

## *Prefazione*

Lo stato di qualità delle acque marino-costiere è un problema di particolare importanza in un paese come l'Italia la cui costa, estendendosi per oltre 7000 km, occupa una parte considerevole di territorio. Oltre agli aspetti sanitari, la qualità di queste acque ha forti ripercussioni sull'economia nazionale, in considerazione dell'importanza dell'industria turistica e della pesca.

Gli scarichi urbani, zootecnici e industriali, non adeguatamente trattati, sono responsabili dell'immissione in mare di microrganismi patogeni e di contaminanti chimici.

L'uomo può essere esposto ai microrganismi patogeni (batteri, virus, protozoi) attraverso il consumo di prodotti ittici e lo svolgimento di attività ricreative.

I contaminanti chimici, come ad esempio policlorobifenili, metilmercurio, diossine e pesticidi clorurati, possono raggiungere in alcune aree concentrazioni particolarmente elevate nei prodotti ittici e rappresentare un rischio significativo per la salute dei consumatori. L'immissione in mare di grandi quantità di macronutrienti induce i fenomeni delle fioriture algali ed ha probabilmente un ruolo di primo piano anche nei fenomeni delle mucillagini e della diffusione di alghe tossiche marine. Quest'ultimo fenomeno sembra in progressiva espansione e rappresenta un rischio per l'uomo in particolare associato al consumo di molluschi, nei quali si possono concentrare elevate quantità di tossine algali.

Gli annegamenti, i quasi annegamenti, le lesioni craniche e alla colonna vertebrale rappresentano conseguenze tristemente note di attività ricreative in aree di balneazione. Questi eventi vengono considerati comunemente inevitabili fatalità, in realtà, attraverso adeguate misure di gestione sarebbe possibile ottenere un loro significativo contenimento.

Nel nostro paese i dati e le informazioni disponibili sullo stato di qualità delle acque marine costiere e sulle correlazioni con la salute della popolazione sono frammentari. Diversi sono i soggetti istituzionalmente competenti nel controllo dello stato di qualità degli ambienti marino-costieri, nella valutazione del rischio, nella individuazione di nuovi fattori di rischio sanitario nonché nella programmazione e nella gestione delle azioni di tutela e di ripristino ambientale. Nella maggior parte dei casi, nell'espletamento delle attività di competenza, questi soggetti procedono separatamente, senza le necessarie sinergie. In questo contesto è certamente difficile pervenire alla sintesi necessaria per correlare i fattori di rischio con lo stato di salute della popolazione.

Questo numero monografico affronta alcuni degli aspetti della problematica della qualità delle acque marino-costiere e delle possibili implicazioni sanitarie. Raccoglie i contributi dei principali soggetti istituzionali, dei quali vengono messi in evidenza competenze e missioni, con l'auspicio di favorire lo sviluppo di tutte le sinergie necessarie a garantire tanto la qualità ambientale dei nostri mari quanto la loro fruizione "in sicurezza" da parte della popolazione.

Irene Di Girolamo (a) e Enzo Funari (b)

(a) *Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Roma*

(b) *Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Stima dei carichi inquinanti nell'ambiente marino-costiero

Romano PAGNOTTA e Giulia BARBIERO

*Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

**Riassunto.** - Sono stati stimati i carichi inquinanti che raggiungono l'ambiente marino costiero. Tale stima è stata effettuata considerando i carichi potenziali generati sul territorio utilizzando procedure messe a punto dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR con opportuni coefficienti di conversione aderenti alla classificazione delle attività economiche adottata dall'ISTAT nel Censimento del 1991. Sono stati inoltre utilizzati i risultati di indagini svolte negli anni '90 da differenti istituzioni scientifiche e da strutture di controllo. I carichi inquinanti sono stati disaggregati per unità territoriali (costituite dalle province costiere) o per corpi idrici significativi. È stato infine evidenziato il ruolo positivo che l'attuazione dei piani di monitoraggio previsti dalla normativa nazionale (DL.vo 152/99) può avere per una stima spazio-temporale più puntuale dei carichi inquinanti.

*Parole chiave:* carichi inquinanti, inquinamento marino costiero, trasporto fluviale.

**Summary** (*Evaluation of pollution load in the marine coastal waters*). - The potential pollution loads, of both organic and eutrophicating type, along the Italian coast were evaluated with reference to census data of 1991. The methodology adopted for the indirect evaluation of loads are those developed by the Water Research Institute of the Italian National Research Council. They take into account the different sources of pollution load, namely population, industry, agriculture and cattle farming. Pollution loads were estimated at coastal provinces level. Annual riverine fluxes of pollutants were also evaluated for the main Italian rivers. Finally, the positive role played by the adoption of monitoring plans forecasted by the national law recently come into force (DL.vo 152/99) for a better evaluation of the pollution loads was stressed.

*Key words:* pollution load, coastal marine pollution, fluvial discharge.

### Introduzione

I processi ambientali ed i sistemi ecologici sono fortemente influenzati dai sistemi economici e sociali. Una parte cospicua della popolazione vive lungo le coste utilizzando le risorse marine per attività legate alla produzione del reddito o per scopi ricreazionali. Su scala globale sia i problemi di tipo ambientale che quelli di tipo sociale hanno subito, negli ultimi anni, modifiche sostanziali tanto da far ritenere che l'aumentata pressione antropica sulle risorse costiere possa, in molti casi, eccedere quella che è definita la capacità recettiva dell'ambiente marino.

