla base del rapporto tra i due indicatori, coliformi e streptococchi, è stato accertato e riconosciuto che la valutazione del rapporto tra gli indicatori può portare a conclusioni ed interpretazioni errate. Infatti, è stato calcolato che, a causa della diversa capacità di sopravvivenza nelle acque da parte dei microrganismi considerati e della maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte del gruppo degli enterococchi/streptococchi, la proporzione numerica tra i due gruppi di indicatori è comunque alterata.

Questi microrganismi raramente si moltiplicano nell'ambiente e sono batteri più resistenti alle condizioni ambientali ostili rispetto a *E. coli*; infatti, rispetto agli altri indicatori sono generalmente caratterizzati da una maggiore persistenza nelle acque, con l'eccezione di *E. bovis* e *E. equinus*.

Sono cocchi gram positivi, citocromoossidasi negativi, con la tendenza a disporsi a catena in terreni liquidi; aerobi ed anaerobi facoltativi in quanto capaci di un metabolismo energetico di tipo fermentativo. Presentano una forma sferica o ellittica, con cellule del diametro di 1-1,5 μ m. Sono capsulati, immobili, asporigeni. Possono crescere sui comuni terreni di coltura, ma crescono meglio sui terreni arricchiti con sangue, siero, liquido ascetico e glucosio. La temperatura di crescita ottimale corrisponde a 36 °÷38 °C.

Il genere *Enterococcus* comprende 17 specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie in grado di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro a formazano e di idrolizzare il 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside e l'esculina.

Il loro ruolo come indicatori nelle acque è piuttosto contrastato e non univoco. In alcuni casi, vengono indicati come microrganismi più resistenti dei coliformi alle condizioni ambientali più sfavorevoli. In condizioni di salinità e nel caso di acque sottoposte a trattamento di disinfezione con cloro, dimostrerebbero una resistenza almeno pari a quella degli enterovirus, per cui la loro presenza potrebbe essere un possibile indice di presenza di agenti virali. Secondo altre interpretazioni, essi costituiscono microrganismi labili nell'ambiente e quindi non costantemente rilevati nei corpi idrici contaminati. Tuttavia la loro presenza, in concomitanza con *E. coli*, potrebbe rafforzare il giudizio sulla contaminazione fecale di un'acqua.

Il biofilm

Nelle acque utilizzate a scopo potabile la flora microbica costituisce una presenza costante. Infatti, anche dopo trattamento, microrganismi che fanno parte della normale flora ambientale naturale, presenti indipendentemente da qualsiasi tipo di contaminazione, possono essere introdotti nelle reti di distribuzione e andare a far parte del biofilm. Il biofilm consente ai microrganismi presenti in rete di sopravvivere e, in condizioni favorevoli, di moltiplicarsi. Ricco di nutrienti e con effetto protettivo sui microrganismi nei confronti dei disinfettanti utilizzati durante la potabilizzazione, è anche un sito potenziale per il trasferimento dei caratteri di virulenza e resistenza agli antibiotici (8).

Nel 1684, Antonie Van Leeuwenhoek, per primo, osservò i microrganismi sulla superficie dei denti e tale fenomeno venne indicato con il termine di biofilm. Successivamente fu riscontrato che il numero dei batteri su superfici a contatto con acqua poteva essere drammaticamente più alto rispetto al mezzo circostante e che sui filtri percolatori in impianti di trattamento di acque reflue esiste un'ampia varietà di microrganismi adesi sui ciottoli e sulla ghiaia.

Sulla base delle osservazioni sulla placca dentale e sulle comunità sessili nei corsi d'acqua, vennero quindi ipotizzati i meccanismi che favoriscono l'adesione dei microrganismi a materiali viventi e abiotici e i benefici derivati dalla creazione di questa nicchia ecologica.

Da quel momento, gli studi sul biofilm negli ambienti industriali ed naturali e in quelli di maggiore rilevanza per la salute pubblica sono stati fondamentalmente paragonabili. Per caratterizzare il biofilm, la maggior parte delle ricerche svolte negli ultimi due decenni si è basata sull'osservazione al microscopio a scansione elettronica e su tecniche microbiologiche standard. Nell'ultimo decennio, i due maggiori elementi che hanno inciso sulla comprensione del fenomeno sono stati l'utilizzazione del microscopio confocale a scansione laser per definirne la struttura e l'indagine dei geni coinvolti nell'adesione cellulare e nella sua formazione (9).

Il termine biofilm è un'espressione comunemente usata per descrivere la patina di microrganismi che si forma su superfici di varia natura immerse in un fluido (acqua, aria). La struttura di questa pellicola è alquanto complessa. Tutti i microrganismi possono contribuire alla formazione di biofilm e più del 99% dei microrganismi presenti sulla terra vive in stato di aggregazione. Nella sua struttura, dove organismi sono intrappolati in una matrice di varia natura, prevalgono sostanze polimeriche extracellulari (ESP) che possono costituire il 50-90% del carbonio totale presente nei biofilm e possono essere considerati la loro matrice primaria. Pur variando nelle proprietà chimiche e fisiche, gli EPS sono principalmente composti da polisaccaridi e proteine, che formano matrici altamente idratate. Sembra comunque che il DNA extracellulare giochi un importante ruolo nella costituzione della struttura del biofilm (10). In alcuni biofilm sono state osservate anche cellule morte, suggerendo che i residui cellulari possono essere considerati parte della matrice extracellulare (11).

L'organizzazione dei microrganismi nei biofilm offre importanti vantaggi. I microrganismi possono mantenere un'organizzazione stabile di sinergica collaborazione tra specie differenti e, di conseguenza, orchestrare la degradazione di substrati complessi (12). All'interno della struttura si stabiliscono microambienti caratterizzati da gradienti fisici e chimici in cui un ruolo fondamentale viene svolto dagli EPS. La matrice può sequestrare nutrienti dall'ambiente ed è quindi parte di una strategia generale per la sopravvivenza in condizioni oligotrofiche (13).

Il biofilm si trova un po' ovunque in natura; è la placca dentale, lo strato melmoso sulla roccia bagnata da un ruscello, la pellicola che si forma sotto gli scafi delle barche ormeggiate, la mucillagine che compare in un vaso da fiori, lo strato di batteri demolitori della cellulosa che si formano sui foraggi dopo che vacche o altri ruminanti lo hanno ingerito. Inoltre, in attività industriali, la capacità di formare biofilm da parte di ceppi microbici selezionati viene sfruttata

per la produzione di enzimi e di diversi metaboliti e per depurare le acque reflue. È anche noto, tuttavia, che biofilm si formano nei cateteri urinari e/o in diversi corpi estranei usati nella pratica medica, e rappresentano una condizione di rischio e uno tra i più probabili fattori di virulenza. Anche le lenti a contatto sono fra le superfici che possono essere colonizzate da biofilm.

I biofilm microbici si formano anche sulle superfici a contatto con acqua di tutti gli elementi che compongono le opere acquedottistiche, dalle condotte, ai serbatoi e al sistema di tubazioni nel quale sono inseriti i dispositivi di erogazione alle utenze di servizio e private. Concentrazioni di carbonio organico disponibile favoriscono il loro sviluppo che, per lo più, si manifesta in corrispondenza di tratti della rete dove è ridotta la velocità di flusso dell'acqua (diramazioni, curve, raccordi, valvole) o dove si stabiliscono condizioni di potenziale ristagno (bracci morti, tubi delle utenze private, rubinetti, soffioni, guarnizioni, raccordi e rompigetto, apparecchi per il trattamento domestico dell'acqua). In condizioni di dinamicità del sistema, i biofilm si distaccano dal substrato e, trasportati dall'acqua, giungono ai rubinetti.

Nella struttura del biofilm microrganismi si organizzano in aggregati caratterizzati da microcolonie. Generalmente, le cellule batteriche costituiscono meno di un terzo del materiale delle microcolonie, il resto è rappresentato dagli ESP. Il biofilm è costituito da numerosissimi raggruppamenti di questo tipo, separati da una rete di canali acquosi aperti. Il liquido che percorre questi minuscoli condotti raggiunge ciascun raggruppamento microbico, fornendo sostanze nutritive disciolte e rimuovendo i prodotti di scarto. Le cellule situate all'esterno di una microcolonia sono servite da questo sistema idraulico, anche se quelle più all'interno sono in gran parte tagliate fuori. I densi aggregati cellulari che le circondano e la matrice organica che cementa la struttura fungono da barriera al flusso dell'acqua. Pertanto, le cellule nella zona distale alla superficie sono raggiunte da sostanze nutritive che riescono a pervenire per diffusione fino a esse. Tuttavia, una sostanza potrà difficilmente diffondere fino a raggiungere il centro di una microcolonia se reagisce con le cellule o il materiale della matrice che incontra sul proprio cammino. Questa reattività dà origine a cambiamenti e gradienti ambientali nell'ambito del biofilm. È stato, ad esempio, osservato che la concentrazione di ossigeno varia in modo drastico in punti distanti appena 50 μm . Per esempio, in un biofilm composto solamente da *Pseudomonas aeruginosa* l'attività cellulare e la crescita può avvenire solo nei punti in cui può arrivare l'ossigeno, cioè nella fascia più esterna di ciascuna microcolonia larga 20-30 μm . Più in profondità le cellule sono vive ma quiescenti. La varietà di gradienti chimici che si generano in un biofilm implica che una cellula possa avere aspetto e attività molto differenti da quelli della vicina, anche quando le due cellule sono geneticamente identiche (14).

L'accumulo di materiale biotico su una superficie si instaura attraverso una successione di quattro fasi (15):

- trasporto di molecole organiche e cellule sulla superficie;
- adesione di molecole organiche per creare una superficie "condizionata";
- adesione microbica alla superficie condizionata;
- sviluppo di colonie mature con la produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS).

Di queste quattro fasi solo l'ultima è di rilevanza pratica. Quando le colonie mature si sono formate la loro attività metabolica può determinare modificazioni all'interfaccia superficie/soluzione, inducendo cambiamenti riguardanti il tipo e la concentrazione degli ioni, il pH, i livelli di ossigeno, la velocità di flusso e la capacità tamponante del microambiente liquido.

Le ricerche fino ad oggi condotte hanno rilevato, fra l'altro, che i batteri adesi a una superficie sintetizzano centinaia di proteine che non si ritrovano nelle cellule libere. Alcune di queste proteine, dette "autoinduttori", sono coinvolte in una serie di scambi che le cellule eseguono subito dopo la loro adesione, ma prima che le loro posizioni si fissino. In realtà, gli autoinduttori, in funzione della densità cellulare e del raggiungimento di un valore soglia

(*quorum*), interagiscono con i recettori situati sulla superficie cellulare, controllando l'espressione genica della cellula e quindi la replicazione.

Staphylococcus epidermidis possiede geni che regolano la fase successiva dello sviluppo di un biofilm: la sintesi della matrice extracellulare. Una volta inattivati questi geni, il batterio perde la capacità di formare biofilm in provetta e, a quanto pare, anche nei tessuti di animali di laboratorio.

Analoghi centri di controllo genici sono rilevabili anche in *P. aeruginosa* che possiede diversi geni che vengono attivati entro 15 minuti dall'adesione a una superficie. Uno di questi geni, l'*algC*, che codifica l'enzima fosfomannutasi, è indispensabile per la sintesi dell'alginato, il polimero gelatinoso che compone gran parte della matrice extracellulare. In *P. aeruginosa*, le relative molecole-segnaletto sono lattoni acilati dell'omoserina che ciascuna cellula produce a basso livello. Con un certo numero di cellule, la concentrazione di questi composti aumenta, e ciò induce cambiamenti nell'attività di decine di geni.

Questo meccanismo, il *quorum sensing*, è fondamentale per lo sviluppo dei biofilm. In effetti, i ceppi di laboratorio di *P. aeruginosa* che sono privi del gene per un particolare lattone acilato dell'omoserina non riescono a formare biofilm normali, e invece si accumulano in un mucchio disorganizzato (16). In *Vibrio cholerae* la relazione tra *quorum sensing* e architettura del biofilm è stata meglio compresa. Il principale polisaccaride extracellulare espresso nei biofilm formati da questi batteri viene denominato VPS (essendo i geni *vps* responsabile della sua produzione) (17). La produzione di VPS è regolata negativamente da HapR; i mutanti HapR producono colonie rugose e formano biofilm spessi con ristretti canali di acqua. Il gene HapR codifica un fattore di trascrizione conosciuto, perché inibisce l'espressione di AphA (un regolatore negativo della virulenza) e promuove l'espressione di HapA (il gene strutturale per Hap, una metalloproteina). Inoltre, la stessa espressione di HapR è indirettamente repressa da LuxO, un regolatore che risulta più attivo in condizioni di bassa densità cellulare. L'attività di LuxO è controllata da altri due segnali di *quorum sensing* minori, ma solo il lattone CAI-1 acilomoserina gioca un ruolo significativo nella formazione del biofilm. Queste osservazioni suggeriscono che, in condizioni di bassa densità cellulare, i livelli di CAI-1 sono abbastanza bassi da permettere al mediatore LuxO la repressione di HapR, con conseguente produzione di VPS. Quindi, questo particolare batterio sembra iniziare la produzione della matrice extracellulare in condizioni di bassa densità cellulare, presumibilmente prima della formazione di una comunità multicellulare (18).

