

Indicatori di qualità microbiologica delle acque: problemi e prospettive

A. Nusca*, D. D'Alessandro**, E. Funari*

Parole chiave: Microrganismi indicatori, contaminazione acque superficiali, qualità delle acque

Key words: Indicator microorganisms, surface water contamination, water quality

Riassunto

Indicators of water microbial pollution: current and prospects

Conventional indicators of fecal contamination provide a precious contribution in evaluating water microbiological quality. In recent years some important issues have sprung up which have risen doubts about their reliability and have suggested a revision of their function.

In developed countries, where the law regarding water quality is very strict, there have been several outbreaks, even though conventional indicators of fecal pollution pointed an appropriate microbiological quality. These outbreaks have been imputed to new pathogenic microorganisms which are often characterized by a great resistance to disinfection treatments than conventional indicators.

In order to obtain an appropriate microbiological quality of waters, various approaches have been started such as the Water Safety Plans by World Health Organization the revision of the functions of suitable indicators (of the water quality), the setting up of specific methods either for pathogen microorganisms and for a quick surveying of an inadequate microbiological water quality,

Introduzione

Gli indicatori microbiologici hanno un ruolo fondamentale nella conoscenza dello stato igienico sanitario e di allerta su eventuali fenomeni accidentali di contaminazione delle acque. Nei Paesi più sviluppati, sono stati predisposti dispositivi normativi molto severi per la prevenzione delle patologie trasmesse con le acque. Con l'introduzione delle tecniche di disinfezione e la misura della qualità microbiologica delle acque,

attraverso la conta di indicatori di contaminazione fecale, si è ritenuto di aver raggiunto, in modo piuttosto conclusivo, il controllo di questo importantissimo problema di carattere sanitario, che in molti paesi in via di sviluppo, ancora oggi, è responsabile di una quota considerevole di morbosità e mortalità.

Negli ultimi decenni si sono verificate diverse epidemie associate al consumo di acqua potabile anche nei Paesi più sviluppati. A tal proposito deve essere sottolineato che, in tali Paesi, la qualità microbiologica dell'acqua

* Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

** Dipartimento di Architettura ed Urbanistica per l'Ingegneria, Sapienza Università di Roma

era risultata conforme ai limiti stabiliti dalle rispettive normative. Si possono citare al riguardo: un'epidemia di criptosporidiosi nel 1993 a Milwaukee, Wisconsin (Stati Uniti), durante la quale oltre 100 persone morirono e circa 400.000 furono colpite da disturbi gastrointestinali (36); epidemie attribuite ad *E. coli* O157:H7, come quella dell'anno 2000 a Walkerton, Ontario (Canada), che causò oltre 2300 casi di gastroenteriti e la morte di 6 persone (40); 116 epidemie associate al consumo di acqua potabile, attribuite a contaminazioni da *Campylobacter* sp. e *Giardia lamblia*, che interessarono complessivamente 57.500 persone, in Svezia, nel periodo 1980-1999 (2).

Questo fenomeno sembra in evoluzione a causa di vari fattori, tra i quali (47):

- lo sviluppo di microrganismi patogeni emergenti, in particolare quelli resistenti al cloro ed agli antibiotici;
- l'aumento dell'impatto antropogenico sulla risorsa acqua e dell'immigrazione;
- i cambiamenti climatici.

Sono numerosi i microrganismi patogeni emergenti, tra i quali vengono inclusi: calicivirus, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter* sp., il complesso *Mycobacterium avium* (MAC), i protozoi *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp. e *Toxoplasma* sp. (69).

Alla luce di queste considerazioni, il giudizio di qualità microbiologica di un'acqua, espresso esclusivamente dai microrganismi indicatori convenzionali di contaminazione fecale, mostra evidenti limiti. Per superare tali limiti, sono state intraprese due principali tipologie di iniziative.

Da un lato sono stati elaborati approcci più evoluti rispetto al semplice controllo della qualità microbiologica basata sulla valutazione di alcuni indicatori di contaminazione fecale. Questo tipo di approccio, oltre a quanto sopra evidenziato, mostra almeno altri due limiti: i risultati delle analisi di un campione non si ottengono in tempo reale, sulla base delle analisi di routine, ma

richiedono tempi misurabili in giorni. In tal modo non è possibile prevenire esposizioni che si verificano all'interno di questo intervallo temporale. Le analisi microbiologiche vengono spesso effettuate senza un'adeguata conoscenza delle possibili occasioni di contaminazione dell'acqua e della sua natura. L'approccio più evoluto attualmente disponibile è il *Water Safety Plan*, proposto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per il controllo delle acque potabili (70). Si tratta di un approccio integrato, olistico, che richiede una conoscenza del ruolo delle possibili sorgenti di contaminazione, l'individuazione delle maggiori criticità dell'intero sistema (dalla captazione al trattamento ed alla distribuzione), la definizione delle misure necessarie per controllare i rischi individuati e garantire il raggiungimento/mantenimento della qualità adeguata; l'elaborazione di piani di gestione in condizioni normali o di emergenza.

Dall'altro lato, è stata avviata un'attività di rivisitazione della reale rappresentatività dei microrganismi indicatori, per individuare quelli che meglio mettono in correlazione la qualità microbiologica con i possibili effetti sanitari. Gli studi epidemiologici disponibili sono stati estremamente utili al riguardo. Ad esempio, quelli condotti sulle acque di balneazione mostrano che gli indicatori a più elevato grado di correlazione sono gli enterococchi intestinali, mentre per le acque interne risultano ben correlati sia enterococchi che *E. coli*.

La nuova Direttiva Europea sulle acque di balneazione 2006/7/CE del 15.2.2006 (17) è basata sulle precedenti considerazioni e classifica queste acque in tre categorie sulla base dei valori di detti indicatori (Tabella 1). Nella direttiva precedente erano compresi altri parametri microbiologici, che mostrano evidenti limiti di rappresentatività. I coliformi fecali, ad esempio, possono essere isolati da ambienti privi di contaminazione fecale (acque derivate da industrie alimentari,

biofilm della rete di distribuzione, ecc.). Si moltiplicano nelle acque grigie con scarsa sostanza organica, sopravvivono e possono diventare flora normale nelle acque dolci temperate e tropicali, non fornendo quindi dati particolarmente utili di correlazione con patogeni e patologie (45).