Ciò è particolarmente evidente in un paese come l'Italia, in cui le coste hanno storicamente costituito il luogo di elezione di numerosi ed importanti insediamenti urbani ed in cui le caratteristiche climatiche richiamano lungo le coste massicci apporti di turisti.

Una valutazione dei carichi inquinanti generati da tali presenze costituisce quindi un presupposto indispensabile per valutare le aree a maggior rischio ambientale, per definire corretti piani di controllo e monitoraggio e per stabilire le priorità degli interventi

finalizzati alla salvaguardia delle risorse marine costiere.

I carichi inquinanti sversati in mare possono derivare da:

- presenze umane ed attività produttive (anche in aree remote) esercitate nella terraferma;
- attività marine (costruzioni, acquacoltura, dragaggi, *dumping*);
- sversamenti legati ai trasporti marittimi e ad incidenti.

I principali effetti a carico dell'ambiente marino legati a tali apporti (ed i contaminanti responsabili) risultano essere i seguenti:

- alterazione delle caratteristiche igieniche (microrganismi);
- variazione del livello trofico (nutrienti);
- ipossie ed anossie (nutrienti ed idrocarburi);
- tossicità e bioaccumulo (microinquinanti organici ed inorganici).

La valutazione quantitativa dei carichi inquinanti può essere effettuata utilizzando metodi indiretti, basati su dati di tipo statistico, o con metodi diretti, basati su una sperimentazione di campo.

## Valutazione dei carichi inquinanti

### *Carichi inquinanti potenziali*

I carichi inquinanti potenziali e la loro distribuzione sul territorio possono essere valutati impiegando una procedura secondo la quale, attraverso opportuni coefficienti numerici, le unità di riferimento prescelte per le diverse fonti di generazione vengono trasformate in unità di carico o in indici del carico medesimo. Per poter applicare una tale procedura va, ovviamente, identificata prioritariamente l'area di riferimento alla quale la procedura stessa deve essere applicata. Nel caso delle acque interne, l'area corrisponde al bacino idrografico sotteso dal corpo idrico oggetto di indagine, mentre maggiori difficoltà si manifestano nel definire il bacino scolante a mare.

Un possibile criterio da adottare è quello seguito dall'ISTAT [1] che considera costieri i comuni confinanti direttamente con il mare ed escludendo dal computo quelli che con il mare hanno rapporti indiretti (ad es. quelli confinanti con fiumi che recapitano in mare e quelli confinanti con lagune costiere). Utilizzando questo criterio i comuni costieri italiani risultano essere 642 sul totale dei circa 8100 comuni.

Tra le sorgenti potenziali di inquinamento si possono considerare la popolazione residente (PR) nei comuni costieri, quella "fluttuante" rappresentata dal movimento turistico (PF), gli equivalenti industriali (EI) e gli equivalenti zootecnici (EZ).

Per le valutazioni teoriche dei carichi inquinanti ci si avvale dei dati relativi alle indagini censuarie ISTAT decennali. Ciò garantisce la confrontabilità nel tempo delle stime e, in particolare, per i carichi di popolazione consente di utilizzare il valore della popolazione residente legale che viene calcolata nel corso del Censimento decennale relativo. Nel 1996 è stato effettuato un Censimento intermedio dell'industria, cui non sono seguite contemporanee indagini per la popolazione e l'agricoltura, né, a tutt'oggi, è possibile utilizzare i dati dei Censimenti del 2001 perché i risultati sono al momento ancora provvisori.

### *Popolazione residente*

La popolazione residente (PR) legale per comune è stata ricavata dai dati ISTAT relativi al Censimento Generale della Popolazione riferito al 1991 [2]. Per questa componente del carico non si applicano coefficienti di equivalenza e ogni abitante costituisce una unità di popolazione totale.

Utilizzando tale criterio la popolazione costiera ammonta a circa 16,8 milioni di abitanti (su un totale nazionale pari a 57,8 milioni). Aggregando i comuni costieri a livello provinciale Roma, con 3 milioni di abitanti, risulta la provincia costiera più popolata,

seguita da Napoli (1,7 milioni), Palermo (0,9 milioni) Genova (0,8 milioni) e Bari (0,7 milioni). Meno popolate risultano le province di Ferrara, Rovigo, Viterbo, Udine e Potenza con un numero di abitanti compreso tra 40 000 e 5000.

### *Popolazione fluttuante*

Per quanto riguarda la popolazione fluttuante (PF) nel ciclo annuo, si considera il solo movimento turistico. I dati elaborati possono essere raccolti da informazioni desunte da varie fonti ma, in maggior misura, dalle statistiche ISTAT, anch'esse aggiornate al 1991 [3]. Queste statistiche non sono disponibili nella disaggregazione comunale, se non in casi particolari e assai limitati. Le uniche elaborazioni che è possibile effettuare sulla popolazione fluttuante consistono nel ridurre le presenze per anno in presenze per giorno, concentrando nei 90 giorni di turismo balneare. Questa assunzione, in alcuni casi, è del tutto arbitraria essendo taluni comuni compresi nell'elenco dei costieri interessati da un movimento turistico che non è legato solo alla balneazione. Anche per questa componente non si applicano fattori di equivalenza, ed ogni presenza turistica giornaliera corrisponde a una unità di popolazione totale (limitatamente al periodo balneare). Ovviamente tale semplificazione non è giustificabile nel caso di province in cui il turismo estivo costituisce solo una quota-parte del movimento turistico complessivo. Ciò vale in particolare per le province di Roma, Venezia, Pisa e, sia pure in misura minore, Napoli, Bari, Genova e Trieste. Utilizzando tale criterio la popolazione fluttuante complessivamente attribuibile alle province costiere risulta essere pari a 149 milioni di presenze giornaliere per anno.