Un'immagine chiara dell'adesione dei microrganismi alla superficie non può essere ottenuta senza considerare gli effetti del substrato, l'idrodinamica del mezzo acquoso, le caratteristiche del mezzo e varie proprietà della superficie cellulare. Generalmente, infatti, nel processo di adesione, le caratteristiche della superficie solida hanno importanza primaria. Una superficie esposta ad un mezzo acquoso inevitabilmente e quasi immediatamente viene rivestita da polimeri e macromolecole, e la risultante modificazione chimica ha effetto su quantità ed estensione dell'aggregato microbico. È stato inoltre osservato che l'estensione della colonizzazione microbica aumenta proporzionalmente con la rugosità della superficie. Tuttavia, i microrganismi si attaccano anche più rapidamente a superfici idrofobiche e non polari, come il teflon ed altre materie plastiche, piuttosto che a materiali idrofilici come il vetro o i metalli (19).

Alcune caratteristiche del mezzo acquoso, come il pH, i livelli di nutrienti, la forza ionica e la temperatura possono giocare un importante ruolo nella velocità di adesione microbica ad un substrato. Sembra anche evidente che fattori stagionali possano favorire l'adesione batterica e la formazione del biofilm nei sistemi acquatici. Questo effetto può essere causato dalla temperatura dell'acqua o da altri parametri anche influenzati dai cambiamenti stagionali. L'aumento della concentrazione di alcuni cationi (sodio, calcio, lantanio, ferro trivalente) sembrano potere influenzare l'adesione di *Pseudomonas fluorescens* su superfici di vetro,

probabilmente per la riduzione delle forze repulsive tra le cellule batteriche cariche negativamente e la superficie stessa (20).

Anche l'idrofobicità della superficie cellulare, la presenza di fimbrie e flagelli e la produzione di EPS influenzano la quantità e l'estensione dell'aggregato microbico. L'idrofobicità della superficie cellulare è importante nei meccanismi di adesione poiché le interazioni idrofobiche tendono ad aumentare quando aumenta la natura non polare di una o entrambe le superfici coinvolte (cioè la superficie cellulare e la superficie del substrato). Le fimbrie, contribuiscono all'idrofobicità della superficie cellulare. La maggior parte delle fimbrie contiene un'elevata percentuale di residui amminoacidici idrofobici e queste strutture giocano un ruolo importante, probabilmente, nel vincere la barriera repulsiva che esiste tra la cellula e il substrato.

Dopo trattamento con enzimi proteolitici, cellule adese alle superfici si distaccano dimostrando il coinvolgimento delle proteine nell'adesione (21). Organismi contenenti acido micolico (*Corynebacterium*, *Nocardia* e *Mycobacterium*) si sono dimostrati più idrofobici dei batteri contenenti acido non-micolico, e l'aumento della lunghezza della catena dell'acido micolico generalmente sembra coincidere con l'aumento dell'idrofobicità. Anche il componente dell'antigene O dei lipopolisaccaridi (LPS) conferisce proprietà di idrofilia a batteri Gram negativi. Ad esempio, ceppi mutanti di *Pseudomonas fluorescens* privi dell'antigene O aderiscono in numero maggiore ai materiali idrofobici e ceppi motili dello stesso batterio si attaccano in numero maggiore e più rapidamente di ceppi non mobili.

Alla luce di questi risultati si può concludere, che polimeri presenti sulla superficie cellulare con siti non polari quali fimbrie, altre proteine e acido micolico prevalgono nel processo di adesione ai substrati idrofobici; mentre EPS e lipopolisaccaridi sono più importanti nell'adesione a materiali idrofilici. Anche i flagelli sono importanti nel processo di adesione, sebbene il loro ruolo sembra possa essere quello di vincere le forze repulsive piuttosto che agire da adsorbenti o adesivi.

Formazione di biofilm nell'acqua potabile

La natura estremamente diversa e dinamica della popolazione microbica presente nei sistemi di distribuzione delle acque destinate al consumo umano contribuisce alla formazione di biofilm. I biofilm delle reti acquedottistiche possono ospitare un'ampia varietà di organismi e sono caratterizzati da un *turn-over* di gruppi microbici. Un distacco di cellule microbiche e l'adesione di altre sarebbe osservabile in continuo. L'ordine delle successioni dipende da diversi fattori, primo tra tutti il ciclo vitale cellulare che comporta che i microrganismi si distacchino attivamente dalle superfici, alternando quindi stadi microbici adesi e stadi planctonici *free-living*. Inoltre, hanno influenza tipologia e disponibilità di nutrienti, fattori fisici e fattori biologici, quali competizione, predazione, parassitismo, fagocitosi.

Le specie che vanno a costituire i biofilm nei sistemi di distribuzione delle acque potabili sono piuttosto ricorrenti anche se le loro concentrazioni possono ampiamente variare. Tra i primi colonizzatori delle reti sono segnalati microrganismi che fanno parte della flora microbica naturale delle acque, principalmente batteri pigmentati, a cui fanno seguito specie appartenenti ai generi *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, attinomiceti e lieviti. Anche alcuni coliformi, come *Klebsiella pneumoniae*, sono più spesso riscontrabili rispetto ad altre specie dello stesso gruppo, molto probabilmente perché hanno un maggior successo competitivo.

Se rare sono le evidenze associate alla presenza di microrganismi patogeni *free-living* nelle acque potabili in distribuzione, soprattutto in Italia, diversi patogeni e potenziali patogeni sono invece stati isolati dai biofilm (*Legionella*, *Aeromonas*, protozoi, micobatteri). Controversa è

invece l'opinione degli studiosi sulla presenza di virus, anche se la recente segnalazione di un mimivirus all'interno di amebe apre nuovi spazi allo studio di questi fenomeni.

Anche se patogeni alloctoni partecipano alla formazione della struttura del biofilm, hanno comunque difficoltà a mantenersi vitali a causa delle loro specifiche necessità di crescita e della loro incapacità di competere con gli organismi autoctoni.

È stato dimostrato che nel biofilm esiste una vera e propria competizione tra gli organismi presenti. Anche se *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* possono coesistere in una comunità stabile, quest'ultimo cresce più lentamente rispetto a quando si trova in un biofilm contenente esclusivamente batteri della stessa specie. In questo caso, *P. aeruginosa* cresce formando la base del biofilm, mentre *K. pneumoniae* forma microcolonie localizzate (coprendo circa il 10% dell'area) che possono avere un maggiore accesso ai nutrienti e all'ossigeno.

Oltre il 50% dei batteri trasportati dall'acqua si presenta sotto forma di aggregati di dimensioni maggiori di 5 µm o attaccati a particelle abiotiche di circa 5 µm di diametro che, in contatto con l'acqua, sono colonizzate dai microrganismi presenti.

Sebbene i biofilm presenti nel sistema di distribuzione delle acque potabili siano comunque irregolari, un biofilm maturo può essere spesso circa 200 µm e può causare una diminuzione dei livelli di ossigeno, creando condizioni di anossia al di sotto dello strato superficiale. Tali condizioni possono portare allo sviluppo di batteri solfato-riduttori, la cui attività può corrodere e forare le pareti interne delle condotte.

Altri effetti risultanti dalla formazione di biofilm nei sistemi di distribuzione delle acque potabili possono provocare un aumento delle cariche microbiche rilevate durante le analisi, presenza di patogeni opportunisti nell'acqua in rete, aumento della richiesta di cloro, colorazione delle acque, conseguenze sulle proprietà organolettiche dell'acqua, presenza di invertebrati e corrosione.

Il controllo della formazione di biofilm diviene quindi uno dei maggiori obiettivi per ottenere un'acqua potabile salubre e con caratteristiche di qualità.

È da osservare, comunque, che la clorazione non previene (e non riesce ad ostacolare) lo sviluppo di biofilm. Infatti, le caratteristiche di un biofilm – specie presenti, numero di cellule, gravità specifica, e spessore – sono controllate da numerosi fattori che comprendono il numero e la diversità delle specie presenti nell'acqua, la concentrazione e la natura del materiale organico biodegradabile, il regime idraulico a cui il sistema è soggetto, e le caratteristiche del materiale di supporto colonizzato dai batteri (22).

Nei biofilm generalmente si osserva una elevata diversità di microrganismi, molti dei quali possono essere potenzialmente innocui. La presenza di questi organismi suggerisce che il processo di disinfezione non è sufficiente ad eliminarli e, quindi ciò permette al biofilm di svilupparsi nelle tubature. Questo può pregiudicare la qualità dell'acqua almeno dal punto di vista organolettico, se non da quello igienico-sanitario.

Oltre ai batteri indicatori, a potenziali patogeni e a patogeni primari, tra i microrganismi che concorrono alla formazione di biofilm si ritrovano anche quelli che producono corrosione delle condotte e delle tubature, generalmente gruppi microbici a cui appartengono prevalentemente microrganismi ambientali che non hanno rilevanza sanitaria (23).

La rete di condotte dell'acqua potabile costituisce la parte più estesa del sistema di distribuzione. Tra i diversi fattori che favoriscono la colonizzazione degli impianti da parte dei microrganismi naturalmente presenti o eventualmente introdotti nel flusso idrico, i materiali componenti e i dispositivi di giunzione delle tubature rivestono importanza primaria. Numerosi sono infatti i materiali che possono essere utilizzati per il trasporto dell'acqua nelle opere idrauliche che dalla captazione la distribuiscono fino alle utenze. Acciaio, ghisa, ferro galvanizzato, calcestruzzo, cemento amianto, polivinilcloruro (PVC), polibutilene (PB), polietilene ad alta densità (PEAD) possono essere componenti per tubazioni, raccordi,

guarnizioni ed accessori negli impianti. Alcuni di questi materiali facilitano più di altri la colonizzazione e lo sviluppo di nicchie di moltiplicazione e resistenza microbica (24).

Le concentrazioni microbiche nelle reti possono essere molto elevate (23). In questi casi, nella struttura del biofilm prevalgono composti inorganici e lo sviluppo del fenomeno è il risultato di processi galvanici prodotti all'interno e all'esterno delle condotte metalliche, spesso favoriti da attività microbica e da fattori che rendono l'acqua aggressiva per caratteristiche legate a pH acido, a un grado elevato di durezza, a presenza di cloruri e/o solfati. L'attività microbica può inoltre aumentare l'accumulo di ossidi di ferro, alluminio, manganese, silice, carbonato di calcio e di altri composti inorganici che, come prodotti della corrosione, possono rappresentare un fattore aggiuntivo di protezione nei confronti degli organismi.

I microrganismi possono provocare corrosione nelle condotte metalliche delle reti acquedottistiche anche riducendo l'ossigeno disciolto, liberando metaboliti corrosivi, producendo acido solforico e partecipando al processo catodico. Gli stessi organismi sono anche causa di biodeterioramento di materiali come le plastiche e le gomme utilizzate nelle tubature che vengono quindi a rappresentare fonte di nutrienti organici che ne sostengono la crescita. Alcuni dei microrganismi spesso riscontrati in associazione a questi fenomeni possono dare origine a torbidità e colorazioni delle acque osservabili anche alle utenze, soprattutto dopo stagnamento di acqua nei tubi.

Resistenza dei biofilm ai disinfettanti

Nel processo di trattamento dell'acqua potabile la disinfezione è realizzata allo scopo di ridurre o eliminare gli agenti patogeni e prevenire il rischio di diffusione di malattie.

I comuni disinfettanti sono inefficaci nel controllare l'adesione e lo sviluppo dei biofilm alle superfici, anche se l'efficacia di ogni biocida come mezzo di disinfezione, in definitiva, dipenderà dai livelli di BDOC nell'acqua, dai livelli di nutrienti, dall'età dei biofilm, dal tipo di superficie e dalla quantità di materiale extracellulare presente (25). Per prevenire la ricrescita batterica in rete e la formazione di biofilm sarebbero necessarie concentrazioni di cloro libero ben più elevate di quelle consentite. Infatti, la tolleranza ai biocidi dei microrganismi costituenti i biofilm è di 2-3 ordini di grandezza maggiore rispetto alle cellule microbiche non adese (26).

Seppure le cloroamine non si siano dimostrate efficaci quanto l'ipoclorito, la loro capacità di penetrare la matrice polisaccaridica le rende il miglior candidato alla rimozione dei biofilm (27). È stato infatti dimostrato che la monocloramina si mantiene più a lungo come disinfettante residuo attraverso il sistema di distribuzione; può penetrare efficacemente nei biofilm e, di conseguenza, può controllare la crescita dei microrganismi intrappolati nella matrice meglio di quanto possa fare il cloro libero. Biofilm microbici sviluppati su tubi di ferro e trattati con cloro libero a dosi elevate (4 mg/L) per due settimane non mostrano un significativo cambiamento nella vitalità, ma se trattati con le stesse concentrazioni di monocloramina per la stessa durata di tempo, i microrganismi sono inattivati (28).

È stato comunque osservato che l'azione dei disinfettanti sul biofilm può significativamente variare in funzione dei diversi materiali su cui il biofilm si è prodotto. Il cloro, ad esempio, è più efficace se il biofilm si trova su superfici di bottiglie di vetro e su superfici di ferro galvanizzato rispetto a biofilm cresciuti su PVC. D'altra parte, il biossido di cloro ha un effetto più marcato su biofilm prodotti su PVC, acciaio e rame rispetto a una disinfezione attuata con raggi ultravioletti (29).