E. coli, sebbene con livelli di concentrazione (ufc/ml) diversi, rappresenta un importante parametro di riferimento. Peraltro è presente nella normativa relativa alle acque

destinate al consumo umano, a quelle per uso irriguo ed a quelle di scarico (Tabella 1).

Nel caso delle acque destinate alla vita dei molluschi, il DLgs 152/2006 (13) utilizza come indicatore i coliformi fecali, definendo un limite di 300 ufc per 100 ml nella polpa dei molluschi e nel liquido intervalvare. Tale eccezione potrebbe essere interpretata come la richiesta indiretta di una presenza estremamente ridotta di microrganismi fecali nelle acque (*E. coli* incluso), tenendo conto

Tabella 1 - Indicatori microbiologici riportati nella normativa di settore e relativi valori di riferimento

Riferimento normativo	Tipologie di acque	Parametro/requisito richiesto				
		Enterococchi intestinali	<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliformi fecali	Salmonella
Direttiva del Parlamento europeo 2006/7/CE (17)	Balneazione (Acque costiere)	100 ufc/100ml ^(a)	250 ufc/100ml ^(a)			
		200 ufc/100ml ^(b)	500 ufc/100ml ^(b)			
		185 ufc/100m ^(c)	500 ufc/100ml ^(c)			
DLgs n. 31/2001 (14)	Acque destinate al consumo umano	0 ufc/100ml	0 ufc/100ml	(d)		
DLgs 152/2006 (13)	Acque destinate alla vita dei molluschi				≤ 300 ufc/100ml nella polpa dei molluschi e nel liquido intervalvare	
DM n.185/2003 (15)	Acque ad uso irriguo		100 ufc/100ml (80% dei campioni) con un valore massimo 1000 ufc/100m			assente
Decreto legislativo n.152/2006 (13)	Acque di scarico limiti emissione in acque superficiali		≤5000 ufc/100ml			

(a) qualità eccellente (basata sulla valutazione del 95° percentile).

(b) qualità buona (basata sulla valutazione del 95° percentile).

(c) qualità sufficiente (basata sulla valutazione del 90° percentile).

(d) *Clostridium perfringens* (spore compresse) necessario solo se le acque provengono o sono influenzate da acque superficiali.

della nota ed elevata capacità di concentrazione dei microrganismi, svolta dagli stessi molluschi.

Sulla base di quanto appena descritto, sono state avviate iniziative di ricerca verso indicatori alternativi quali: anaerobi fecali sporigeni (es: *Clostridium perfringens*); anaerobi fecali non sporigeni (es: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*); virus (fagi specifici del *B. fragilis*, colifagi FRNA); composti organici (es.: coprostanolo). Inoltre, per confermare la provenienza umana della contaminazione, sono state proposte sostanze chimiche come caffeina, surfattanti ed agenti sbiancanti (noti come *Fluorescence White-ning Agent - FWA*) (56).

Allo stato attuale pochi studi riportano correlazioni fra indicatori convenzionali e indicatori fecali alternativi (25, 43, 48, 57, 59).

Il presente lavoro propone un quadro aggiornato del problema, ponendo particolare attenzione alle potenzialità ed ai limiti di ciascun indicatore alternativo, nonché alla correlazione tra questi ed i patogeni.

Indicatori fecali previsti dalla normativa vigente

I batteri indicatori fecali (FIB) non sono patogeni, ma se rilevati ad elevate concentrazioni, esprimono la probabile presenza di agenti infettivi, dunque la probabilità di contrarre un'infezione.

Un indicatore di contaminazione fecale per poter esplicare tale funzione deve possedere alcune caratteristiche (27) quali:

- elevata densità nelle feci;
- incapacità di riprodursi e/o moltiplicarsi al di fuori dell'ambiente intestinale;
- buona correlazione con i microrganismi patogeni;
- validità per tutti i tipi di acque;
- rilevabilità con semplici metodologie di laboratorio,
- non patogenicità.

Identificare ogni singolo microrganismo patogeno ed esprimerne la concentrazione non è di facile esecuzione: la presenza saltuaria ed incostante non può essere oggetto di valutazione diretta, se non con un controllo analitico specifico. Per questo motivo, la *routine* microbiologica è basata e si basa ancora su microrganismi indicatori – ospiti abituali dell'intestino – che condividono lo stesso *habitat* dei microrganismi patogeni.

Gli indicatori convenzionali presentano comunque molte limitazioni, che dovrebbero essere colmate per rendere i risultati più affidabili: limitato tempo di sopravvivenza, possibile provenienza non fecale (57, 59), capacità di riprodursi nella colonna d'acqua (16, 62), bassa resistenza ai processi di disinfezione (27), incapacità di identificare sorgenti di contaminazione fecale e bassa sensibilità ai mezzi di rilevamento (26, 67).

E. coli è da tempo usato come indicatore d'inquinamento fecale, in quanto mostra buone caratteristiche di sopravvivenza soprattutto nelle acque dolci e si ritrova in concentrazioni più elevate di quelle dei patogeni. Tuttavia, numerosi autori non lo considerano più un indicatore affidabile, soprattutto per le acque con temperature più elevate (es.: acque tropicali e sub tropicali), dove potrebbe acquisire caratteristiche genetiche tali da renderlo un batterio abituale (16).

All'interno di una singola specie ci sono membri o sottogruppi che si adattano alle condizioni di vita di un nuovo ospite o ambiente (es.: differenze di pH, di nutrienti e recettore specifici); i membri della progenie derivati dalle successive replicazioni, una volta adattati e trovata la propria nicchia ecologica, acquisiscono un'impronta genetica (*fingerprint*) identica tra loro, ma diversa dagli organismi della stessa specie, adattati ad ospiti di ambienti differenti (57). Grazie alle nuove metodologie di biologia molecolare è possibile caratterizzare i gruppi di microrganismi indicatori e rilevare in tal

modo le sottili differenze che consentono di risalire all'ospite (57).

Anche gli Enterococchi intestinali hanno ricevuto un ampio consenso come indicatori d'inquinamento fecale, in particolare per l'acqua di mare, dove il tempo di sopravvivenza è maggiore di quello dei coliformi. La loro disposizione a catena oppure a grappolo offre una certa protezione dai fenomeni della foto-ossidazione; mostrano anche una buona tolleranza nei confronti di ambienti marini, per ragioni non ancora del tutto chiarite. In generale questi microrganismi provengono da deiezioni di mammiferi a grande taglia – uomo incluso – e di animali a piccola taglia come gli uccelli. Negli ambienti tropicali sono in grado di replicarsi anche in zone non fecalmente contaminate (16).