Va infine considerato come, non di rado, il movimento turistico, e quello balneare in particolare, avvenga nell'ambito della stessa provincia; in questo caso la somma della PR con le presenze turistiche può determinare una sovrastima della popolazione totale.

Pur con tutti i limiti insiti nella metodologia utilizzata, l'elaborazione dei dati disponibili mostra come rispetto ad una media nazionale di presenze per provincia pari a 2 808 508, le province con maggior movimento turistico risultano essere Forlì, Venezia, Roma, Napoli e Savona (con valori di presenze giornaliere variabili da un massimo di 19 ad un minimo di 7 ML per anno) mentre quelle con minor movimento turistico sono Reggio Calabria, Matera, Campobasso, Oristano e Caltanissetta, le cui presenze giornaliere oscillano da 480 000 a 136 000 per anno.

### *Equivalenti industriali (EI)*

Per la valutazione della componente industriale del carico inquinante si può utilizzare il criterio della conversione in abitanti equivalenti che presume la conoscenza:

a) delle tipologie produttive che esplicano attività comportanti un potenziale scarico di acque inquinate;

b) la conoscenza del numero degli addetti ad ogni tipologia;

c) la disponibilità di coefficienti di trasformazione in abitanti equivalenti/addetto specifici per tipologia.

Per quanto riguarda le tipologie produttive e il numero di addetti si può fare ricorso ai dati del 7° censimento ISTAT dell'Industria e dei Servizi nella disaggregazione comunale per il 1991 [4]. Per quanto riguarda i coefficienti di equivalenza si possono adottare i fattori proposti da IRSA [5].

Tali coefficienti sono riportati in Tab. 1.

Si possono pertanto valutare gli equivalenti industriali per ogni classe di attività, moltiplicando i coefficienti suddetti per il numero dei rispettivi addetti. La popolazione equivalente industriale totale (EI) è la somma dei valori ottenuti per ciascuna classe di attività presente nei comuni considerati.

Utilizzando il criterio della conversione in abitanti equivalenti degli addetti ad attività industriali idroesigenti risulta, a livello nazionale, una EI costiera pari a 16 693 598.

Riferito alle province costiere il valore medio risulta pari a 314 974 EI. Le province con la maggior popolazione equivalente industriale risultano essere Roma (2,5 milioni), seguita da Napoli, Venezia, Genova e Bari, con un numero di addetti industriali oscillante tra 850 000 e 690 000. Le province a minor vocazione industriale risultano essere Gorizia, Caserta, Viterbo, Udine e Potenza con un numero di addetti variabile da 37 000 a 1500.

#### *Equivalenti zootecnici (EZ)*

La trasformazione del carico zootecnico in unità equivalenti sommabili per il calcolo della popolazione totale può esser effettuato ricorrendo ai dati di base del IV Censimento dell'Agricoltura relativo al periodo 21 ottobre 1990-22 febbraio 1991 [6]. Questi dati, disponibili nella disaggregazione comunale, possono essere tradotti in abitanti equivalenti [7] moltiplicando il numero dei diversi capi animali per i relativi coefficienti di trasformazione:

- bovini	8,16
- equini	8,08
- suini	1,95
- ovini e caprini	1,78
- polli e simili	0,20

Riferito alle province costiere il carico zootecnico risulta pari ad oltre 10 milioni di abitanti equivalenti, con un valore medio provinciale pari a 190 000 EZ. I valori più elevati di EZ si riscontrano nelle province di Ragusa, Roma, Sassari, Grosseto e Latina (con un numero di EZ variabile da 917 000 a 509 000) mentre i valori più bassi variano da 2500 a 10 500 per le province di Udine, Potenza, Imperia, Trieste e Gorizia.

**Tabella 1.** - Coefficienti di equivalenza proposti dall'Istituto di Ricerca sulle Acque per il 1991 [5]

Estrazione di carbon fossile e lignite; estrazione di torba	20
Estrazione di petrolio greggio e di gas naturale; servizi connessi	30
Estrazione di minerali di uranio e di torio	0,6
Estrazione di minerali metalliferi	5
Altre industrie estrattive	30
Industrie alimentari e delle bevande	98
Industria del tabacco	7,5
Industrie tessili	17
Confezione di articoli di vestiario; preparazione e tintura di pellicce	0,6
Preparazione e concia del cuoio; fabbricazione di articoli	17
Industrie del legno e dei prodotti in legno esclusi i mobili; fabbricazione articoli di paglia e materiali da intreccio	1,6
Fabbricazione della pasta-carta, della carta e dei prodotti in carta	118
Editoria, stampa e riproduzione di supporti registrati	0,6
Fabbricazione di coke, raffinerie petrolio, trattamento dei combustibili nucleari	66
Fabbricazione di prodotti chimici e di fibre sintetiche e artificiali	66
Fabbricazione di articoli in gomma e materie plastiche	10
Fabbricazione di prodotti della lavorazione di minerali non metalliferi	1,5
Produzione di metalli e loro leghe	2,3
Fabbricazione e lavorazione dei prodotti in metallo, escluse macchine ed impianti	2
Fabbricazione di macchine ed apparecchi meccanici, compresi l'installazione, il montaggio, la riparazione e la manutenzione	1
Fabbricazione di macchine per ufficio, di elaboratori e sistemi informatici	0,6
Fabbricazione di macchine e apparecchi elettrici n.c.a.	1
Fabbricazione di apparecchi radiotelevisivi e di apparecchiature per le comunicazioni	1
Fabbricazione di apparecchi medicali, di apparecchi di precisione, di strumenti ottici e di orologi	0,6
Fabbricazione di autoveicoli, rimorchi e semirimorchi	1,7
Fabbricazione di altri mezzi di trasporto	1,7
Fabbricazione di mobili; altre industrie manifatturiere	1,7
Recupero e preparazione per il riciclaggio	0,6
Produzione di energia elettrica, di gas,	1,4
Raccolta, depurazione e distribuzione d'acqua di vapore ed acqua calda	0,6