Negli anni recenti, diverse ipotesi sono state avanzate nel tentativo di spiegare e di contrastare la resistenza dei biofilm microbici verso i trattamenti chimici ed antibiotici.

Le opinioni maggiormente accreditate considerano diverse ipotesi: la struttura polisaccaridica escluderebbe e/o influenzerebbe l'accesso di agenti antimicrobici agli organismi

sottostanti; le regioni superficiali dello *slime* e le cellule esterne reagirebbero e poi annullerebbero l'effetto del biocida; la limitata disponibilità di nutrienti essenziali nel biofilm comporterebbe una ridotta velocità della crescita specifica e l'adozione di fenotipi atipici delle cellule planctoniche esposte allo stesso mezzo di crescita. L'eterogeneità attraverso la profondità del biofilm potrebbe, in questo caso, portare al predominio di cellule relativamente dormienti alla base del biofilm, in particolare dove il substrato è nutrizionalmente inerte; l'adesione alle superfici porterebbe le cellule a produrre geni associati ad un'esistenza sessile che casualmente influenza la suscettibilità antimicrobica.

Fattori quali la velocità di crescita, la limitazione dei nutrienti e l'espressione di fenotipi di adesione giocherebbero, comunque, un ruolo importante nella resistenza dei biofilm ai disinfettanti.

Bioluminescenza

I fenomeni di sviluppo dei biofilm possono essere seguiti applicando i principi della bioluminescenza.

L'adenosina trifosfato (ATP) è la molecola utilizzata da tutti gli organismi viventi come riserva di energia prontamente utilizzabile. In ogni organismo vivente, l'ATP rappresenta la forma molecolare per immagazzinare l'energia richiesta nei processi metabolici cellulari, la replicazione del DNA, la sintesi delle proteine, ecc. La molecola è essenziale per la vita stessa, è un indice eccellente della quantità di materiale vivente presente in un campione e, in genere, maggiore è la biomassa, maggiore è l'ATP presente.

L'ATP è il più popolare indice biochimico, dal momento che è ubiquitario in tutte le forme di vita cellulare. Considerando che una cellula danneggiata o morta non è più in grado di produrre questa molecola e che la porzione presente viene in parte degradata, la quantificazione dell'ATP organico può dunque essere un ottimo indice della presenza di cellule vitali.

Una misura della presenza e della concentrazione di ATP si basa sull'impiego dello stesso enzima individuato nell'addome delle lucciole della specie *Photinus pyralis*. Nella lucciola, l'ATP si combina con la luciferina, un atomo di magnesio e di ossigeno in presenza dell'enzima luciferasi. Questo enzima controlla il tempismo e l'orientamento di ciascun componente e catalizza la trasformazione dell'ATP e della luciferina con l'emissione di un fotone di luce. I fotoni vengono emessi con un massimo di energia alla specifica lunghezza d'onda di 562 nm. Poiché per ogni fotone di luce emesso, una molecola di ATP viene idrolizzata, l'intensità della luce emessa è direttamente proporzionale all'ATP contenuto nel campione. I fotoni vengono captati, quantificati e misurati da uno specifico strumento, il luminometro, ed i risultati di questo saggio sono espressi come unità di luce relativa (RLU). Quanto maggiore è il livello di prodotti organici e microrganismi in un campione, tanto maggiore sarà il livello di ATP. Quest'ultimo, a sua volta, sarà proporzionale alla quantità di luce prodotta durante il test. Quindi, quanto maggiore sarà la misura espressa in RLU, tanto maggiore sarà la contaminazione del campione.

La determinazione dell'ATP trova applicazione nel controllo di qualità nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica, nel monitoraggio dell'igiene degli impianti e della qualità delle materie prime.

Il tempo di trasformazione dell'ATP è estremamente rapido e molte sono le cause che possono alterarne il contenuto nelle cellule, tra cui l'esposizione alla luce diretta, le variazioni di ossigeno o di temperatura, il congelamento, la centrifugazione o la filtrazione. La reazione di bioluminescenza si attiva con livelli di ATP estremamente bassi. Ciò ha permesso di applicare tale reazione alla valutazione della presenza microbica in campioni di varia natura e con gradi di contaminazione molto bassa o nulla. L'analisi non permette dunque di discriminare né il tipo né

la specie di contaminante, ma di fatto può rapidamente dare una valutazione estremamente precisa paragonabile ad un test di “conta totale”.

L’uso della bioluminescenza per la misura dell’ATP offre alcuni vantaggi rispetto ad altri metodi di analisi considerando che la reazione bioluminometrica è istantanea, e le letture sono ottenibili nel giro di pochi secondi. Inoltre, il sistema identifica la presenza di qualsiasi sostanza organica oltre ai residui microbici, anche se invisibili ad occhio nudo. I risultati sono, d’altra parte, sufficientemente affidabili per fornire una corretta valutazione del rischio. Infatti, poiché il test misura il materiale biologico totale presente, esso può rilevare non soltanto i microrganismi, ma anche aree di potenziale rischio dove vi sono residui biologici che potrebbero essere una fonte di nutrimento per i microrganismi.

La valutazione quantitativa dell’ATP può essere eseguita per valutare l’ATP totale – indicatore della presenza di residui organici (biocarico) e di microrganismi – e l’ATP libero che si trova in soluzione. La differenza tra i due valori ottenuti rappresenta il contributo di ATP degli organismi viventi. Non è possibile correlare i risultati ottenuti con il metodo del conteggio microbico su piastra con il metodo basato sulla determinazione dell’ATP. Infatti, il metodo bioluminometrico rivela una risposta biologica complessiva, mentre i metodi colturali, anche quelli meno selettivi permettono di evidenziare non tutti i microrganismi presenti, ma solo quelli che sono in una fase fisiologica vitale e per i quali le condizioni ambientali risultano ottimali.

Materiali utilizzati per la produzione di tubature per il trasporto di acque potabili

I materiali e gli oggetti utilizzati negli impianti fissi di captazione, di trattamento, di adduzione e di distribuzione delle acque destinate al consumo umano devono essere compatibili, così come previsto dal DL.vo 31/2001 (3), con le caratteristiche definite nel Decreto del Ministero della Salute 4 aprile 2004, n. 174 (30). Inoltre essi non devono, nel tempo, in condizioni normali o prevedibili d’impiego e di messa in opera, alterare la qualità dell’acqua con essi posta a contatto, conferendole caratteristiche nocive per la salute, né modificarne sfavorevolmente la qualità organolettica, fisica, chimica e microbiologica. Le imprese che producono materiali che possono essere utilizzati negli impianti idrici per venire a contatto con acqua destinata al consumo umano, sono tenute a controllare la rispondenza alle norme ad essi applicabili e a dimostrare di aver adeguatamente provveduto ai controlli e agli accertamenti necessari. Secondo la normativa, possono essere utilizzati a contatto con le acque destinate al consumo umano esclusivamente i) i metalli, le loro leghe ed i rivestimenti metallici elencati nell’allegato I del Decreto n. 174, a condizione che la loro composizione ed i livelli di impurezze ammesse rispettino quanto previsto dallo stesso allegato; ii) i materiali a base di leganti idraulici, compresi quelli in cui sono contenuti costituenti organici, gli smalti porcellanati, le ceramiche ed il vetro, a condizione che la loro composizione ed i livelli di impurezze ammesse rispettino quanto previsto nell’allegato II dello stesso regolamento; iii) le materie plastiche, le gomme naturali e sintetiche, a condizione che la loro composizione ed i livelli di impurezze ammesse rispettino quanto previsto nell’allegato III dello stesso regolamento.

OBIETTIVI E METODOLOGIE

La qualità dell'acqua potabile è condizionata in modo rilevante dalla struttura e dallo stato delle reti idriche utilizzate per la distribuzione. Fino a poco tempo fa, questo criterio non veniva adeguatamente preso in considerazione. Solo di recente, con l'entrata in vigore del DL.vo 31/2001 (3), che ha recepito la Direttiva europea del 83/98/CE (5), è stato stabilito che uno dei siti in cui valutare la concentrazione dei parametri stabiliti è il punto di utilizzo finale, quindi il rubinetto dell'utente. Nonostante i trattamenti subiti dall'acqua, diverse specie microbiche possono persistere nelle acque in distribuzione e contribuire alla formazione di biofilm che, anche se esposti all'azione di disinfettanti, possono rappresentare un punto critico nelle procedure di controllo della qualità delle acque potabili.

Nelle tubature dell'acqua potabile, la presenza di biofilm, per la specifica capacità della struttura, in grado di ospitare microrganismi eterotrofi, autotrofi, patogeni ed opportunisti patogeni, può rappresentare una fonte di diffusione di microrganismi nell'acqua e quindi, potenzialmente, un rischio per la salute dei consumatori.

Alla luce di queste evenienze, è stata seguita nel tempo l'evoluzione di fenomeni di formazione di biofilm attraverso l'enumerazione di microrganismi sviluppati su materiali a contatto con l'acqua che possono essere utilizzati per la produzione di condutture per il trasporto delle acque destinate al consumo umano.

Nell'indagine svolta, per le loro specifiche caratteristiche e diffusione d'uso, sono stati selezionati tubi di polietilene reticolato (PE-Xb), polipropilene (PP-R) e acciaio al carbonio zincato; tutti questi materiali rientrano tra quelli autorizzati per potere essere utilizzati a contatto con l'acqua potabile sulla base del Decreto del Ministero della Salute n. 174.

Le indagini microbiologiche sui tubi dei materiali selezionati sono state effettuate in ambiente statico e in condizioni dinamiche al fine di simulare quello che può verificarsi nelle condutture degli impianti idrici in condizione di stagnazione e di flusso dell'acqua nei tubi.

Materiali utilizzati nello studio

Lo sviluppo di settori di primaria importanza come il trasporto e la distribuzione di acqua potabile è stato accompagnato, in tempi recenti, dal crescente utilizzo di tubi in materiale termoplastico. Ciò è da imputarsi alle buone proprietà funzionali (robustezza, resistenza meccanica, resistenza alla corrosione), all'estrema versatilità e al costo di installazione relativamente basso.

È per questo che nello studio svolto sono stati impiegati tre tipi di tubi costituiti da materiali diversi: due in materiale termoplastico e uno di lega metallica. La selezione dei materiali è stata effettuata in funzione sia delle diverse caratteristiche strutturali, sia della loro aumentata diffusione per la realizzazione delle condutture dell'acqua potabile.

Polietilene reticolato (PE-Xb)

I tubi in polietilene reticolato PE-Xb (reticolato mediante silani) offrono il vantaggio di presentare una grande lavorabilità; utilizzati nelle installazioni civili sono normalmente forniti in rotoli e quindi possono essere maneggiati e curvati a freddo senza alcun attrezzo, questo

grazie all'estrema leggerezza del materiale. Il peso specifico medio è di $0,95 \text{ g/cm}^3$ contro $7,85 \text{ g/cm}^3$ dell'acciaio e $8,9 \text{ g/cm}^3$ del rame.

Il raggio di curvatura può essere fino a otto volte il diametro del tubo. Per curvature molto strette o tubi di diametro elevato è necessario effettuare una curvatura a caldo durante la quale il tubo viene riscaldato alla temperatura di $130 \text{ }^\circ\text{C}$ e formato come si desidera, anche per la sua caratteristica di possedere una memoria termica.

Il PE-Xb ha un'eccellente resistenza sia agli acidi sia alle basi e quindi può essere utilizzato anche per trasportare queste sostanze chimiche senza rischi di ridurre le sue caratteristiche fisico-meccaniche. Essendo poi un cattivo conduttore elettrico non è soggetto ai fenomeni distruttivi dovuti alle correnti vaganti che, al contrario, sono causa di perforazione nei sistemi di condotte in metallo. Inoltre, ha un'elevata resistenza all'abrasione e questa caratteristica lo rende idoneo al trasporto di sostanze disciolte in acqua. La struttura superficiale è altamente omogenea per l'assenza di intagli e porosità che sono sempre presenti sulla superficie dei tubi metallici tradizionali utilizzati nel trasporto di acqua; questa caratteristica consente di avere elevate portate con basse perdite di carico.

Una tubatura è generalmente soggetta a sollecitazioni meccaniche dovute alla pressione interna e alle sollecitazioni termiche dovute alla temperatura. Considerando le caratteristiche del PE-Xb, si può considerare un intervallo di temperatura operativa da $-100 \text{ }^\circ\text{C}$ fino a $+100 \text{ }^\circ\text{C}$. Tenendo in considerazione i valori di pressione e temperatura normalmente utilizzati nelle installazioni civili, è stato valutato che, grazie alle eccellenti caratteristiche del PE-Xb, i sistemi di condotte realizzate in questo materiale hanno una "vita prevista" comparabile con quella della struttura muraria.

Polipropilene (PP-R)

I tubi di polipropilene ad alto peso molecolare (PP-R) hanno un'ampia versatilità d'impiego. Sono ideali per il trasporto di acqua calda e fredda in impianti idrosanitari, di riscaldamento e di condizionamento. Il materiale è utilizzato in impianti di potabilizzazione dell'acqua e di trasporto di liquidi alimentari, ma anche, per le sue capacità di resistenza chimica, in impianti industriali per il trasporto di aria compressa e fluidi aggressivi (acidi, soluzioni alcaline). Grazie alla facilità d'impiego con tubi di questo materiale si possono allocare impianti anche in luoghi difficili da raggiungere o in spazi limitati. La giunzione dei vari elementi mediante fusione termica assicura una tenuta perfetta, anche nelle condizioni d'impiego più difficili.