Indicatori alternativi d'inquinamento fecale

Gli anaerobi fecali rappresentano una porzione significativa dei batteri presenti nell'intestino degli animali a sangue caldo (38,68), con concentrazioni medie di 10^{10} - 10^{11} ufc/g di feci (37). Sono molto sensibili all'ossigeno per motivi ancora sconosciuti. Una delle ragioni più accreditate sembra essere l'incapacità di detossificare H_2O_2 , $OH\cdot$, O_2^- che si formano dall'ossigeno durante il normale metabolismo (37).

Fra i vari generi anaerobi esistono comunque alcune specie in grado di tollerare questa sostanza: ad esempio *Bacteroides adolescentis* e *Bacteroides infantis* dimostrano una tolleranza intermedia, tanto da sopravvivere per 48 ore in aerobiosi; il genere *Bifidobacterium* ha invece evidenziato una sopravvivenza minore (51); in ambiente ossigenato *Clostridium perfringens* evidenzia una resistenza di circa 72 ore ed a volte anche maggiore (51).

Dal momento che gli anaerobi non sopravvivono a lungo nelle normali condizioni

di aerobiosi, l'isolamento in gran numero indica un recente e diffuso inquinamento.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens appartiene ad uno dei principali generi di batteri, dotati della capacità di produrre spore, definite anche endospore, perché formate all'interno del corpo batterico.

Le spore di *C. perfringens* si ritrovano in concentrazioni medie pari a $4,8 \times 10^5$ ufc/g di peso secco di feci umane, nonché suine (71). Nelle feci canine la loro concentrazione è più elevata (9×10^8 ufc/g di peso secco), mentre in quelle di altri animali (gatti, equini ed ovini, ecc.) è assai inferiore a quella delle feci umane (63). In alcuni animali a sangue caldo le spore risultano addirittura assenti. La carica rilevata nelle acque reflue è di circa 10^4 - 10^5 ufc/100 ml (12).

Le spore di *C. perfringens* sono estremamente resistenti agli stress ambientali, persistendo molto più a lungo dei coliformi termotolleranti e dei patogeni di origine idrica (12, 26). Per queste caratteristiche di resistenza, le spore di *C. perfringens* rappresentano un indicatore di contaminazione fecale per tutte le tipologie di acque. Sono state infatti usate con successo come indicatori nei corsi d'acqua, negli ambienti marini e nei sedimenti acquatici (27). Sono state proposte come indicatori nelle coste delle Hawaii, in sostituzione degli indicatori tradizionali (3), poiché temperatura e predatori influiscono poco significativamente sulla loro sopravvivenza e possono rimanere quiescenti per periodi molto lunghi (12, 26).

Inoltre *C. perfringens* è considerato un microrganismo ideale per valutare l'efficacia della disinfezione in un impianto di trattamento di acqua potabile (48). È stato anche proposto per predire la presenza di enterovirus (57) e di protozoi parassiti (14).

Rispetto ai vantaggi sopra espressi, l'uso di *C. perfringens*, come indicatore di contaminazione fecale, mostra alcuni limiti. Ad

esempio, il rilevamento di spore non permette di capire se l'inquinamento sia avvenuto o no di recente (16). Similmente ad altri indicatori alternativi, non sono disponibili studi epidemiologici per valutarne appieno la rappresentatività nei confronti dei microrganismi patogeni di origine fecale (56). Infine, i metodi classici di rilevamento, basati su colture, presentano ancora incertezze e laboriosità analitiche.

Bifidobacteria

Sono bastoncelli Gram-positivi, esigenti dal punto di vista nutrizionale, anaerobi obbligati, non formanti spore e rappresentano una componente consistente della flora intestinale, pari a circa 10^9 - 10^{11} ufc/g di feci (7). Sono stati proposti come indicatori di inquinamento fecale umano, perché solo raramente si trovano nelle feci animali (57).

Analisi, eseguite su feci provenienti dall'uomo e da un'ampia varietà di animali (scimmie, bovini, suini, ovini, canidi, equini), hanno rilevato infatti *Bifidobacterium sp.* solo in feci umane e suine (56,57).

I *Bifidobacteria* sono stati frequentemente isolati da liquami di origine umana ed in modo particolare dalle fosse biologiche (7, 50).

Durante i mesi estivi, nelle acque superficiali con una temperatura di 23° - 30° , sopravvivono circa 5-9 giorni; la sopravvivenza aumenta fino a circa 4 settimane a temperature intorno ai 10° (39, 42). Il breve periodo di sopravvivenza nei corpi idrici rappresenta un evidente limite.

L'alto livello dei predatori presenti nelle acque riduce la quantità di *Bifidobacterium sp.*, e l'alto livello di bastoncelli Gram-positivi e cocchi ne rende difficoltosa la rilevazione sul terreno di coltura. Pertanto è opportuno, anche nelle indagini di laboratorio, non superare le 3 ore tra il campionamento e la filtrazione (56), poiché un prolungamento dei tempi comporta una notevole riduzione di popolazione (50).

Gli isolati umani hanno la capacità di fermentare il sorbitolo, caratteristica utilizzata per differenziare *Bifidobacterium* da altri microrganismi di origine non umana (57). Tali batteri si riproducono solo in anaerobiosi, perciò la loro presenza nell'ambiente è indice di un inquinamento recente. Per il loro rilevamento, l'applicazione di tecniche come la PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e la RT-PCR (*Real-Time-PCR*) ha permesso di superare le difficoltà di coltivarli in condizioni anossiche (56); infatti basta una singola copia di un gene, per ottenere milioni di copie ed effettuare l'identificazione del batterio. Un gene molto utilizzato in questo tipo d'analisi è quello che codifica l'RNA ribosomiale 16S (21). L'uso di *primers* o sonde basati sulla sequenza del DNA ribosomiale (DNAr) ha permesso di identificare specie di *Bifidobacterium* anche da popolazioni miste, superando le difficoltà della caratterizzazione fenotipica (42).