n.c.a.: non classificate altrove.

#### *Popolazione totale (PT)*

La popolazione totale (PT) si ottiene dalla somma della popolazione residente, degli equivalenti industriali e degli equivalenti zootecnici. L'indice PT, tiene conto quindi di tutte le attività che possono dar luogo ad un inquinamento di natura organica delle acque.

Non concorrono a determinare l'indice PT il movimento turistico (popolazione fluttuante) e l'agricoltura per quanto attiene all'uso del suolo. Quest'ultimo può contribuire all'inquinamento delle acque in termini di fertilizzanti e di pesticidi. Per i pesticidi non esistono metodi di valutazione del potenziale inquinante, mentre i fertilizzanti possono essere considerati insieme alle altre sorgenti di carichi eutrofizzanti.

Riferito alle province costiere il carico totale risulta essere pari ad oltre 45 milioni di abitanti equivalenti, con un valore medio provinciale pari ad oltre 850 000. I valori più elevati sono quelli riscontrati nelle province di Roma (7,6 milioni), Napoli (3,0 milioni), Genova (2,0 milioni), Venezia (1,9 milioni) e Bari (1,5 milioni), mentre quelli più bassi nelle province di Udine (11 000), Potenza (18 000), Campobasso (119 000), Macerata (133 000) e Viterbo (147 000).

Una rappresentazione grafica dei carichi complessivi generati nelle province costiere italiane è riportata in Fig. 1.

#### Carichi eutrofizzanti

I carichi teorici di fosforo e di azoto che si liberano dai comuni costieri possono essere valutati sulla base dei coefficienti unitari descritti in Tab 2 [8].

Il carico totale è derivato dalla somma dei carichi delle fonti diffuse (suolo coltivato e suolo incolto) e di quelle localizzate (residenti, turisti, industria, zootecnia). Per i turisti la valutazione del carico può essere effettuata ripartendo le presenze nei 365 giorni dell'anno.

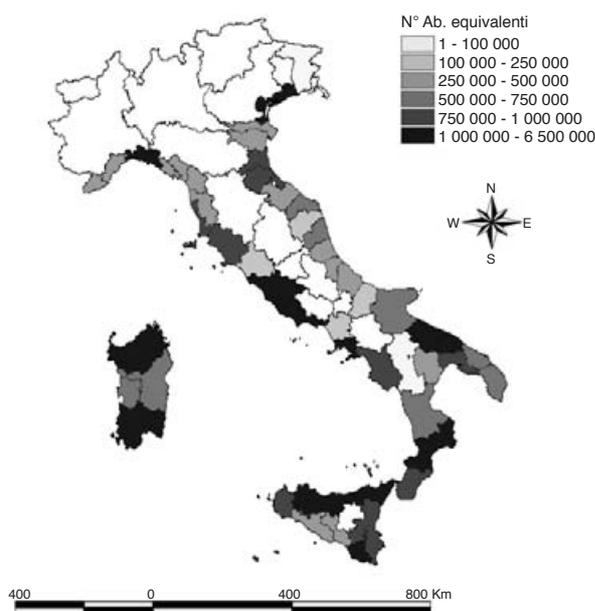


Fig. 1. - Popolazione equivalente totale provinciale costiera.

Tabella 2. - Coefficienti unitari per differenti fonti di generazione

<i>Popolazione residente e turisti</i>	
Fosforo	0,92 g per persona/giorno
Azoto	6,16 g per persona/giorno
<i>Industria</i>	
Fosforo	10 % del fosforo della popolazione residente
Azoto	27,40 g per addetto industriale/giorno
<i>Suolo incolto</i>	
Fosforo	0,27 g per ha/giorno
Azoto	5,48 g per ha/giorno
<i>Suolo coltivato</i>	
Fosforo	1,64 g/giorno per ha di SAU
Azoto	43,83 g/giorno per ha di SAU
<i>Zootecnia (EA)</i>	
Bovini	7,51 g N e 1,01 g P per capo/giorno
Suini	1,56 g N e 0,52 g P per capo/giorno
Equini	8,49 g N e 1,19 g P per capo/giorno
Ovini e caprini	0,68 g N e 0,11 g P per capo/giorno
Pollame	0,07 g N e 0,02 g P per capo/giorno

SAU: superficie agricola utilizzata; P: fosforo; N: azoto.