Le tubazioni in PP-R presentano una portata incrementata del 20% grazie ad un ridotto spessore della parete, alta stabilità e coefficiente di dilatazione lineare quasi identico a quello dei tubi metallici. Il PP-R è caratterizzato da un basso peso specifico con conseguente leggerezza del materiale, neutralità all'odore e al gusto, alta resistenza agli urti, minima ruvidità, resistenza alle incrinature da tensione, bassa conduttività termica, basse perdite di carico e inattaccabilità da parte delle correnti vaganti. Temperature di picco di $100 \text{ }^\circ\text{C}$, dovute a malfunzionamenti temporanei, non creano problemi, mentre temperature permanenti tra $70 \text{ }^\circ\text{C}$ e $90 \text{ }^\circ\text{C}$ riducono gli anni di esercizio di questo tipo di tubazioni.

Il PP-R è un materiale particolarmente sensibile ai raggi UV, pertanto ne è sconsigliata l'esposizione per lungo tempo ai raggi solari. Per tale ragione i tubi non devono mai essere installati e immagazzinati in modo che possano sottostare all'azione diretta dei raggi solari. Il polipropilene, come del resto tutte le sostanze di natura organica, è infatti soggetto a fenomeni di ossidazione e di degradazione per effetto sia dell'ossigeno atmosferico sia della luce solare diretta. In questi casi, si osservano fenomeni di invecchiamento del materiale e una degradazione chimica che causa fenomeni di fessurazione superficiali. Per rendere il PP-R più

resistente ai raggi UV, viene aggiunto, generalmente, un additivo stabilizzante il cui effetto è comunque limitato nel tempo.

Le tubazioni in PP-R sono resistenti alla corrosione e più silenziose rispetto a quelle in metallo, a parità di flusso convogliato; inoltre, non lasciando passare la luce, evitano che si instaurino condizioni favorevoli allo sviluppo di alghe.

Acciaio al carbonio zincato

L'altro tipo di materiale utilizzato nelle prove sperimentali era costituito da tubi di acciaio al carbonio zincato. L'uso dell'acciaio nelle condotte idriche richiede l'utilizzo di molteplici raccordi. Il materiale è soggetto a fenomeni di corrosione e può rilasciare sostanze contaminanti nell'acqua, inoltre è facilmente soggetto a fenomeni di deposito di calcare e conseguente riduzione della sezione, nonché a fenomeni di foratura a causa delle correnti galvaniche.

Uno dei principali problemi legati all'uso di materiali metallici come l'acciaio per il trasporto dell'acqua potabile è dovuto al decadimento che conduce allo sviluppo di fenomeni di corrosione. I processi di corrosione tendono a riportare spontaneamente i materiali metallici al loro stato termodinamicamente più stabile, che è quello di ricombinazione con sostanze quali, ad esempio, l'ossigeno. Un'idea dell'importanza e dell'estensione dei fenomeni di corrosione si ricava da una valutazione dell'entità dei danni causati; stime recenti fanno ritenere che i danni raggiungono, nei paesi industrializzati, il 3,5% del prodotto nazionale lordo. I fenomeni di corrosione possono essere limitati con l'impiego di rivestimenti metallici (zinco, nichel, cromo, piombo) e non metallici (vernici, pitture, ceramiche, smalti). Tuttavia, in questo caso, se le superfici si trovano a contatto con acqua possono verificarsi fenomeni di cessione di sostanze, in alcuni casi, tossiche.

La zincatura a caldo è uno dei metodi più diffusi per la protezione dei manufatti in acciaio dall'ambiente esterno. La garanzia che non si formi ruggine è data dalla protezione catodica offerta dallo strato di zinco che, avendo potenziale minore, si ossida al posto dell'acciaio. Il rivestimento di zinco si salda alla superficie dell'acciaio creando una lega tra zinco e acciaio; si forma in tal modo un rivestimento tenace, resistente e durevole che protegge l'acciaio tramite un'eccezionale difesa elettrochimica.

Microrganismi utilizzati nello studio

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa è stato uno dei microrganismi selezionati, con *Stenotrophomonas maltophilia*, per la nostra indagine sperimentale. La sua scelta è stata dettata dalle sue caratteristiche, dalla sua diffusa presenza e capacità di sopravvivenza in ambienti acquatici, dalla sua elevata potenzialità di andare a far parte della struttura di biofilm e dalla sua potenzialità di patogeno.

I microrganismi appartenenti alla specie *P. aeruginosa* sono batteri a forma di bastoncino diritto o leggermente ricurvo, con lunghezza di $1,5 \pm 3 \mu\text{m}$ e larghezza compresa tra 0,5 e 0,7 μm , mobili tramite uno o più flagelli polari, Gram negativi, aerobi, ossidasi e catalasi positivi, con metabolismo respiratorio ma in grado anche di utilizzare i nitrati come accettori di elettroni alternativi all'ossigeno. La maggioranza dei ceppi cresce a 42 °C ma non a 4 °C. *P. aeruginosa* si caratterizza per la produzione di pigmenti solubili: piocianina di colore verde-blu, piorubina di colore rossastro-marrone e fluoresceina rilevabile per fluorescenza.

P. aeruginosa è un microrganismo caratterizzato da un'elevata capacità di adattamento. Si rileva in acque superficiali, reflue e marine, suoli, vegetazione e in generale, in ambienti acquatici artificiali e, comunque, in tutti gli ambienti umidi. Inoltre è in grado di crescere in acqua distillata, in cosmetici e di sopravvivere nei disinfettanti a base di ammonio quaternario. Si moltiplica facilmente, raggiungendo concentrazioni elevate, anche nelle acque oligotrofe dove la sua presenza è in ogni modo difficilmente correlabile a quella degli indicatori di contaminazione fecale. Rappresenta uno dei microrganismi tipici dei biofilm. Infatti è in grado di aderire a superfici umide o in contatto con liquidi grazie alla produzione da parte di ceppi mucoidi o non mucoidi, di lipopolissaccaridi e glicoproteine extracellulari. È un microrganismo prettamente ambientale e per questo rilevabile anche in acque sotterranee e in acque potabili dove può essere riscontrato in concentrazioni ampiamente variabili. In particolare, è facilmente rilevabile in condizioni di stagnamento d'acqua ed è in grado di installarsi nelle cisterne, nei cassoni, nei rompigitto dei rubinetti e negli apparecchi per il trattamento domestico dell'acqua raggiungendo anche cariche batteriche elevate. Tuttavia, è anche vero che, come opportunisto patogeno, non sembra possa rappresentare un rischio reale per la popolazione sana.

È più resistente di *Escherichia coli* alla disinfezione e, nelle acque clorate, è generalmente evidenziato quando la concentrazione di cloro residuo è inferiore a 1 mg/L. Inoltre, *P. aeruginosa* si caratterizza anche per essere multi-resistente agli antibiotici, rappresentando quindi un rischio per la salute in ambienti ospedalieri dove può provocare infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite; può inoltre causare ulcere corneali e cheratiti, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, broncopolmoniti e meningiti; come patogeno opportunisto, è anche noto come agente responsabile di infezioni polmonari croniche nei pazienti affetti da fibrosi cistica tra i quali è la causa maggiore di morbilità e mortalità (31). L'azione di *P. aeruginosa* è favorita dalla formazione di un film in cui il microrganismo rimane aggregato in una matrice extracellulare (32); in questo caso, le condizioni ambientali sembra possano sostenere un'influenza significativa su quei fattori molecolari necessari alla formazione della struttura.

La ricerca di *P. aeruginosa* nelle acque destinate al consumo umano in distribuzione ha una rilevanza legata prevalentemente alla verifica dell'efficacia del trattamento a cui sono soggette le acque. Il parametro è inserito tra quelli indicati nell'Avvertenza dell'Allegato I del DL.vo 31/2001 e successive modifiche e integrazioni e va interpretato quindi come indicatore di qualità delle acque potabili in rete. Diversamente, il suo inserimento nella Parte A dell'Allegato I dello stesso decreto impone lo svolgimento di controlli del grado di protezione dell'acqua dall'ambiente esterno durante il confezionamento di acque imbottigliate anche per la verifica del mantenimento di condizioni di buona qualità dell'acqua durante la conservazione. In questo caso, come patogeno opportunisto in grado di moltiplicarsi in condizioni statiche dell'acqua, *P. aeruginosa* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano messe in vendita in bottiglia o in contenitori.

Stenotrophomonas maltophilia

Ai fini della nostra indagine è stata anche selezionata la specie *Stenotrophomonas maltophilia* che si caratterizza per essere un patogeno opportunisto e uno dei maggiori colonizzatori di biofilm microbici.

La classificazione del genere *Stenotrophomonas* è stata proposta nel 1993 dopo molti anni di controversie riguardanti l'appropriata posizione tassonomica di questo organismo. Classificato in precedenza come *Pseudomonas maltophilia*, poi come *Xantomonas maltophilia*, è stato infine classificato come *Stenotrophomonas maltophilia* e definito con il termine attualmente in uso. Il genere *Stenotrophomonas* include attualmente due specie: *Stenotrophomonas maltophilia* e, più

recentemente *Stenotrophomonas africana*, quest'ultima biochimicamente identica alla precedente, ad eccezione della non assimilazione del cis-aconitato.

I microrganismi appartenenti alla specie *S. maltophilia* sono batteri a forma di bastoncino diritto o leggermente ricurvo, Gram negativi, aerobi, non sporigeni, di dimensioni da 0,5 a 1,5 µm, mobili con diversi flagelli polari. *S. maltophilia* è un batterio aerobio obbligato. La crescita non si verifica a temperature inferiori a 5 °C o superiori a 40 °C, la temperatura ottimale di crescita è 35 °C (33). *S. maltophilia* è generalmente considerato come batterio opportunista. Ubiquitario in natura, è possibile osservare la sua presenza in acque, suoli, rizosfera, animali e piante. Viene frequentemente ritrovato a livello della flora commensale dell'uomo, e può anche essere isolato, come contaminante, negli alimenti, nelle macchine per la fabbricazione del ghiaccio, in apparecchi ospedalieri, umidificatori, liquidi di emodialisi, perfusioni per il nutrimento parenterale, soluzioni per aerosol, soluzioni antisettiche, quali la clorexidina o l'ammonio quaternario. La sua diffusione può avvenire sia direttamente a partire dalle fonti descritte sopra, sia tramite le mani, ed in questo caso può portare alla colonizzazione della pelle (ulcere), delle mucose o eventualmente di liquidi biologici. È stato osservato che, in alcuni pazienti portatori di *S. maltophilia*, viene evacuato con le feci, in particolare nel caso di pazienti con neoplasie ematologiche. Sebbene siano state descritti casi di colonizzazione o d'infezione fuori dall'ambiente ospedaliero, *S. maltophilia* è considerato principalmente un patogeno ospedaliero (34).

Poco si conosce sui fattori di apparente virulenza di *S. maltophilia*. La difficoltà nel distinguere fra colonizzazione ed infezione ha incoraggiato la convinzione che *S. maltophilia* è un microrganismo con patogenicità molto limitata. Queste teorie sono state rinforzate da studi in cui casi di infezione causate dal batterio non erano associate ad un esito clinico sfavorevole. Sembrerebbe che *S. maltophilia* possa essere associato ad infezioni cliniche solo quando agisce in sinergia con altri patogeni.

L'elaborazione di un insieme di enzimi extracellulari prodotti da *S. maltophilia*, quali DNasi, RNasi, fibrinolisinasi, lipasi, ialuronidasi, proteasi ed elastasi, è stata descritta in diversi studi (35, 36) ed è stato ipotizzato che questi enzimi possano giocare un ruolo importante nella patogenicità del batterio.

S. maltophilia, di origine clinica o ambientale, è capace di aderire a diversi tipi di materiale plastico, come anche al vetro, ed è stato osservato che l'adesione a materiali carichi negativamente può essere dovuta alla carica positiva manifestata da questa specie a pH fisiologico.

Negli anni più recenti, è stato osservato un aumento dell'incidenza di colonizzazioni e di infezioni da *S. maltophilia*. Le vie tracheobronchiali sembrano rappresentare il sito d'elezione per il batterio. Spesso, si tratta di colonizzazioni, ma le infezioni delle vie respiratorie sono fra le più frequenti e complicano, in generale, uno stato di colonizzazione anteriore. *S. maltophilia* è stato ritenuto responsabile del 5% delle polmoniti nosocomiali. Una proporzione significativa di pazienti infetti da *S. maltophilia* soffrono di malattie polmonari, quali broncopneumopatia cronica ostruttiva, bronchiectasie, ostruzione endobronchiale, cifoscoliosi o mucoviscidosi. Il tasso di mortalità delle batteriemie da *S. maltophilia* varia fra lo 0% e il 69%.

È stato inoltre chiaramente dimostrato che l'utilizzo di certi antibiotici a largo spettro aumenta il rischio d'infezione da *S. maltophilia*. In effetti, malgrado l'importanza dell'attività degli antibiotici a largo spettro contro i germi Gram-negativi, un numero elevato di queste molecole sono inefficaci contro *S. maltophilia* e ciò spiegherebbe la predisposizione alla colonizzazione di questo batterio in pazienti sottoposti ad una prolungata terapia con antibiotici a largo spettro (34).