Per questi microrganismi sono state utilizzate due sonde che hanno per target il gene dell'rRNA 16S: la sonda BDE, specifica per il gene che codifica l'rRNA 16S del *Bifidobacterium dentium*, specie esclusivamente umana, e la sonda BAN, specifica per specie di *Bifidobacterium* di origine animale, tra cui *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. globosum*, *B. magnum*, *B. minimum* e *B. subtilis* (42).

Similmente ai *Bacteroides*, i *Bifidobacteria* hanno specificità d'ospite ed una bassa sopravvivenza fuori dall'*habitat* intestinale. Saranno necessari studi più approfonditi per indagare sulla correlazione con i patogeni.

Bacteroides

I *Bacteroides sp* sono anaerobi obbligati, non formano spore e la loro presenza nell'intestino crasso è di circa 10^{10} - 10^{11} ufc/gr di feci; rappresentano 1/3 della flora fecale, superando abbondantemente i coliformi (25, 53). La maggior parte dei *Bacteroides* isolata

dalle feci umane è specifica dell'uomo e, di questa, solo una piccola parte si può ritrovare in altre specie animali (1). Nell'ambito del genere *Bacteroides*, alcune specie mostrano uno spiccato tropismo verso determinati ospiti. Tale peculiarità può essere sfruttata per identificare l'origine dell'inquinamento fecale, poiché permette di risalire prima alla specie di *Bacteriodes* e poi all'ospite specifico (32, 60).

In condizioni di stress di ossigeno *Bacteroides sp.* possono sopravvivere per circa 6 giorni (4), mentre il marker genetico 16SrRNA resiste più a lungo, in funzione della temperatura e della predazione (33). A temperature di 4° è stato possibile identificare *Bacterides sp.* dopo 15 giorni dallo sversamento in acqua (33).

Nelle acque dolci, durante il periodo estivo, Seurinick e collaboratori (58), utilizzando tecniche di PCR, hanno potuto osservare una rapida diminuzione della popolazione di *Bacteroides*: l'aumento della temperatura favorisce l'azione dei predatori ed i processi di degradazione. Inoltre è stato verificato che i marker di *Bacteroides* specifici per l'uomo possono sopravvivere in tali acque tra 4° e 12° per più di 24 giorni ed alla temperatura di 23° fino ad 8 giorni (58). La luce solare e la sostanza organica influiscono sulla sopravvivenza di questi microrganismi (52).

In passato l'uso di *Bacteroides sp.* come indicatore è stato limitato per le difficoltà riscontrate durante la coltivazione degli anaerobi stretti. Le tecniche molecolari attualmente disponibili permettono l'identificazione di batteri vitali non coltivabili e di quelli che hanno uno sviluppo difficile, fornendo una più accurata rappresentazione della popolazione presente (32).

Recentemente, alcune tecniche di biologia molecolare, che si basano sull'analisi dei polimorfismi genici, hanno permesso di differenziare *Bacteroides-Prevotella* di origine umana da quella di origine animale (5).

Il genere *Bacteroides* è un ospite numericamente elevato nell'intestino umano ed offre la possibilità di distinguere fra i due tipi di inquinamento per l'elevata specificità d'ospite; purtroppo finora sono stati condotti pochi studi sul suo possibile impiego come indicatore.

Savichtcheva e coll. (56) sostengono che sarà necessario approfondire la conoscenza sulla distribuzione geografica dei marker genetici di *Bacteroides* ospite specifici e sul grado di sopravvivenza in *habitat* secondari, per meglio comprendere la correlazione con i patogeni.

Gruppo del *Bacteroides fragilis*

Il termine "gruppo *Bacteroides fragilis*" rappresenta il gruppo di batteri anaerobi obbligati più diffuso nell'intestino umano. Comprende le specie *B. fragilis*, *B. thetaio-taomicron* e *B. distasonis* (55).

Rappresenta il 67-78% dei batteri presenti nelle feci umane, il 7-25% in quelle animali (32). Questi batteri mostrano una certa tollerabilità nei confronti dell'ossigeno, sopravvivendo solo pochi giorni, ma al di fuori del proprio *habitat* non sono in grado di moltiplicarsi. Hanno precise esigenze nutrizionali; la presenza del fago specifico nell'ambiente è sicuramente indice di contaminazione fecale.

Indicatori virali

Poiché gli indicatori tradizionali non sono in grado di evidenziare una presenza virale, Noble e Fuhrnam (43) sostengono la necessità di individuare virus in grado di svolgere questo ruolo. Il batteriofago del *Bacteroides fragilis* HSP40 e il colifago *F-RNA* sono stati proposti come indicatori della presenza di virus enterici, anche in considerazione del fatto che negli esami di laboratorio il numero dei fagi è circa dieci volte più alto di quello degli enterovirus (11, 65).

Il Batteriofago del Bacteroides fragilis

Il ceppo HSP40 ed il ceppo RYC2056 di *B. fragilis* sono stati isolati in concentrazioni elevate da feci umane. I rispettivi fagi B40-8 e B56-3 sono stati evidenziati in diverse matrici ambientali, nelle quali era stata accertata una contaminazione di origine fecale.

A conferma della specificità umana, già nel 1987 Tartera e Jofre (64) evidenziarono la presenza di *B. fragilis* in campioni di feci umane, positivi al ceppo HSP40, mentre il rispettivo fago non fu isolato da campioni di feci animali, né da reflui di mattatoi, né da acqua contaminata da fauna selvatica (57).

I fagi del *B. fragilis* si moltiplicano nel tratto intestinale umano in concentrazioni più elevate dell'*E. coli*; nelle acque superficiali, ad una temperatura tra i 5-25°, sopravvivono in modo comparabile e perfino migliore dei virus enterici (11, 65).

Inoltre sono più resistenti dei colifagi e dei batteriofagi *F-RNA* specifici all'inattivazione naturale. Esperimenti d'inattivazione su colture pure di batteriofagi hanno confermato che il fago B40-8 è più resistente del fago B56-3 e mostra un alto grado di specificità verso *B. fragilis* HSP40, non evidenziata nei confronti di altre specie di *Bacteroides* (19, 65).

B. fragilis HSP40 è stato rilevato con maggiore frequenza rispetto agli enterovirus in campioni d'acqua e di sedimenti (72 e 56% rispettivamente) (11, 65).