Utilizzando le procedure sopradescritte, sono stati stimati i carichi annui complessivi provenienti dai comuni costieri di fosforo (P) ed azoto (N), risultati essere pari a 8478 t di P e 84 773 t di N.

Per quanto riguarda i carichi di P il 20,6% (1747 t) risulta proveniente da sorgenti diffuse (suolo coltivato e suolo incolto) e il 79,4% (6731 t) da sorgenti puntiformi.

Relativamente ai carichi di N, complessivamente le 84 773 t/a vanno ripartite nel 41,5% per i carichi provenienti da sorgenti diffuse (35 147 t/a) e nel 58,5% per i carichi provenienti da sorgenti puntiformi (49 626 t/a).

I carichi eutrofizzanti costieri sversati nel Tirreno, derivanti dai contributi delle relative province costiere, assommano a 4314 t/a di P e 40 189 t/a di N, ripartite in 565 t/a di P e 12 871 t/a di N provenienti da sorgenti diffuse e in 3 749 t/a di P e 27 318 t/a di N provenienti da sorgenti puntiformi.

Nel Canale di Sardegna i carichi assommano a 511 t/a di P e 5795 t/a di N, ripartite in 222 t/a di P e 3709 t/a di N provenienti da sorgenti diffuse e in 289 t/a di P e 2086 t/a di N provenienti da sorgenti puntiformi.

Nel Canale di Sicilia i carichi assommano a 632 t/a di P e 6566 t/a di N, ripartite in 223 t/a di P e 3783 t/a di N provenienti da sorgenti diffuse e in 409 t/a di P e 2783 t/a di N provenienti da sorgenti puntiformi.

Nello Jonio i carichi assommano a 1126 t/a di P e 11 649 t/a di N, ripartite in 227 t/a di P e 5051 t/a di N provenienti da sorgenti diffuse e in 899 t/a di P e 6598 t/a di N provenienti da sorgenti puntiformi.

Nell'Adriatico i carichi assommano a 1896 t/a di P e 20 574 t/a di N, ripartite in 511 t/a di P e 9734 t/a di N provenienti da sorgenti diffuse e in 1385 t/a di P e 10 841 t/a di N provenienti da sorgenti puntiformi.

**Tabella 3.** - Valori massimi e minimi dei carichi liberati di N (espressi in t/a) nelle province costiere e medie provinciali (mp)

Residenti	Industria	Zootecnia	Suolo coltivato	Suolo incolto	Turisti	Totale	% Diffuso	% Puntiforme
RM 6750	RM1329	RG 238	SS 2310	CA 356	FO 117	RM 10065	VT 86,0	GE 95,2
NA 3919	NA 687	RM 208	RG 2041	SS 241	VE 103	NA 5376	FE 79,6	TS 94,5
PA 2033	GE 530	SS 168	RA 1918	RM 228	RM 83	SS 3529	RO 78,3	MS 90,5
GE 1876	BA 428	LT 144	RM 1467	CS 195	NA 47	RG 2966	RA 76,7	SP 89,1
BA 1588	VE 373	GR 108	LI 1437	RC 173	SV 43	CA 2867	NU 74,4	SA 87,6
mp 711	mp 164	mp 45	mp 583	mp 80	mp 17	mp 1599	mp 41,5	mp 58,5
FE 89	CE 20	MS 3,2	SV 25	TE 13	MT 2,8	MC 345	SV 12,4	NU 25,6
RO 81	OR 19	TS 2,3	SP 22	PE 11	PZ 2,6	CB 338	SP 10,9	RA 23,3
VT 47	VT 15	PZ 1,7	MS 16	MC 10	CB 1,63	GO 242	MS 9,5	RO 21,7
UD 13	PZ 2,0	IM 1,5	TS 15	PZ 6	OR 1,59	PZ 55	TS 5,5	FE 20,4
PZ 12	UD 1,3	UD 0,8	UD 10	UD 2	CL 0,8	UD 52	GE 4,8	VT 14

**Tabella 4.** - Valori massimi e minimi dei carichi liberati di P (espressi in t/a) nelle province costiere e medie provinciali (mp)

Residenti	Industria	Zootecnia	Suolo coltivato	Suolo incolto	Turisti	Totale	% Diffuso	% Puntiforme
RM 1005	RM 100	RG 42	SS 183	CA 18	FO 17	RM 1242	VT 66,7	GE 98,3
NA 584	NA 58	RM 32	RG 108	SS 12	VE 15	NA 673	RO 59,9	TS 98,0
PA 303	PA 30	SS 27	CZ 80	RM 11	RM 12	PA 358	NU 59,1	NA 97,3
GE 279	GE 28	LT 23	RM 76	CS 10	NA 7	SS 331	SS 59,0	MS 95,9
BA 236	BA 24	GR 20	FG 71	RC 9	SV 6	GE 318	FE 57,8	PA 95,8
mp 106	mp 11	mp 8	mp 29	mp 4	mp 3	mp 160	mp 20,6	mp 79,6
FE 13	FE 1,3	GO 0,50	GO 13	TE 0,7	MT 0,42	MC 30,2	PA 6,5	FE 42,2
RO 12	RO 1,2	TS 0,43	SP 0,8	PE 0,6	PZ 0,38	CB 29,8	MS 4,1	SS 41,0
VT 7	VT 0,7	IM 0,38	MS 0,7	MC 0,5	CB 0,24	GO 19,8	NA 2,7	NU 40,2
UD 1,9	UD 0,19	PZ 0,30	TS 0,6	PZ 0,3	OR 0,23	UD 6,6	TS 2,0	RO 40,1

Considerati i carichi provenienti dalle singole province, possono essere redatte graduatorie che considerano i carichi provinciali medi (pari a 1600 t/a di azoto e 160 t/a di fosforo) e le cinque province rispettivamente a maggiore e minore carico di nutrienti per le differenti fonti di generazione. Tali stime sono riportate nella Tab. 3 per quanto riguarda i carichi di N e nella Tab. 4 per quanto riguarda i carichi di P.