Come microrganismo di origine ambientale, *S. maltophilia* fa parte della flora autoctona delle acque e rappresenta un potenziale colonizzatore dei biofilm negli impianti idrici, così

come in pazienti ospedalizzati.

La regolazione della produzione di biofilm formato da *S. maltophilia* è complessa e influenzata da diversi fattori abiotici, tra cui temperatura, concentrazione di O₂ e pH sembrano quelli di maggiore rilevanza.

Nelle acque potabili, anche clorate, *S. maltophilia* può essere rilevato tra i microrganismi rilevabili all'interno del gruppo degli eterotrofi e per individuarlo è necessario lo svolgimento di alcuni test di reazioni biochimiche.

Conteggio delle colonie

Con il termine “conteggio delle colonie” si indica un parametro che permette di rilevare un gruppo molto eterogeneo di microrganismi aerobi e anaerobi facoltativi che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. Molti dei microrganismi che vengono compresi sotto questo termine fanno parte della microflora ambientale autoctona delle acque, presente indipendentemente da qualsiasi contaminazione.

L'uso di temperature diverse permette di mettere in evidenza microrganismi mesofili e psicrofili.

Negli ultimi anni il ruolo svolto nelle acque destinate al consumo umano dal gruppo di microrganismi indicati dagli anglosassoni sotto il nome di Heterotrophic Plate Count (HPC) (conteggio degli eterotrofi) e corrispondente al termine conteggio delle colonie su agar, è stato approfondito e riconsiderato. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riconosciuto che gran parte degli studi epidemiologici più recenti, volti alla verifica del rischio associato alla presenza di questi microrganismi nelle acque, ha confermato che non esistono evidenze che dimostrino che, in assenza di contaminazione fecale, i risultati ottenuti dalla determinazione del parametro siano correlati con i rischi per la salute in una popolazione sana.

Nella Direttiva Europea 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano e nella nostra normativa nazionale (DL.vo 31/2001), il parametro è riportato nella Parte A e nella Parte C (parametri indicatori) dell'Allegato I.

Se per le acque imbottigliate (Parte A) sono stabiliti valori di parametro (conteggio a 22 °C: 100/mL; conteggio a 37 °C: 20/mL), alla concentrazione degli eterotrofi rilevabili nelle acque in distribuzione (Parte C) non è stato assegnato alcun valore limite. La normativa stabilisce infatti che i valori del conteggio delle colonie a 22 °C nelle acque in rete debbano presentarsi “senza variazioni anomale”, accettando quindi la possibilità che ogni tipo di acqua abbia comunque intrinseche caratteristiche di qualità e una flora microbica naturale. Tuttavia, il superamento delle concentrazioni “storicamente” rilevate nell'acqua in distribuzione può segnalare la potenziale esistenza di condizioni di ricrescita batterica in rete e modifiche della qualità dell'acqua. Il parametro va considerato indicatore di qualità e di efficienza di trattamento. Variazioni di concentrazione sono tollerate fermo restando quanto stabilito nell'art. 14 del decreto e possono, in questo caso, essere segnalate come “inosservanza” del valore di parametro (37).

Fase 1: crescita microbica in ambiente statico

Un numero di elementi rappresentati da tubi di ciascun tipo di materiale è stato posto all'interno di un serbatoio sanitizzato e riempito di acqua di rubinetto. Analisi di acqua e di biofilm prodotto sulla superficie dei tubi sono state effettuate al tempo zero e, successivamente, con una cadenza trisettimanale per alcuni mesi, per la determinazione del parametro conteggio delle colonie e per la misura dell'ATP.

Conteggio delle colonie a 22 °C

Dalla superficie interna di ciascun elemento è stato rimosso il biofilm e, dopo sua eluizione e sospensione in soluzione diluente, volumi noti sono stati esaminati per il parametro conteggio delle colonie seminando su terreno colturale non selettivo. Analogamente e in contemporanea è stato raccolto e analizzato un volume noto di acqua dal serbatoio.

Il metodo e la procedura utilizzati per l'analisi sono stati quelli previsti dal manuale dei metodi analitici di riferimento (37).

Determinazione dell'ATP

Contemporaneamente al conteggio dei batteri eterotrofi, è stata determinata la misura dell'ATP. Il metodo consente di valutare il livello di materiale organico e la concentrazione dei microrganismi presenti nel biofilm formatosi sulla superficie interna dei tubi. I campioni di biofilm sono stati prelevati impiegando il dispositivo Clean-Trace e le misurazioni sono state effettuate immediatamente mediante il Luminometro Biotrace. I risultati ottenuti sono stati espressi in unità di luce relative (RLU). I campioni di acqua prelevata dal serbatoio sono stati analizzati in modo analogo per la determinazione di ATP totale e libero.

Fase 2: isolamento di *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* in ambiente statico

La seconda fase dello studio è stata svolta utilizzando lo stesso tipo di materiali selezionati per la fase precedente. Anche in questo caso, i singoli elementi, sono stati posti all'interno di un serbatoio sanitizzato riempito di acqua di rubinetto precedentemente sterilizzata e successivamente contaminata artificialmente, inoculando sospensioni a concentrazione nota di *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 e *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637.

Analisi di acqua e di biofilm prodotto sulla superficie di ciascun tipo di materiale sono state effettuate al tempo zero e, successivamente, per alcuni mesi, con una cadenza trisettimanale per la determinazione delle concentrazioni delle due specie microbiche.

Enumerazione di *Pseudomonas aeruginosa*

Dalla superficie interna di ciascun tubo immerso in acqua è stato rimosso il biofilm e, dopo sua eluizione e sospensione in soluzione diluente, volumi noti sono stati esaminati per l'enumerazione di *P. aeruginosa*. Analogamente e in contemporanea è stato raccolto e analizzato un volume noto di acqua dal serbatoio per la ricerca dello stesso microrganismo.

Il metodo e la procedura utilizzati per l'analisi sono stati quelli previsti dal manuale dei metodi analitici di riferimento (37).

Enumerazione di *Stenotrophomonas maltophilia*

Dagli stessi campioni prelevati per la ricerca di *P. aeruginosa*, e con la stessa procedura analitica, è stata eseguita l'analisi per l'enumerazione della specie *S. maltophilia* (37).

Fase 3: crescita microbica in condizioni dinamiche

Per la terza fase dello studio è stato allestito un sistema costituito da un tubo di circa tre metri di lunghezza in PE-Xb, collegato all'impianto idrico e chiuso all'estremità opposta da un rubinetto. Attraverso il tubo è stata fatta scorrere acqua potabile per periodi limitati con cadenza stabilita simulando un utilizzo giornaliero di acqua prelevata da un rubinetto della rete idrica.

Analisi di acqua e di biofilm adeso al tubo di PE-Xb sono state effettuate per la determinazione del parametro conteggio delle colonie e per la misura dell'ATP. I prelievi e le misure sono stati eseguiti al tempo zero e, successivamente, con una cadenza trisettimanale per alcuni mesi. La procedura analitica è stata analoga a quella seguita nella fase 1 dello studio.

RISULTATI

Fase 1: conteggio delle colonie a 22 °C in ambiente statico

Nella Figura 1 è stato riportato l'andamento delle concentrazioni del parametro conteggio delle colonie a 22 °C nel biofilm prodotto sulla superficie dei tubi dei tre materiali selezionati e nell'acqua in cui erano immersi.

Il picco massimo della curva di concentrazione è stato ottenuto tra la seconda e la terza settimana su polietilene ed acciaio, con valori elevati e compresi tra 10^6 UFC/ml e 10^5 UFC/ml. Nell'arco di circa 6 settimane, è stata, tuttavia, osservata una progressiva tendenza alla diminuzione delle concentrazioni microbiche nel biofilm adeso ai materiali, mentre per l'acqua analizzata in parallelo le concentrazioni, pur rimanendo sempre al di sotto di un ordine di grandezza rispetto a quelle rilevate nel biofilm, hanno mostrato un andamento più regolare.

I dati, valutati con il test U di Mann-Whitney, hanno dimostrato che non vi era una differenza statisticamente significativa se venivano comparate le mediane delle concentrazioni degli eterotrofi rilevati su tutti e tre i tipi di materiale.

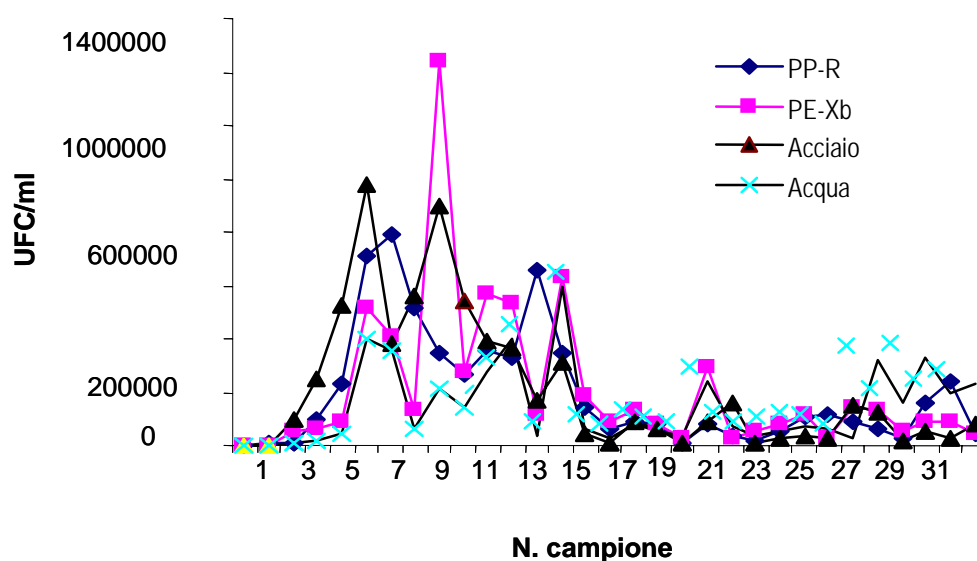


Figura 1. Andamento delle concentrazioni del parametro conteggio delle colonie a 22 °C nel biofilm sviluppato sulle superfici dei tubi di PP-R, PE-Xb e acciaio e nei campioni di acqua

Determinazione dell'ATP in ambiente statico

Nella Figura 2 sono riportati i valori di ATP ottenuti dall'esame del biofilm sviluppato sulla superficie interna dei tubi analizzati.

Il picco massimo della curva di concentrazione ($3,5 \times 10^4$ RLU/cm²) è stato osservato tra la seconda e la terza settimana nel biofilm sviluppato su acciaio che ha anche fornito valori

ampiamente variabili nel tempo. D'altra parte, sull'acciaio è stata anche osservata una discontinuità più marcata rispetto agli altri materiali, accompagnata da concentrazioni più basse nei valori minimi.

I risultati, analizzati con il test U di Mann-Whitney, hanno dimostrato, tuttavia, che non c'erano differenze statisticamente significative nei valori di ATP quando venivano comparate le mediane dei dati rilevati su tutti e tre i tipi di materiale.

Nella Figura 3 sono riportate le misure di ATP libero e totale relative alle analisi eseguite sui campioni di acqua. I valori ottenuti concordavano nel tempo e, sostanzialmente, anche nelle concentrazioni, con un andamento in base al quale l'ATP totale era sempre in concentrazione leggermente superiore all'ATP libero. La concentrazione massima raggiunta per l'ATP totale era, infatti, 4×10^3 RLU/cm², mentre quella dell'ATP libero era pari a $3,6 \times 10^3$ RLU/cm².