In generale i batteriofagi hanno il vantaggio di essere altamente specifici, permettendo di risalire alla sorgente d'inquinamento. Le particelle virali non sono in grado di replicarsi nell'ambiente e la loro presenza è significativamente correlata con virus umani.

Nelle acque molto inquinate l'assenza del fago può essere dovuta all'azione dei predatori. Questo aspetto, insieme alla laboriosità del metodo analitico, rappresenta un limite importante nell'uso di questi microrganismi come indicatori di contaminazione virale (57).

Necessitano pertanto ulteriori sviluppi metodologici, tenendo presente che le tecniche molecolari hanno dato un notevole contributo per una rapida individuazione (27).

Colifagi (F-specific RNA)

I colifagi sono virus che infettano e si replicano nell'*E. coli*; sono incapaci di riprodursi fuori del proprio ospite. La replicazione nell'ambiente è dunque in funzione della presenza e del numero del microorganismo ospitante.

Nelle feci umane ed animali la presenza di differenti e specifici gruppi di RNA colifagi permette di risalire all'origine dell'inquinamento e di stabilire se questo è di tipo umano o animale (57). Le ricerche analitiche hanno focalizzato l'attenzione sulla particella virale ed hanno verificato che il colifago *F-specific RNA* è dotato di caratteristiche tali da renderlo un promettente indicatore per lo studio della qualità delle acque (23, 24).

Si è giunti a questa conclusione in base alle analogie strutturali e genetiche che i colifagi *F-specific RNA* hanno con i virus enterici responsabili delle malattie di origine idrica. Al microscopio elettronico hanno dimostrato una forte somiglianza con i virus polio e coxackiae. Tali caratteristiche sono state il motivo principale per considerare i colifagi *F-specific RNA* potenziali indicatori di virus, più che indicatori d'inquinamento fecale (61).

Nelle acque superficiali (soprattutto in quelle dolci) hanno evidenziato una resistenza maggiore rispetto agli enterovirus (61) e poiché risultano resistenti ai trattamenti chimico-fisici di depurazione delle acque (disinfettanti e radiazioni UV), alcuni autori li hanno proposti come possibili indicatori per verificare il livello di inattivazione virale (31). In particolare, i ceppi MS2 ed i ceppi filamentosi f2 sopravvivono ai meccanismi depurativi naturali ed ai processi di trattamento delle acque reflue.

I colifagi sono relativamente sensibili alle alte temperature, vengono inattivati più rapidamente dei virus enterici in acqua di mare alla temperatura di 25° (11) e nelle acque dolci hanno una resistenza maggiore (23, 61). Le acque reflue sono una ricca sorgente di batteriofagi e di batteriofagi F-specifici: Havelaar et al. (23) hanno quantificato, durante il periodo estivo, conte da 10³- 10⁴ pfu/ml negli scarichi domestico-industriali e valori piuttosto simili sono stati trovati in reflui provenienti da ospedali e mattatoi (28).

Alcuni colifagi RNA F-specifici sono altamente associati ad una contaminazione fecale domestica o di altra origine (52, 57). Pertanto il loro ritrovamento in un'acqua può essere considerato un indice di inquinamento da liquami (28).

Poiché il numero dei batteriofagi è inferiore al numero degli indicatori batterici, è importante che la rilevazione sia sensibile ed includa procedure di arricchimento e di un'analisi diretta (57).

Composti chimici

Gli indicatori microbici convenzionali non sembrano adatti per rilevare l'inquinamento fecale in determinate condizioni. Ad esempio, nelle regioni tropicali e subtropicali, sono in grado di moltiplicarsi e possono entrare a far parte della flora naturale (18, 29, 30). Alcuni composti organici sono stati proposti in queste aree come possibili indicatori alternativi di contaminazione fecale (18, 29, 30).

Sono numerosi gli agenti chimici proposti come possibili indicatori di contaminazione di origine domestica. Di seguito vengono riassunte le caratteristiche degli agenti maggiormente indagati.

Il coprostanolo

È uno stanolo fecale. Si forma nell'intestino umano e degli animali a grande taglia durante il catabolismo del colesterolo. Leeming e coll. (35) hanno riportato nei campioni di feci umane percentuali di coprostanolo di

circa il 60% degli stanoli totali; in quelle di suini e gatti questa percentuale è 10 volte inferiore. Negli erbivori (bovini, equini, ed ovini) predominano gli steroli aggiuntivi ed, in particolare, il 24- etil-coprostanolo, che potrebbe essere utilizzato come potenziale indicatore d'inquinamento fecale nelle aree maggiormente frequentate da questi animali.

Il coprostanolo è una sostanza idrofobica, si associa rapidamente alle particelle presenti nell'acqua e nelle acque reflue. Nei sedimenti, in condizioni di anossia, è stata riportata una stabilità di circa 450 giorni alla temperatura di 15° (30); la sua stabilità non è influenzata da temperatura e salinità.

In condizioni aerobiche il coprostanolo è meno stabile e può essere biodegradato nella colonna d'acqua: è stata riportata un'emivita inferiore ai 10 giorni a 20° (30). Pertanto in queste condizioni la sua presenza indica un inquinamento relativamente recente.

Nelle acque dolci delle regioni tropicali del Giappone, della Malaysia e del Vietnam (29, 30, 35) è considerato un ottimo indicatore d'inquinamento fecale. Nel Mekong Delta (Vietnam) durante tutte le stagioni dell'anno, ha dimostrato una buona correlazione con gli indicatori convenzionali (29-30). Coprostanolo e steroli strutturalmente simili potrebbero essere proposti come indicatori per differenziare l'inquinamento umano da quello animale. Purtroppo non sono disponibili studi sulla relazione con i patogeni enterici.

Per il rilevamento analitico di questi composti vengono utilizzati con successo la gascromatografia e la spettrometria massa (30).

La caffeina

La caffeina è un alcaloide naturale, presente in più di 60 specie di piante (nei semi del cacao, del caffè, in quelli della noce di cola e nella pianta del tè). È costituente di molte bevande (caffè, tè, analcolici) e alimenti (cioccolato, prodotti di pasticceria), e di molti prodotti farmaceutici. Migliora

l'azione di alcuni analgesici ed è usata come stimolante cardiaco, cerebrale e respiratorio. È probabilmente la sostanza più consumata al mondo, in considerazione della presenza in vari prodotti; è stato stimato un consumo globale di circa 70 mg per persona al giorno, ma con forti oscillazioni nei differenti paesi (9).