E' da rilevare come i carichi così stimati costituiscono solo una quota parte dei carichi totali che vengono trasportati ai mari. I sistemi fluviali drenano infatti bacini la cui estensione è decisamente superiore a quella dei comuni costieri; di conseguenza i carichi trasportati dai fiumi costituiscono di gran lunga i maggiori apporti, in senso assoluto, al mare.

#### *Apporti dall'entroterra*

Gli apporti dall'entroterra sono quelli che vengono convogliati dai corsi d'acqua sfocianti in costa, quantizzabili in termini di carico. Il carico, tuttavia, risulta determinato per un numero assai limitato di corsi d'acqua italiani.

**Tabella 5.** - Carichi sperimentali trasportati a mare dai quattro principali fiumi italiani

Fiumi	P (t/a)	N (t/a)	TOC (t/a)	COD (t/a)
Po	10,9	81,8	217,5	700,1
Tevere	3,2	20,2	39,2	157,4
Adige	1,2	7,7	19,6	67,5
Arno	1,8	4,6	12,7	58,2
Totale	17,1	114,3	289,0	983,2

TOC: carbonio organico totale; COD: richiesta chimica di ossigeno.

Una stima sperimentale dei carichi di nutrienti e di sostanza organica trasportati a mare dai corsi d'acqua è stata effettuata negli anni '80 per i quattro principali fiumi italiani [9] ed i dati relativi sono riportati nella Tab. 5.

Più recentemente (anni '90) sono stati ricalcolati i carichi provenienti dal fiume Po ed i risultati, riportati in Fig. 2 e 3 mostrano una diminuzione dei carichi di fosforo ed una costanza o un leggero incremento per i dati di azoto.