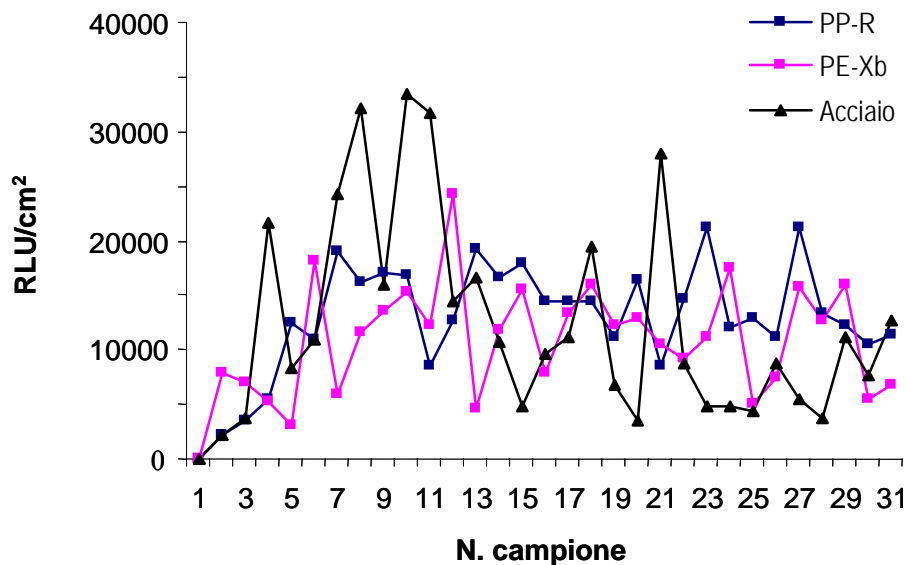


Figura 2. Andamento delle concentrazioni di ATP nel biofilm sviluppato sulle superfici dei tubi di PP-R, PE-Xb e acciaio

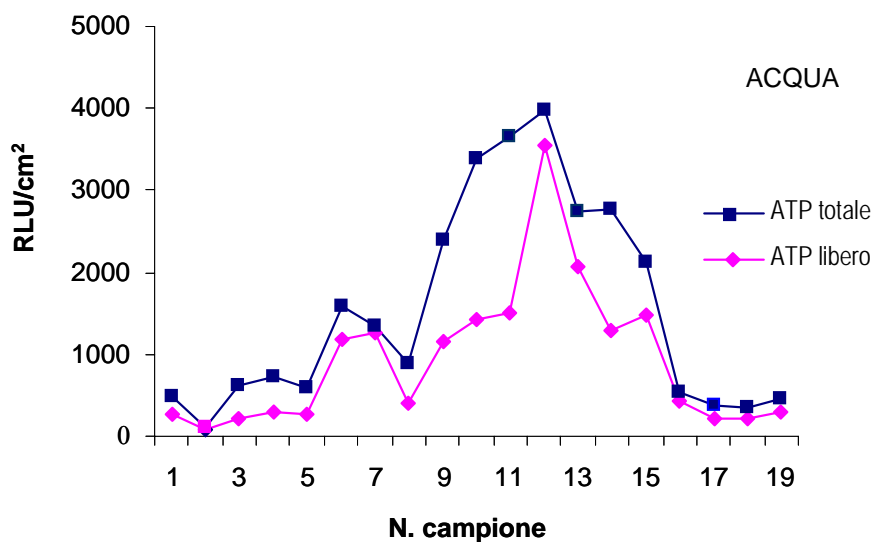


Figura 3. Andamento dei valori di ATP libero e totale determinati nei campioni di acqua

Fase 2: isolamento di *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* in ambiente statico

Nelle Figure 4-6 sono riportati i risultati delle concentrazioni di *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas aeruginosa* rilevate nel biofilm prodotto sulla superficie interna dei tubi selezionati.

S. maltophilia ha fornito valori di concentrazione costantemente più alti su tutti i materiali indagati con differenze significative di un ordine di grandezza. Rispetto a *P. aeruginosa*, il microrganismo risultava in concentrazioni 3,5 volte superiori su PE-Xb, 2 volte superiori su PP-R e circa 7 volte più concentrato nel biofilm formatosi su acciaio.

I risultati, analizzati con il test U di Mann-Whitney, hanno dimostrato che, in questo caso, vi era una differenza statisticamente significativa tra le mediane delle concentrazioni dei due microrganismi presenti nel biofilm prodotto su tutti e tre i materiali.

Nella Figura 7 sono presentati i risultati dell'andamento delle concentrazioni dei due microrganismi nell'acqua in cui si trovavano i tubi. A valori ampiamente variabili, ma comunque superiori di 1-2 ordini di grandezza per *Stenotrophomonas*, corrispondevano valori più bassi per *Pseudomonas*. Anche in questo caso, quindi, i risultati, analizzati con il test U di Mann-Whitney, hanno dimostrato che vi era una differenza statisticamente significativa tra le mediane delle concentrazioni microbiche.

Le Figure 8 e 9, rispettivamente, riassumono i risultati ottenuti dalla determinazione delle concentrazioni di *S. maltophilia* e *P. aeruginosa* presenti nell'acqua e nel biofilm formatosi sulla superficie interna dei tubi. In entrambi i casi le concentrazioni dei due microrganismi risultavano superiori nel biofilm formato sulle superfici dei tubi di PE-Xb rispetto a quelle rilevate nel biofilm sviluppato sugli altri materiali. Tuttavia, nei campioni di acqua analizzata in parallelo le concentrazioni di *S. maltophilia* sono state marcatamente più elevate rispetto a quelle rilevate nel biofilm se si considerano i valori più alti ottenuti all'inizio della fase di studio; in questo caso, un decremento delle concentrazioni di entrambi i microrganismi è stato osservato dopo circa 7 settimane.

Dai risultati valutati nella loro globalità emerge quindi una maggiore tendenza, da parte dei tubi in PE-Xb rispetto agli altri, a concentrare nel biofilm i microrganismi ricercati. In particolare, è stata osservata una più rilevante capacità di *S. maltophilia* di formare biofilm su PE-Xb rispetto a PP-R e acciaio. Infatti, i risultati, analizzati mediante il test U di Mann-Whitney, hanno dimostrato che esisteva una differenza statisticamente significativa tra le mediane delle concentrazioni se si confrontano i valori ottenuti su PE-Xb rispetto a PP-R ed acciaio, mentre non vi era differenza se considerati i valori di concentrazione rilevati nel biofilm sviluppato su questi due ultimi materiali. Diversamente, il confronto delle mediane delle concentrazioni del microrganismo ha messo in evidenza l'esistenza di una differenza statisticamente significativa tra i valori ottenuti su PP-R e acciaio rispetto alle concentrazioni rilevate nell'acqua, mentre non è stata calcolata nessuna differenza tra le concentrazioni rilevate nel biofilm prodotto su PE-Xb e quelle in acqua.

Per *P. aeruginosa* i risultati, analizzati mediante il test U di Mann-Whitney, hanno indicato una tendenza analoga a quella osservata per *Stenotrophomonas* se venivano confrontati i valori di concentrazione nei biofilm. Diversamente, il confronto delle mediane delle concentrazioni ha messo in evidenza l'esistenza di una differenza statisticamente significativa delle concentrazioni ottenute nel biofilm su acciaio rispetto alle concentrazioni rilevate nell'acqua, mentre nessuna differenza è stata calcolata quando venivano tenute in considerazione le concentrazioni su PE-Xb e PP-R.

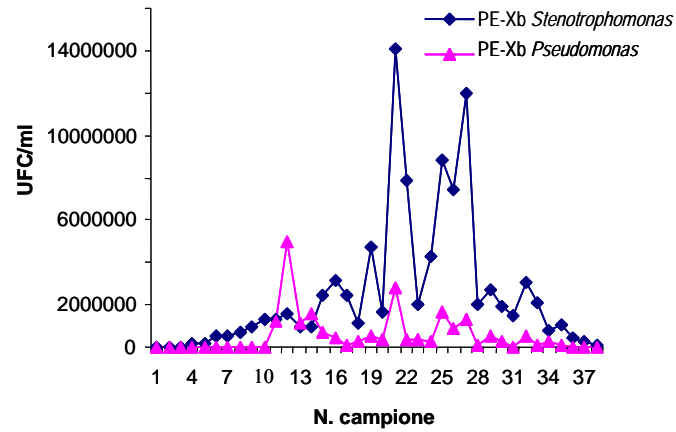


Figura 4. Andamento delle concentrazioni di *S. maltophilia* e *P. aeruginosa* nel biofilm prodotto sulle superfici dei tubi di PE-Xb

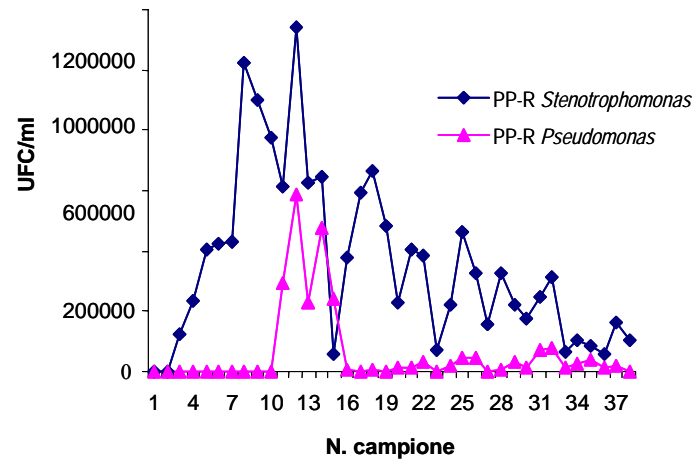


Figura 5. Andamento delle concentrazioni di *S. maltophilia* e *P. aeruginosa* nel biofilm prodotto sulle superfici dei tubi di PP-R

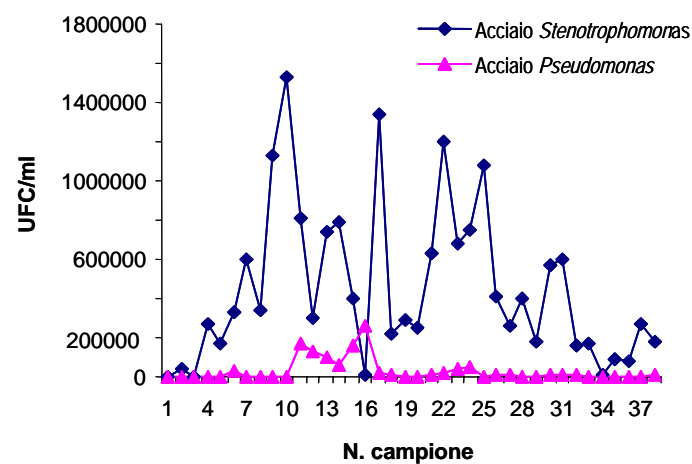


Figura 6. Andamento delle concentrazioni di *S. maltophilia* e *P. aeruginosa* nel biofilm prodotto sulle superfici dei tubi di acciaio

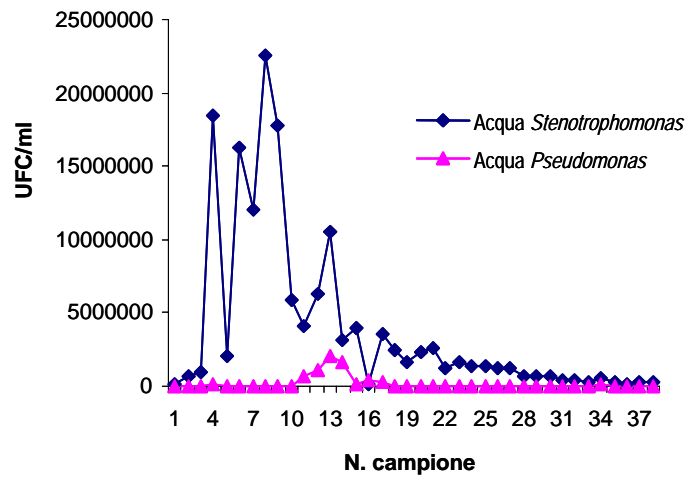


Figura 7. Andamento delle concentrazioni di *S. maltophilia* e *P. aeruginosa* nei campioni di acqua

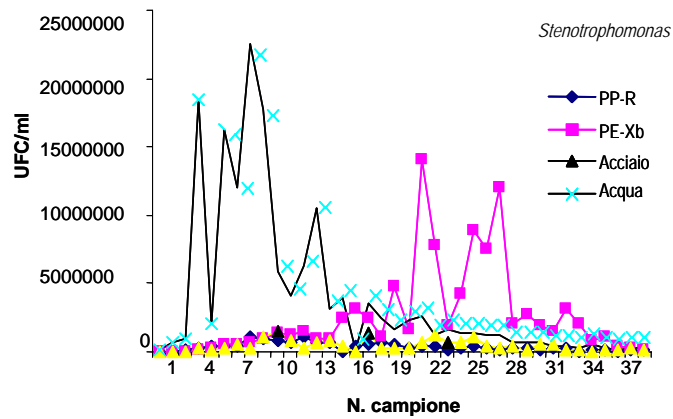


Figura 8. Andamento delle concentrazioni di *S. maltophilia* nel biofilm prodotto sulle superfici dei tubi dei tre materiali selezionati e nei campioni di acqua

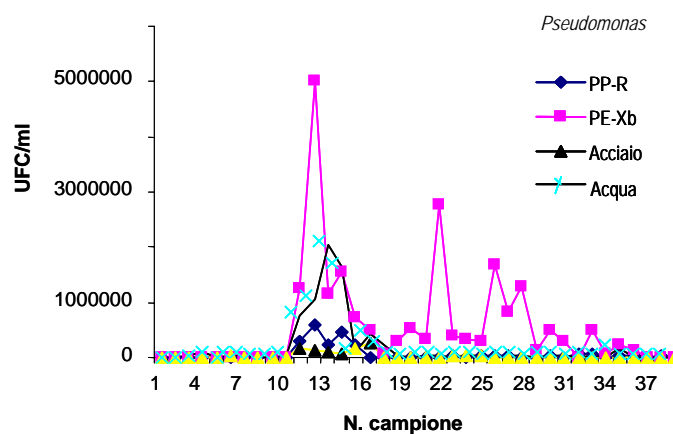


Figura 9. Andamento delle concentrazioni di *P. aeruginosa* nel biofilm prodotto sulle superfici dei tubi dei tre materiali selezionati e nei campioni di acqua

Fase 3: conteggio delle colonie a 22 °C in condizioni dinamiche

Nella Figura 10 sono riportati i risultati delle analisi relative alla determinazione del conteggio delle colonie a 22 °C nel biofilm formato sulla superficie interna del tubo in PE-Xb e nei campioni di acqua prelevati dal rubinetto.