Sono state riportate concentrazioni di caffeina di 37 µg/l nelle acque reflue (46, 54), 3-2 µg/l nelle acque di pozzo (54), 0,23 µg/l nelle acque sotterranee (54,69) e 0.14-1.6 µg/l nelle acque portuali (54,10).

Nelle acque reflue non trattate, le concentrazioni di caffeina includono, oltre alla sostanza consumata ed escreta, quella direttamente immessa dalle bevande. Una volta ingerita, la caffeina viene trasformata in gran parte nel fegato in più di 20 metaboliti; una quantità compresa tra lo 0,5 e 10% viene eliminata tal quale. La sua stabilità permette d'individuare facilmente nei corpi idrici. Nelle acque reflue urbane, dove si verificano rotture di rete, il contenuto di caffeina può essere utilizzato come tracciante. La sua alta mobilità la può inoltre rendere un adeguato marker per confermare la contaminazione delle acque sotterranee da parte di liquami domestici (20).

Tuttavia, il profilo del destino ambientale di questo prodotto nel suolo e negli acquiferi, non è stato ancora sufficientemente investigato (9, 57).

Agenti surfattanti

Tra i surfattanti anionici, gli alchilbenzene sulfonati lineari, comunemente riferiti come LAS, rappresentano la categoria maggiormente impiegata negli ambienti domestici. Sono estremamente idrofobici e vengono degradati in condizioni aerobiche (22).

La gascromatografia e la spettrofotometria sono i metodi utilizzati per il rilevamento di questi composti.

Non è sufficiente la base di dati attualmente disponibili per stabilire la correlazione

fra la concentrazione di questi indicatori chimici e la presenza di microrganismi patogeni (57).

Discussione e conclusioni

Sulla base di questa breve rassegna emergono molti limiti per ciascun indicatore di contaminazione fecale/domestica. Risulta evidente che un singolo indicatore non può essere rappresentativo di tutti i microrganismi patogeni intestinali, perché questi ultimi hanno tempi di sopravvivenza nell'ambiente acquatico molto diversi. Ad esempio *E. coli* ed enterococchi hanno tempi di sopravvivenza simili nelle acque dolci, ma molto diversi in acque marine.

Le stagioni e le latitudini sono caratterizzate da temperature delle acque che influenzano fortemente sui tempi d'inattivazione degli indicatori microbici di contaminazione fecale; alcuni di questi sono in grado di riprodursi in aree tropicali perdendo quindi il significato di indicatori di contaminazione fecale. Gli indicatori convenzionali vengono inattivati dagli agenti disinfettanti, mentre molti patogeni mostrano notevoli capacità di resistenza.

In realtà aggiustare il tiro su questa problematica non è certo un compito semplice. È necessario un grande impegno culturale e sperimentale. È anche importante imparare dalle numerose iniziative avviate per migliorare la rappresentatività delle misure delle densità degli indicatori rispetto alla reale qualità microbiologica.

Ad esempio, eseguendo il monitoraggio delle acque costiere della Baia di Santa Monica in California, Noble e Fuhrnam (43) hanno dimostrato che non è possibile valutare la presenza di enteropatogeni utilizzando un solo indicatore. Per ottenere una stima significativa è stato necessario ricorrere a più indicatori simultaneamente (56). In alcuni studi è stato applicato un approccio che

prevedeva il controllo di coliformi fecali, *E. coli*, *C. perfringens* e batteriofagi RNA *F-specifici* (43, 56, 60, 66). Questo approccio si è rivelato utile e di notevole valore predittivo in relazione alla presenza di enteropatogeni (26).

In alcuni casi, l'uso di indicatori con caratteristiche diverse può risultare particolarmente vantaggioso, come ad esempio, *Bifidobacterium sp.* ed *E. coli* (42, 50).

In uno studio svolto sulle acque di balneazione della California è stato applicato con successo l'uso integrato di indicatori convenzionali e di indicatori anaerobi come *Bacteroides* e *Prevotella* (genere anaerobio con diverse analogie con i *Bacteroides*) (6).

In altri casi si è ricorso ad un approccio che prevede il controllo di indicatori convenzionali insieme ad altri non convenzionali o anche a microrganismi patogeni specifici d'interesse sanitario in un preciso contesto di bacino. In Finlandia, ad esempio, hanno preso in esame i norovirus (come indicatori di contaminazione di virus enterici), nonché *Campylobacter*, *Giardia* e *Cryptosporidium* (26).

Nelle regioni tropicali le concentrazioni di enterococchi intestinali e di *E. coli* non forniscono dati reali sull'entità dell'inquinamento fecale, perché, una volta immessi nell'ambiente, le condizioni climatiche favoriscono la loro proliferazione. Per prevenire il rischio di contrarre patologie enteriche, che in queste zone sono purtroppo molto diffuse, è necessario trovare una migliore risposta, che potrebbe essere basata sull'uso di indicatori fecali alternativi più affidabili (29).

La determinazione simultanea di coprostanolo ed indicatori tradizionali conferma senza dubbio l'inquinamento fecale, ma non fornisce indicazioni sulla presenza di patogeni; tuttavia, insieme a composti strutturalmente simili, dà informazioni piuttosto precise sull'origine dell'inquinamento se di tipo umano o animale.

In acque marine e dolci *C. perfringens* ha dimostrato una buona correlazione con pato-

geni, steroli fecali (12) e *Salmonella sp.* (41). *C. perfringens* è considerato un valido indicatore anche in rapporto ai microrganismi che resistono e sopravvivono ai trattamenti di disinfezione (44). Studi epidemiologici eseguiti ad Hong Kong hanno dimostrato una buona correlazione fra la comparsa di sintomi gastrointestinali e la densità di *C. perfringens*, *Aeromonas sp.*, *Vibrio cholerae non-O1* (34). Nello stesso studio non è stata invece trovata una buona correlazione fra *Bacteroides spp.* o *Bifidobacterium sp.* e patogeni in acqua di mare.

Sempre nelle acque marine sono state riscontrate correlazioni positive tra batteriofagi fecali e virus enterici (52), mentre in acque dolci, i colifagi risultano sensibili indicatori per contaminazioni da *Salmonella sp.* (8).