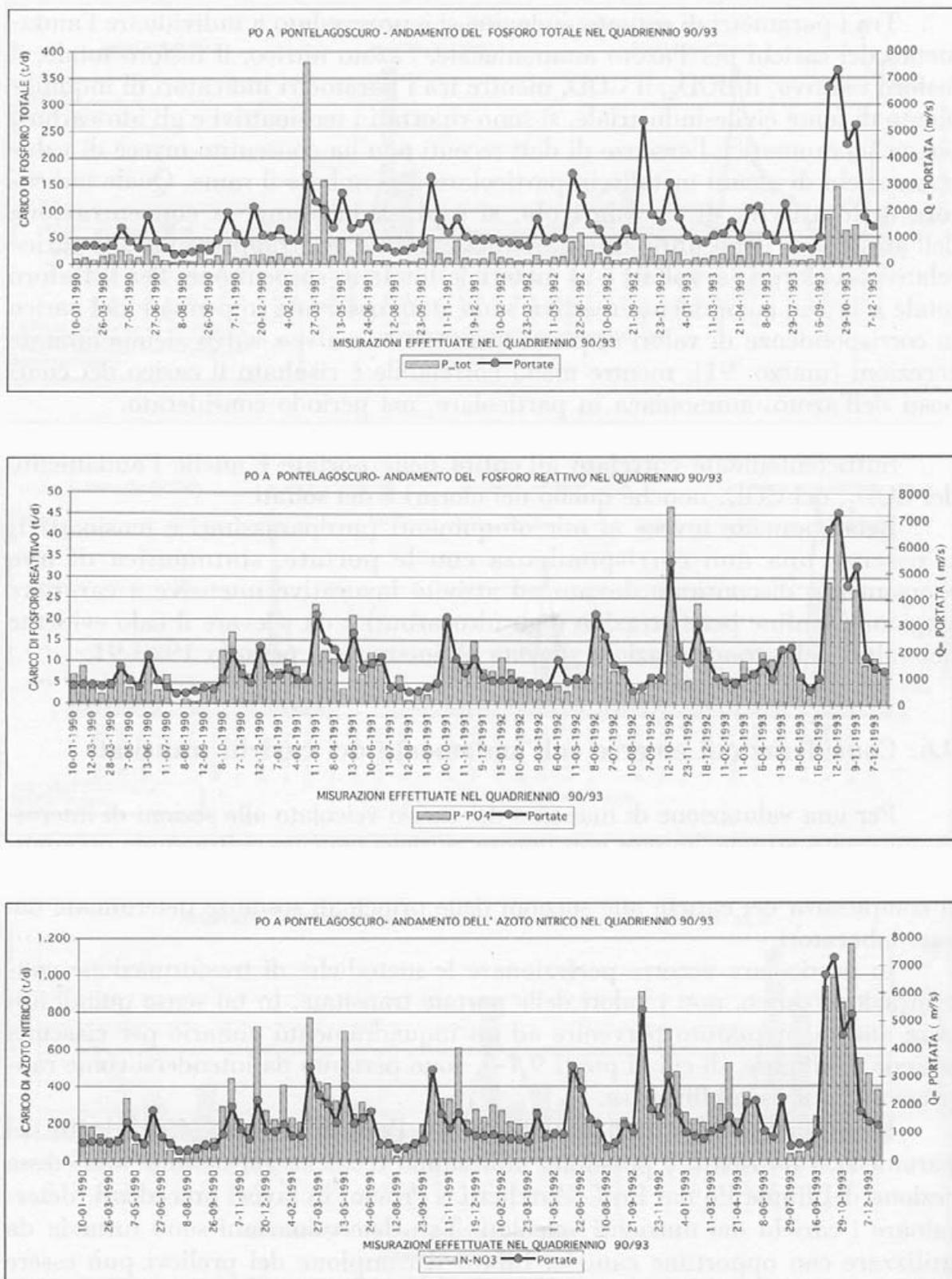


Fig. 2. - Andamento dei carichi inquinanti (fosforo totale, fosforo reattivo e azoto nitrico) transitati a Pontelagoscuro nel periodo 1990-1993. Riprodotta da [10].

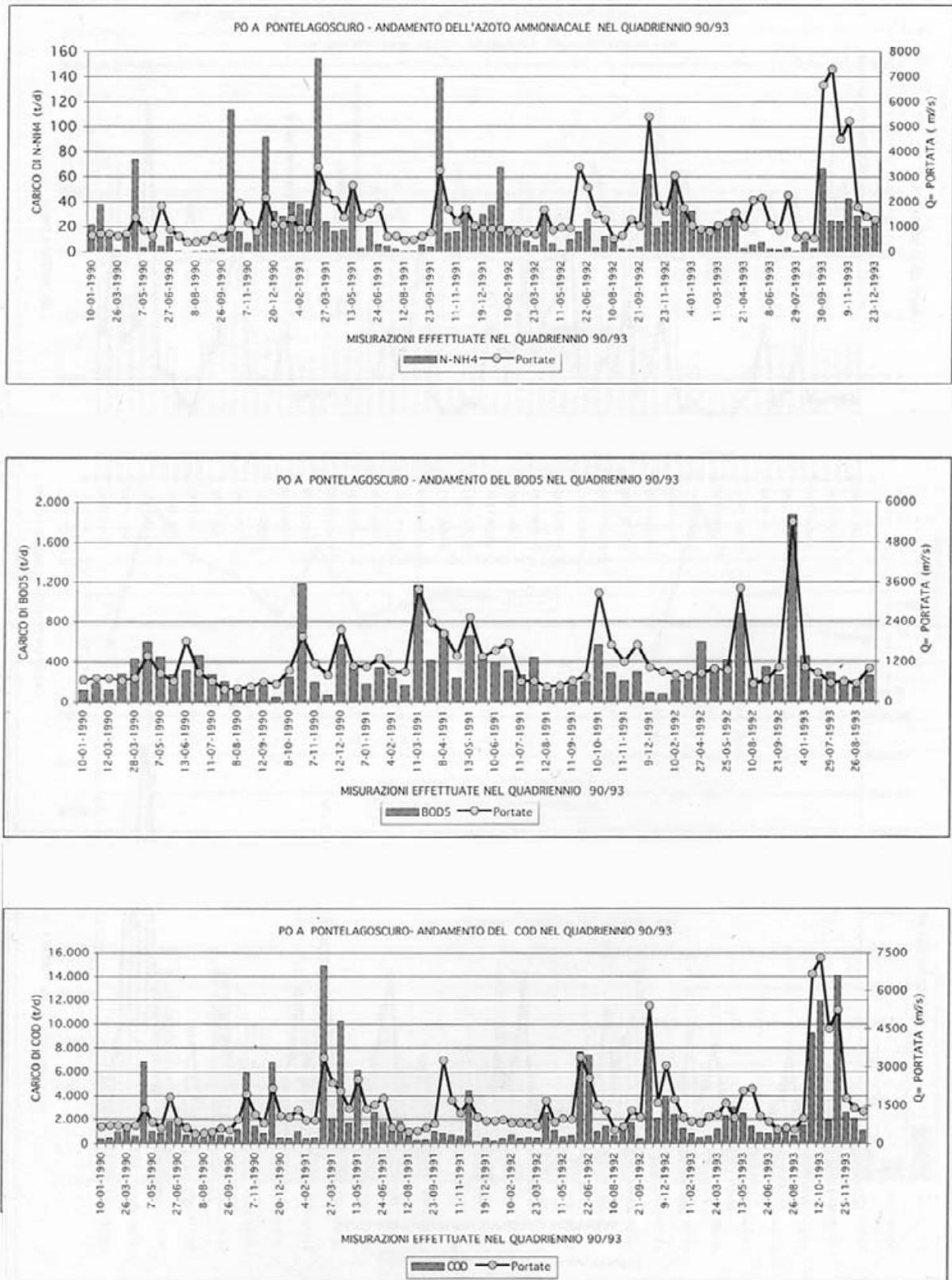


Fig. 3. - Andamento dei carichi inquinanti (azoto ammoniacale, BOD5 e COD) transitati a Ponte Lagoscuoro nel periodo 1990-1993. Riprodotta da [10].