Nelle due matrici, l'andamento delle concentrazioni microbiche risulta relativamente concordante nel tempo. Tuttavia, concentrazioni microbiche più elevate, fino ad un ordine di grandezza superiore, sono state rilevate nel biofilm, rispetto all'acqua. È stata comunque osservata, all'inizio della fase di studio, una tendenza spiccatamente variabile delle concentrazioni con una diminuzione a partire dalla quinta settimana. È comunque importante evidenziare che le concentrazioni microbiche più elevate nel biofilm (1×10^5 UFC/ml e 6×10^4 UFC/ml) sono state rilevate parallelamente a quelle più alte nell'acqua (4×10^4 UFC/ml e 3×10^4 UFC/ml).

Tuttavia, i risultati, valutati con il test U di Mann-Whitney, hanno dimostrato che non vi era una differenza statisticamente significativa tra le mediane delle concentrazioni microbiche nel biofilm sviluppato su PE-Xb e quelle riscontrate nei campioni di acqua.

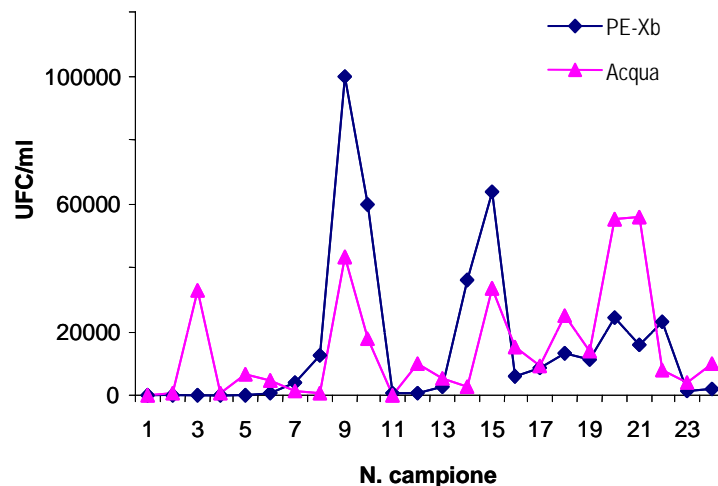


Figura 10. Andamento delle concentrazioni del parametro conteggio delle colonie a 22 °C nel biofilm prodotto su PE-Xb e nei campioni di acqua

Determinazione dell'ATP in condizioni dinamiche

Nelle Figure 11 e 12 sono riassunti rispettivamente, i risultati della determinazione dell'ATP nel biofilm prodotto sulla superficie del tubo di PE-Xb e dell'ATP libero e totale determinato nell'acqua.

I valori di ATP determinati nel biofilm prodotto sulla superficie del tubo di PE-Xb erano più elevati rispetto a quelli dell'ATP misurato nell'acqua. L'andamento dei valori è stato, come osservato anche nelle determinazioni effettuate per lo stesso parametro misurato nella fase statica, ampiamente discontinuo e, per l'ATP quantificato nel biofilm, misure più elevate sono state rilevate a partire dalla quarta settimana di studio. Tuttavia, era evidente anche una tendenza a un progressivo aumento rispetto alle fasi iniziali, diversamente da quanto osservato durante la prima fase di studio per le concentrazioni microbiche presenti nel biofilm dei tubi dello stesso

materiale. I valori ottenuti erano dell'ordine di 10^4 RLU/cm² e paragonabili, dal punto di vista quantitativo, a quelli rilevati sullo stesso materiale in condizioni statiche (10^4 RLU/cm²), anche se, in questa fase, con una tendenza a mantenersi più bassi.

Le misure di ATP libero e totale relative alle analisi eseguite sui campioni di acqua hanno fornito valori più bassi di almeno un ordine di grandezza rispetto a quelli rilevati durante lo studio in fase statica. Dalle determinazioni dell'ATP libero sono stati ottenuti valori sostanzialmente piuttosto costanti, anche se, sebbene in accordo a quanto osservato nella prima fase dello studio, particolarmente bassi (10^1 RLU/cm²).

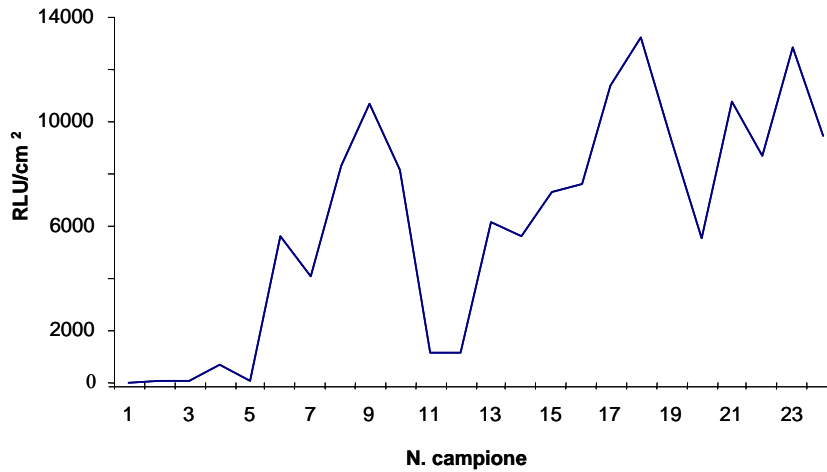


Figura 11. Andamento dei valori di ATP determinati nel biofilm sviluppato sulla superficie dei tubi di PE-Xb

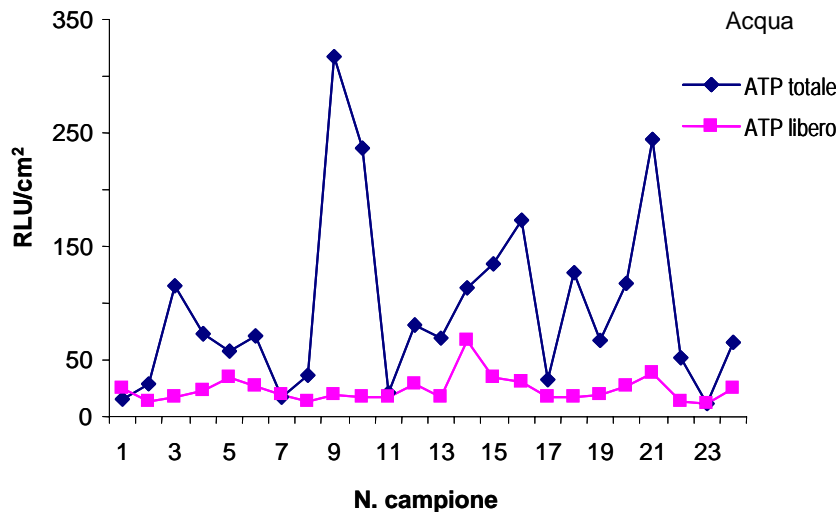


Figura 12. Andamento dei valori di ATP determinati nei campioni di acqua

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In tutti i sistemi di distribuzione dell'acqua potabile si trovano condizioni favorevoli allo sviluppo di biofilm. Infatti, è riconosciuto che tra i fattori correlati all'aumento della capacità di sopravvivenza dei microrganismi (incapsulazione, modifiche fenotipiche) nelle acque, soprattutto quelle clorate, sicuramente il meccanismo più comunemente adottato dai microrganismi per sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli è quello di aderire a superfici e partecipare alla formazione di biofilm.

Al momento attuale, è noto che i più comuni, e numericamente prevalenti, organismi presenti nei biofilm sono batteri eterotrofi non patogeni, spesso appartenenti alla comune flora microbica delle acque. Alcuni di essi possono causare problemi di ordine operativo nel sistema (corrosione, ostruzioni delle condotte) e modifiche delle caratteristiche organolettiche delle acque in distribuzione alterando sapore e odore e impartendo cambiamenti della colorazione dell'acqua.

La presenza di organismi eterotrofi nelle acque potabili in rete forniscono comunque anche il segnale della potenziale presenza di altri microrganismi, indicatori e patogeni, che sono stati in grado sia di superare le barriere sanitarie sia di sopravvivere ai processi di trattamento e di disinfezione delle acque.

È noto, ad esempio, che *E. coli*, indicatore di contaminazione fecale, è in grado di sopravvivere nell'acqua disinfettata e che, sebbene per pochi giorni, è rilevabile nei biofilm. Diversamente è stato osservato che *Legionella*, *Mycobacterium* e *Campylobacter*, potenziali responsabili di patologie trasmesse attraverso l'acqua, possono mantenersi vitali per 1-2 settimane. È evidente quindi che *E. coli* non possa essere considerato un idoneo indicatore di patogeni nel biofilm.

Tra i patogeni idrodiffusi, *Legionella pneumophila*, insieme a *Pseudomonas* e ad alcuni eterotrofi ambientali opportunisti patogeni, è il microrganismo spesso maggiormente riscontrato nei sistemi di distribuzione delle acque potabili. In ambienti particolarmente a rischio, quali ospedali, case di cura, case di riposo per anziani, dove i soggetti ricoverati od ospitati possono manifestare compromissioni anche gravi del sistema immunitario, la rete di distribuzione dell'acqua potabile può quindi diventare una delle maggiori fonti di infezione proprio per la sua capacità di costituire una riserva, non solo di patogeni, ma anche di patogeni opportunisti.

Quantità sufficienti di nutrienti sono sempre normalmente presenti nell'acqua potabile in distribuzione. È per questo che la presenza di carbonio organico disciolto biodegradabile nelle acque potabili distribuite attraverso la rete idrica diventa uno dei fattori che contribuiscono allo sviluppo di biofilm sulle superfici interne delle tubature, delle condotte e dei componenti del sistema (valvole, rompigetti). Inoltre, anche caratteristiche strutturali e composizione dei materiali, nonché il rilascio di elementi costitutivi delle strutture, la temperatura, la velocità di flusso e la pressione dell'acqua nei tubi sono condizioni che sostengono lo sviluppo di questi fenomeni nei sistemi di distribuzione. Inoltre è noto che, anche in presenza di una concentrazione di cloro residuo libero non si è in grado di controllare lo sviluppo di biofilm e quindi di eliminare i microrganismi che partecipano allo sviluppo della sua struttura.

Di conseguenza, poiché microrganismi patogeni o opportunisti patogeni possono sopravvivere nei biofilm, e ritrovarsi nel flusso di acqua in relazione al ciclo di sviluppo del biofilm, possono anche raggiungere i rubinetti dei consumatori e potenzialmente essere causa di infezioni o malattie soprattutto in soggetti immunodepressi, ospedalizzati e con ridotte difese immunitarie. In questo tipo di ambienti spesso proprio la vetustà del sistema idrico di distribuzione, la presenza di tratti ciechi e le difficoltà di bonificare gli impianti, rendono

improbabile l'eradicazione permanente delle nicchie di proliferazione microbica. Infatti, è noto che, anche dopo risanamento e ripristino di condizioni idonee della qualità dell'acqua, può verificarsi, anche a breve distanza di tempo, un ripetuto peggioramento delle sue caratteristiche igieniche.

Per lo svolgimento di analisi, il campionamento *in situ* di biofilm nei sistemi di distribuzione dell'acqua potabile presenta numerosi ostacoli. Quindi, per il suo studio, si fa spesso uso di sistemi di simulazione che ripropongono condizioni più favorevoli alle indagini da eseguire.

È ciò che è stato realizzato nello studio descritto che ha riguardato la verifica dell'andamento delle concentrazioni del parametro conteggio delle colonie a 22 °C e delle specie *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* in condizioni controllate, in acqua e biofilm sviluppati sulle superfici di tubi utilizzati comunemente per il trasporto e la distribuzione di acque potabili.

Nel nostro studio, i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che il biofilm si sviluppa rapidamente (entro tre giorni) su tutti i tre tipi diversi di materiali selezionati, polietilene reticolato, polipropilene e acciaio.

In ambiente statico, le concentrazioni microbiche dei microrganismi coltivati a 22 °C e rilevati nel biofilm hanno raggiunto mediamente valori più elevati (dell'ordine di 10^6 UFC/ml) rispetto all'acqua (valore massimo 6×10^5 UFC/ml) in cui gli elementi erano mantenuti in condizione di stagnazione. In questa fase sono state simulate condizioni in cui l'acqua nelle tubature permane senza fluire (es., bracci morti della rete, stagnazione notturna nei tubi, permanenza in impianti idrici utilizzati in modo discontinuo, come si verifica nelle case di villeggiatura). La persistenza sulle superfici sembrava seguire un andamento abbastanza irregolare che, ciclicamente, alternava fasi di aumento/diminuzione delle concentrazioni dei microrganismi. In gran parte dei casi, è stato osservato che le concentrazioni microbiche potevano, sebbene in misura ridotta, differenziarsi in funzione del tipo di materiale su cui il biofilm era prodotto, tendendo a ridursi lentamente nel tempo, probabilmente in relazione a fenomeni di competizione microbica e di carenza dei nutrienti.

In questo primo caso, quindi, i tre tipi di tubi tendevano a mostrare la stessa capacità di favorire lo sviluppo di biofilm, sebbene, in acqua le concentrazioni microbiche mostrassero una tendenza a ridursi più lentamente nel tempo.

In questa fase, la misura delle concentrazioni di ATP rilevate nel biofilm adeso su ciascuno dei tre tubi confermava l'andamento riscontrato con il metodo di conteggio diretto delle colonie sebbene non sia possibile stabilire una correlazione tra i valori ottenuti con i due metodi.