Sono state avanzate proposte come quella di verificare la presenza di batteri patogeni attraverso la determinazione delle concentrazioni sia di *E. coli* che di enterococchi intestinali. *E. coli* può indicare la presenza di enteropatogeni come *Salmonella*; i colifagi possono essere utilizzati come indicatori di virus enterici umani; *C. perfringens* può indicare la presenza di protozoi (66); i *Bacteroides* possono essere utilizzati per distinguere l'inquinamento fecale di origine umana da quello animale (1, 57).

Le future ricerche dovrebbero essere indirizzate allo studio delle correlazioni tra indicatori e patogeni; focalizzare l'attenzione sui microrganismi ospiti-specifici come i batteriofagi; identificare ulteriori caratteristiche di nuovi gruppi e sottogruppi da utilizzare per risalire all'origine dell'inquinamento fecale.

Riassunto

Gli indicatori convenzionali di contaminazione fecale forniscono un prezioso contributo alla valutazione della qualità igienica dell'acqua. Negli ultimi anni sono stati individuati

alcuni limiti importanti che ne hanno messo in discussione la validità e hanno posto il problema della necessità di una rivisitazione del loro significato.

Nei Paesi industrializzati, nei quali la normativa vigente che concerne la qualità delle acque è molto rigorosa, si sono verificate numerose epidemie, nonostante gli indicatori convenzionali di contaminazione fecale indicassero una qualità microbiologica adeguata. Queste epidemie sono state attribuite a microrganismi patogeni emergenti, che sono spesso caratterizzati da una resistenza ai processi di disinfezione superiore rispetto agli indicatori convenzionali.

Per assicurare un'adeguata qualità microbiologica delle acque, sono stati avviati vari percorsi tra i quali i *Water Safety Plans* dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, la rivisitazione del ruolo dei possibili indicatori di qualità microbiologica, la messa a punto di metodi specifici per alcuni microrganismi patogeni e di metodi per una rapida rilevazione di qualità microbiologica non adeguata.

Bibliografia

- Allsop K, Stickler JD. An assessment of *Bacteroides fragilis* group organisms as indicators of human faecal pollution J Appl Bacteriol 1985; **58**: 95-9.
- Andersson Y, Bohan P. Disease surveillance and waterborne outbreaks. In: Fewtrell L, Bartram J, Eds. Water quality: guidelines, standards and health. London: IWA Publishing, 2001.
- Anonymous. Proposed amendments to the Hawaii administrative rules. Chapter 11-54-08. Recreational Water. In: Water quality standards. State of Hawaii, Honolulu: Department of Health, 1996: 54-86.
- Avelar KE, Moraes SR, Pinto LF, Silva e Souza W das G, Domingues RM, Ferreira MC. Influence of stress conditions on *Bacteroides fragilis* survival and protein profiles. Zentralbl Bakteriologie 1998; **287**: 399-409.
- Bernhard AE, Field KG. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 2000b; **66**: 4571-4.
- Boehm AB, Fuhrnam JA, Mrse RD, Grant SB. Tired approach for identification of human fecal pollution source at a recreational beach: case study at Avalon Bay, Catalina Island, California: Environ Sci Technol 2003; **37**: 673-80.
- Bonjoch X, Ballestè E, Blanch AR. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. Water Res 2005; **39**: 1621-7.
- Borrego J, Norinigo MA, De Vicente, A, Cornax R, Romero P. Colifage as an indicator of fecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms Water Res 1987; **21**: 1473-80.
- Buerge IJ, Poiger T, Müller MD, Buser HR. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. Environ Sci Technol 2003; **37**: 691-700.
- Buszaka PM, Barber II LB, Schroeder MP, Becker LD. Organic compounds downstream from a treated-wastewater discharge near Dallas, Texas, March 1987 – U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations. Austin, Texas, Report 1994; 93-4194.
- Chung H, Sobsey MD. Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediments. Water Sci Technol 1993; **27**: 425-8.
- Davies CM, Long JA, Donald M, Asholt NJ. Survival of fecal microorganisms in aquatic sediments of Sydney, Australia. Appl Environ Microbiol 1995; **61**: 1888-96.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia dell'ambiente. GURI n. 96L del 14 aprile 2006 (Suppl Ord N. 88).
- Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. GURI n. 52 del 3 marzo 2001.
- Decreto Ministeriale 12 giugno 2003, n.185. Regolamento recante le tecniche per il riutilizzo delle acque reflue in attuazione art. 26, comma 2, D.Lgs 11 maggio 1999 n. 152. GURI n. 169 del 23 luglio 2003.
- Desmarais TR, Solo-Gabriele HM, Palmer CJ. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. Appl Environ Microbiol 2002; **68**: 1165-72.
- Direttiva 2006/7/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15.2.2006, relativa alla gestione delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE.
- Dutka BJ, Chau ASY, Coburn J. Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols Water Res 1974; **8**: 1047-55.
- Dutka BJ, Shaarawi AE, Martins MT. North and south American studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. Water Res 1987; **21**: 1127-34.
- Ferreira AP. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. Cad Saude Publica 2005; **21**(6): 1884-92.

21. Field K, Fields K, Brodeur TJ, et al. Who's responsible: fecal source tracking with *Bacteroides*. Research & Extension Regional Water Quality Conference 2002.
22. Gustafsson Ö, Long CM, Macfarlane J, Gschwend PM. Fate of linear alkylbenzenes released to the coastal environment near Boston Harbor. Environ Sci Technol 2001; **35**: 2040-8.
23. Havelaar AH, Hogeboom WM. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J Appl Bacteriol 1984; **56**: 439-47.
24. Havelaar AH, Pot-Hogeboom WM. F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water Hygiene: ecological aspects. Water Sci Technol 1988; **20**: 399-407.
25. Holdman V, Cato EP, Moore WEC. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and possible effect of emotional stress. Appl Environ Microbiol 1976; **31**: 359-75.
26. Horman A, Rimhanen-Finne R, Manula L, et al. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwester Finland 2000-2001. Appl Environ Microbiol 2004; **70**: 87-95.
27. Hurst CJ, Crawford RL, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD. Manual of Environmental Microbiology. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2002.
28. IAWPRC Study Group on Health Water Microbiology. Water Res 1991; **25**: 529-45.
29. Isobe KO, Tarao M, Chiem NH, Minh LY, Takada H. Effect of environmental factors on the relationships between concentrations of coprostanol and fecal indicator bacteria in tropical (Mekong Delta) and temperature (Tokyo) freshwater. Appl Environ Microbiol 2004; **70**: 814-21.
30. Isobe KO, Tarao M, Zakaria MP, Chiem NH, Minh LY, Takada H. Quantitative application of fecal sterol using gas chromatography – mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. Environ Sci Technol 2002; **36**: 4497-507.
31. Kott Y, Roze N, Sperber S, Betzer N. *Bacteriophages* as viral pollution indicators. Water Res. 1974; **8**: 165-71.
32. Kreader CA. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. Appl Environ Microbiol 1995; **61**: 1771-9.
33. Kreader CA. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. Appl Environ Microbiol 1998; **64**: 4103-5.
34. Kueh CSW, Tam TY, Lee T, et al. Epidemiological study of swimming-associated illnesses relating to bathing-beach water quality. Wat Sci Technol 1995; **31**: 1-4.
35. Leeming R, Nichols PD. Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. Water Res 1996; **30**: 2997-3006.
36. MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. New Engl J Med 1994; **331**: 161-7.
37. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biologia dei microrganismi. 10th ed. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2003.
38. Malinen E, Kassinen, Rinttila T, Pavla A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green 1 or 5-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. Microbiology 2003; **149**: 269-77.
39. Maus JE, Ingram SC. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold-and-acid tolerance of *Bifidobacteria*. J Appl Microbiol 2003; **95**: 146-54.
40. Medema GJ, Payment P, Dufour A, et al. Safe drinking- water: an ongoing challenge. In: Dufour A, Snozzi M, Koster W, et al, Eds. Assessing microbial safety of drinking water. Improving approaches and methods. London: WHO-IWA, 2003: 11-45.
41. Morinigo MA, Cornax R, Munoz MA, Romero P, Borrego JJ. Relationships between *Salmonella* spp. and indicator microorganisms in polluted natural waters. Water Res 1990; **24**: 117-20.
42. Nebra Y, Bonjoch X, Blanch AR. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. Appl Environ Microbiol 2003; **69**: 2651-6.
43. Noble RT, Fuhrman JA. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. Hydrobiologia 2001; **460**: 175-84.
44. Nusca A, Orefice L, Paradiso R. Tryptose sulphite cycloserine agar per l'isolamento di *Clostridium perfringens* da acque superficiali: studio su alcune modalità di impiego. Ann Ig 2007; **19**: 3-8.
45. Ottson J, Stenstrom TA. Fecal contamination of greywater and associated microbial risk. Water Res 2003; **37**: 645-55.
46. Paxeus N, Schroeder HF. Screening of regulated organic

- compounds in municipal waste water in Goteborg, Sweden. *Wat Sci Technol* 1996; **32**: 9-15.
47. Payment P, Hunter PR. Endemic and epidemic infectious intestinal diseases and its relationship to drinking water. In: Fawcett L, Bartram J, Eds. *Water quality: guidelines, standards and health*. London: IWA Publishing, 2001: 61-88.
 48. Payment P, Berte A, Prévost M, Mènard B, Barbeau B. Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Can J Microbiol* 2000; **46**: 565-76.
 49. Pruss A. A review of epidemiological studies from exposure to recreational water. *Int J Epidemiol* 1998; **27**: 1-9.
 50. Resnick IG, Levin MA. Assessment of *Bifidobacteria* as indicator of human fecal pollution. *Appl Environ Microbiol* 1981; **42**: 433-8.
 51. Rolfé RD, Hentges DJ, Barrett JT, Campbell BJ. Oxygen tolerance of human intestinal anaerobes. *Am J Clin Nutr* 1977; **30**: 1762-9.
 52. Rozen Y, Belkin S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev* 2001; **25**: 528-35.
 53. Salyers AA. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 1984; **38**: 293-313.
 54. Sankararamakrishnan N, Guo Q. Chemical tracers as indicator of human fecal coliforms at storm water outfalls. *Environ Int* 2005; **31**: 1133-40.
 55. Sargeant D. Fecal contamination source identification methods in surface water. *Ecology Report* October 1999: 1-17.
 56. Savichtcheva O, Okabe S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res* 2006; **40**: 2463-76.
 57. Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: current Methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**: 5796-803.
 58. Seurinck S, Defoirdt T, Verstraete W, Siciliano AD. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16SrRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human fecal pollution in freshwaters. *Environ Microbiol* 2005; **7**: 249-59.
 59. Simpson JM, Santo Domingo JM, Reasoner DJ. Microbial source tracking: state of the science. *Environ Sci Technol* 2002; **24**: 5279-88.
 60. Simpson JM, Santo Domingo JW, Reasoner DJ. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiol Ecol* 2004; **47**: 65-75.
 61. Sinton LW, Hall CH, Lynch FA, Davies-Colley RJ. Sunlight inactivation fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**: 1122-31.
 62. Solo-Gabriele HM, Wolfert TR, Desmarais TR, Palmer CJ. Source of *E. coli* in a coastal subtropical environment. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 230-7.
 63. Sorensen DL, Eberl SG, Dicksa RA. *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-point polluted streams. *Water Res* 1989; **23**: 191-7.
 64. Tartera C, Jofre J. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl Environ Microbiol* 1987; **53**: 1632-7.
 65. Tartera C, Jofre J, Lucena F. Relationship between of Enteroviruses and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environmental samples. *Environ Technol Lett* 1988; **9**: 407-10.
 66. Tyagi VK, Chopra AK, Kazmi AA, Kumar A. Alternative microbial indicators of fecal pollution current perspectives. *Iran. J Environ Health Sci Eng* 2006; **3**: 205-16.
 67. Winfield MD, Groisman EA. Role of non host environment in the lifestyle of *Salmonella* and *E. coli*. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 3687-94.
 68. Wood J, Scott K, Avgustin G, Newbold CJ, Flint HJ. Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides-Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 1998; **64**: 3683-9.
 69. World Health Organization (WHO). Emerging and re-emerging infectious diseases. Fact Sheet 1998, n. 97 (<http://www.who.int/inf-fs/en/fact097.html>)
 70. World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking-water quality. 3rd ed. Vol. 1: Recommendation. Geneva: WHO, 2004.
 71. World Health Organization (WHO). Monitoring bathing waters. Edited by Bartram J, Gareth R. London and New York, 2000: 114-67.