La determinazione dell'ATP totale e libero nell'acqua ha fornito una coerente indicazione dell'evoluzione della popolazione microbica presente, con valori più elevati di ATP totale che rappresenta la misura della quantità totale di ATP (in soluzione e legato alle cellule) nell'acqua e concentrazioni più basse di ATP libero che equivalgono al solo ATP libero in soluzione.

Nella seconda fase dello studio, durante la quale le specie *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas aeruginosa* sono state inoculate nel serbatoio contenente acqua in condizione di stagnazione e i tubi dei tre materiali selezionati, è stata rilevata una significativa differenza nell'adattamento e persistenza dei due microrganismi nel biofilm prodotto sulle superfici.

S. maltophilia ha fornito valori di concentrazione costantemente più alti su tutti i materiali indagati con differenze significative di un ordine di grandezza rispetto a *P. aeruginosa*. Infatti, *Stenotrophomonas* ha raggiunto concentrazioni dell'ordine di 10^7 UFC/ml su PE-Xb che erano anche 2 volte superiori rispetto a *Pseudomonas* su PP-R e circa 7 volte maggiori nel biofilm sviluppato su acciaio.

È ipotizzabile che *S. maltophilia*, microrganismo di origine ambientale facente parte della flora autoctona delle acque, possa rappresentare un colonizzatore dei biofilm con maggiori capacità di adattamento rispetto a *Pseudomonas*, probabilmente per una maggiore attitudine a

sopravvivere in acque oligotrofe e sebbene sia noto che quest'ultimo sia comunque molto versatile e resistente nell'ambiente. I risultati ottenuti sembrano concordare con quanto ottenuto in uno studio (38) in cui *S. maltophilia* si è dimostrato capace di aderire a diversi tipi di materiale plastico; l'adesione a questi materiali carichi negativamente era dovuta alla carica positiva manifestata da questa specie a pH fisiologico.

Durante questa fase dello studio, è apparso anche evidente che entrambe le specie microbiche si sviluppavano nel biofilm formato su PE-Xb in misura superiore rispetto agli altri due materiali selezionati, anche se era comunque il biofilm cresciuto sull'acciaio quello che mostrava concentrazioni più basse dei due microrganismi rispetto agli altri due materiali.

Altri studi (24, 39) hanno dimostrato che i materiali in plastica rappresentano siti più adatti all'adesione microbica rispetto a materiali come acciaio e rame. Inoltre, sembrerebbe che la formazione di biofilm sull'acciaio richieda tempi più lunghi rispetto ai materiali in plastica.

Le elevate concentrazioni microbiche nei biofilm formati su tubi di plastica possono essere attribuite al rilascio, nel mezzo acquoso, di sostanze utili alla crescita microbica. Infatti, le plastiche, generalmente, contengono additivi chimici come antiossidanti, stabilizzatori, lubrificanti, pigmenti e plasticizzanti, addizionati per migliorare le proprietà fisiche e chimiche della struttura e, rilasciando fosforo, azoto e zolfo possono rappresentare una fonte di nutrimento per i microrganismi.

Anche nell'acqua in cui erano immersi i materiali i due microrganismi si sono comportati in maniera diversa. Se *S. maltophilia* ha raggiunto concentrazioni più elevate anche rispetto alla concentrazione del microrganismo nel biofilm cresciuto su PE-Xb, almeno nelle prime settimane di studio, le concentrazioni di *P. aeruginosa* nell'acqua non superavano valori di 2×10^6 UFC/ml a fronte di valori pari a 5×10^6 UFC/ml ottenuti su PE-Xb.

Nella terza fase dello studio sono state simulate condizioni ordinarie di utilizzo di un impianto idrico. Le analisi, in parallelo e contemporaneamente, sono state effettuate per la determinazione del parametro conteggio delle colonie a 22 °C nel biofilm prodotto sulla superficie interna di un tubo in PE-Xb e nell'acqua che lo attraversava. L'andamento delle concentrazioni microbiche è risultato, nelle due matrici, abbastanza concordante nel tempo. In particolare, una marcata coincidenza temporale è stata osservata in corrispondenza dei valori di concentrazione microbica più alti nel biofilm quando confrontate le due condizioni di simulazione (statica e dinamica). Infatti, in entrambe le fasi, le concentrazioni più alte sono state ottenute nel biofilm durante la terza settimana di studio. Inoltre, nel biofilm sono state rilevate concentrazioni microbiche più elevate, fino ad un ordine di grandezza, rispetto all'acqua. È interessante comunque osservare che, in condizioni dinamiche, le concentrazioni microbiche nel biofilm, come nell'acqua, si caratterizzavano per essere di almeno un ordine di grandezza inferiori rispetto alle concentrazioni ottenute nelle prove condotte in ambiente statico, a conferma che condizioni di stagnamento dell'acqua favoriscono, in misura maggiore, l'espressione di fenomeni di adesione e la persistenza dei microrganismi.

La determinazione dell'ATP può essere usata per ottenere una immagine istantanea del livello di concentrazione microbica nel sistema. Nei sistemi aperti, valori superiori a 1500 RLU/cm² segnalano l'esistenza di inadeguate condizioni di qualità dell'acqua. Nel caso in esame, i valori di ATP totale nell'acqua in uscita dal tubo di PE-Xb erano ben al di sotto di questi valori (concentrazione massima ottenuta 300 RLU/cm²), mentre il biofilm adeso alle superfici ha fornito risultati di due ordini di grandezza superiori, a conferma della sua caratteristica di consentire colonizzazioni e sviluppo di nicchie di moltiplicazione microbica.

Nel nostro studio sono emerse evidenti criticità nell'uso del polietilene reticolato (PE-Xb) che, probabilmente per le caratteristiche proprie del polimero, ha mostrato di sostenere in maggior misura rispetto agli altri materiali selezionati, polipropilene e acciaio, lo sviluppo di biofilm. Inoltre, condizioni di stagnazione dell'acqua in cui erano immersi i tubi dei materiali

selezionati hanno permesso ai microrganismi ricercati, colonie a 22 °C e *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, di raggiungere concentrazioni molto elevate nel biofilm, e significativamente più alte nel caso della determinazione delle colonie a 22 °C in condizioni di acqua statica rispetto ad acqua periodicamente fatta fluire nel tubo. D'altra parte, anche tra le due specie selezionate sono state osservate differenze significative. *S. maltophilia* ha mostrato di possedere capacità di moltiplicazione e persistenza maggiori nel biofilm rispetto a *P. aeruginosa*, confermandosi quindi un colonizzatore con maggiori capacità di adattamento, probabilmente per una maggiore idoneità a sopravvivere in acque oligotrofe.

Dai risultati ottenuti risulta quindi evidente che, per mantenere ad un livello accettabile lo sviluppo di biofilm, è necessario, primariamente, controllare e minimizzare l'attività microbica nei sistemi di distribuzione dell'acqua anche in considerazione dell'introduzione all'uso di nuovi materiali che possono, rispetto ad altri, sostenere condizioni più favorevoli alla produzione di biofilm microbici e in considerazione dei tempi ridotti in cui queste strutture si possono formare all'interno di una tubatura. Una bonifica e una rimozione dei biofilm da sistemi di distribuzione dell'acqua dovrebbe essere condotta con sistematicità, soprattutto in quelli ambienti a rischio dove l'aerosolizzazione di acqua del rubinetto contenente microrganismi di scarsa rilevanza sanitaria in una popolazione sana può invece rappresentare un rischio per la salute per soggetti con ridotte difese immunitarie. In questi casi, in corrispondenza della rubinetteria e dei soffioni delle docce, sistemi meccanici quali l'uso di tamponi di poliuretano o di dispositivi per la produzione di aria-acqua compressa potrebbero risultare appropriati per la rimozione di biofilm.

Ai fini preventivi, alcuni interventi, che potrebbero garantire condizioni di buona manutenzione degli impianti e caratteristiche di buona qualità dell'acqua, possono essere comunque facilmente eseguiti anche dalle utenze private con l'eliminazione periodica delle incrostazioni e del sedimento dai diffusori delle docce e dai rompiflusso dei rubinetti. È anche sempre buona norma quella di far fluire acqua dai rubinetti, per qualche minuto, prima di consumarla, non solo dopo periodi prolungati di mancato utilizzo, ma anche dopo il periodo notturno. Infatti, negli intervalli di inattività degli impianti domestici si realizzano condizioni di stagnamento di acqua nei tubi che promuovono sia la concentrazione di composti di natura chimica sia quei meccanismi di aggregazione e adesione microbica che caratterizzano i biofilm.

BIBLIOGRAFIA

1. Commissione Economica Europea, Dipartimento Ambiente. *Will the tap run dry?* ECE/ENV/97/5; 1997.
2. WHO. *Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first addendum. Volume 1 – Recommendations*. Geneva: World Health Organization; 2006.
3. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.
4. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2002, n. 27. Modifiche ed integrazioni al Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31, recante attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 58, 9 marzo 2002.
5. Europa. European Union 1998 Council Directive 98/83/EC. On the Quality of Water Intended for Human Consumption. *Official Journal of the European Communities*, 5 December, L330/32 L330/53.
6. Hunter PR. *Waterborne disease: Epidemiology and Ecology*. Chichester, UK: Wiley; 1997.
7. Ferguson CM, Coote BG, Ashbolt NJ, Stevenson IM. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Wat Res* 1996;30:2045-54.
8. Momba MNB, Kfir R, Venter SN, Cloete TE. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA* 2000;1:59-66.
9. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881-90.
10. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002;295:1487.
11. Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M, and Kjelleberg S. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 2003;185:4585-92.
12. Wimpenny J. An overview of biofilms as functional communities. In: Allison D, Gilbert P, Lappin-Scott H, Wilson M (Ed.). *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge: University Press; 2000. p. 1-24.
13. Decho AW. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 1990;28:73-154.
14. Costerton JW, Stewart PS. Combattere i biofilm. *Le scienze* 2001;396:87-93.
15. Marshall KC. *Interfaces in Microbial Ecology*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1976.
16. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003;50:61-8.
17. Yildiz FH, Schoolnik GK. *Vibrio cholerae* O1 el Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1999;96:4028-33.
18. Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13(1):20-6.
19. Bendinger B, Rijnaarts HHM, Altendorf K, Zehnder AJB. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3973-7.

20. Fletcher M. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol* 1988;170:2027-30.
21. Danielsson A, Norkrans B, Bjornsson A. On bacterial adhesion – the effect of certain enzymes on adhered cells in a marine *Pseudomonas* sp. *Bot Marina* 1977;20:13-7.
22. Block JC. Biofilms in potable water distribution systems. In: Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (Ed.). *Biofilms: Science and Technology*. May 18-29, Alvor, Portugal, Kluwer Academic Publishers, London; 1992. p. 469.
23. Geldreich EE. *Microbial quality of water supply in distribution systems*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1996.
24. Lehtola MJ, Miettinen IT, Keinanen MM, Kekki TK, Laine O, Hirvonen A, Vartiainen T, Martikainen PJ. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Wat Res* 2004;38:3769-79.
25. Le Chevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:2492.
26. Paquin JL, Block JC, Haudidier K, Hartemann P, Colin F, Miazga J, Levi Y. Effect of chlorine on the bacterial colonisation of a model distribution system. *Rev Sci Eau* 1992;5:399.
27. Batté M, Appenzeller BMR, Grandjean D, Fass S, Gauthier V, Jorand F, Mathieu L, Boualam M, Saby S and Block JC. Biofilms in Drinking Water Distribution Systems. *Rev Environ Sci Biotech* 2003; 2:147-68.
28. LeChevallier MW, Lowry CD, Lee RG. Disinfecting biofilms in a model distribution system. *J Amer Wat Works Ass* 1990;82:87-99.
29. Wingender J, Gobe S, Fiedler S, Flemming HC. The effect of extracellular polysaccharides on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chlorine and hydrogen peroxide. In: *Biofilms in the aquatic environment*. Keevil CW, Godfree A, Holt D, Dow C (Ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1999.
30. Italia. Decreto legislativo 4 aprile 2004, n. 174. Regolamento concernente i materiali e gli oggetti che possono essere utilizzati negli impianti fissi di captazione, trattamento, adduzione e distribuzione delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 166, 17 luglio 2002.
31. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia. *Microbiol Rev* 1996;60:539-74.
32. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1980;28:546-56.
33. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rew* 1998;11(1):57-80.
34. Suilen JG, Pittet D. *Stenotrophomonas maltophilia*: situazione attuale in ambiente ospedaliero. *Swiss-NOSO* 1999;6(3):1-6.
35. Bottone EJ, Reitano M, Janda JM, Troy K, Cuttner J. *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as a correlate in pathogenesis of ecthyma gangrenosum. *J Clin Microbiol* 1986;24:995-7.
36. Janda JM, Bottone EJ. Pathogenic properties and enzyme profiles of *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. In: Gilardi GL (Ed.). *Non-fermentative gram-negative rods: laboratory identification and clinical aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y; 1985. p. 233-54.
37. Bonadonna L, Ottaviani M. *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL. vo 31/2001. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/5).

39. Kerr KG, Anson J, Hawkey PM. *Adherence of clinical and environmental strains of Xantomonas maltophilia to plastic material*, abstr. B-339. In: Abstract of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology 1994. American Society for Microbiology, Washington, D.C; 1994.
40. Schwartz T, Hoffmann S, Obst U. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Wat Res* 1998;32(9):2787-97.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, luglio-settembre 2008 (n. 3) 2° Suppl.