Sempre relativamente al fiume Po è possibile disporre dei carichi transitanti a Pontelagoscuro (sezione di chiusura del bacino padano) per il quadriennio 1990-1993 calcolati sulla base di campionamenti circa mensili ed in grado quindi di descrivere con sufficiente accuratezza l'andamento dei carichi inquinanti nel tempo [10]. In particolare risultano transitate giornalmente in media 23 t di azoto ammoniacale, 300 t di azoto nitrico, 27 t di fosforo totale, 10 t di fosforo reattivo 350 t di BOD5, 2300 t di COD, 5 t di tensioattivi (MBAS) e 0,5 t di fenoli [11]. Gli andamenti di tali carichi nel tempo sono riportati nelle Fig. 2 e 3.

### Conclusioni

La valutazione dei carichi inquinanti che raggiungono il sistema marino costiero è un'operazione complessa, ma necessaria per stabilire opportune relazioni causa-effetto e per poter intraprendere idonee misure di salvaguardia ambientale.

I metodi indiretti, basati su dati di tipo statistico, possono fornire un quadro di massima sulle aree maggiormente interessate dai carichi inquinanti e quindi a maggior rischio ambientale.

Le misure dirette forniscono invece un quadro più rappresentativo della situazione reale, ma le stesse richiedono un'attività di campo onerosa e che necessita di una armonizzazione tra i diversi enti che, a vario titolo, eseguono le attività sperimentali.

Tali determinazioni sono quindi disponibili solo in un limitato numero di casi e non sono sufficienti a descrivere in modo organico la situazione per tutte le coste italiane.

Recentemente è stato emanato un decreto legislativo (DL.vo 152 del maggio 1999) recante disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento. Tale decreto, una sorta di "Testo unico" sulle acque, abolisce le precedenti leggi (ed in particolare la legge 319/76 che ha costituito per oltre un ventennio l'ossatura su cui si è sviluppata la politica delle acque in Italia) e stabilisce modalità per l'esecuzione dei monitoraggi e per la classificazione delle acque in funzione degli obiettivi di qualità ambientale.

Tali modalità riguardano sia le acque superficiali (fiumi, laghi, acque costiere e di transizione), sia le acque sotterranee.

Per le acque superficiali vengono stabiliti dei macrodescrittori sui quali basare la classificazione delle acque e vengono altresì indicati parametri da determinare nel biota (per le verifiche circa il bioaccumulo di metalli e contaminanti organici) e nei

sedimenti. Il decreto stabilisce infine i criteri per la scelta delle stazioni di campionamento e la frequenza dello stesso, nonché i metodi per la definizione di classi di qualità degli ambienti costieri.

L'attuazione del decreto consentirà, nell'arco di 24 mesi, di ottenere un quadro conoscitivo sullo stato delle acque fluviali e costiere sicuramente in grado di descrivere meglio il livello qualitativo cui sono giunte tali acque in Italia.

L'uso di banche dati in grado di gestire la rilevante mole di dati già disponibili e di quelli di prossima acquisizione contribuirà indubbiamente ad una più agevole gestione delle conoscenze e fornirà informazioni su cui potrà basarsi una politica di recupero o di mantenimento delle risorse idriche marine costiere.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

### BIBLIOGRAFIA

1. Istituto Nazionale di Statistica. *Elenco dei comuni al 1° gennaio 1995*. Roma: ISTAT; 1995. (Metodi e Norme serie C, 13). p. 158.
2. Istituto Nazionale di Statistica. *13° censimento generale della popolazione*. Roma: ISTAT; 1992. (Volumi vari).
3. Istituto Nazionale di Statistica. *Statistiche del turismo*. Roma: ISTAT; 1991. (Annuari, 6). p. 250.
4. Istituto Nazionale di Statistica. *7° censimento generale dell'industria e dei servizi. Dati sulle caratteristiche strutturali delle imprese e delle unità locali*. Roma: ISTAT; 1993. (Volumi vari).
5. Barbiero G, Puddu A, Spaziani FM. I coefficienti di popolazione equivalente delle attività economiche. *Inquinamento* 1998;1:46-50.
6. Istituto Nazionale di Statistica. *4° censimento generale dell'agricoltura 21 ottobre 1990 - 22 febbraio 1991*. Roma: ISTAT; 1992. (Volumi vari).
7. CRPA. *Manuale per la gestione e l'utilizzazione agronomica dei reflui zootecnici*. Regione Emilia Romagna; 1993. p. 317.
8. Beccari M, Passino R, Ramadori R, Vismara R. *Rimozione di azoto e fosforo dai liquami*. Milano: Hoepli; 1993. p. 241.
9. Pagnotta R, La Noce T, Pettine M, Puddu A. Discharge and pollutants of major Italian rivers. In: Giovannazzi G, Sermanni, P, Nannipieri (Ed.). *Atti intern. symposium current perspectives in environmental biogeochemistry*. CNR-IPRA; 1987. p. 395-404.
10. *Classificazione qualitativa dei principali corpi idrici superficiali del bacino del fiume Po*. Parma: Autorità di bacino del fiume Po; 1997. (I Quaderni del Piano di Bacino). 132 p.
11. Pagnotta R, Caggiati G, Piazza D, Ferrari F. Il controllo della qualità delle acque superficiali del bacino padano: situazione attuale e prospettive future. *Inquinamento* 1995;4:8-14.

## Operazioni di movimentazione dei fondali marini. Possibili implicazioni sanitarie

Giancarlo DONATI e Stefania De ANGELIS

*Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - Le attività di movimentazione dei fondali comprendono: scavo di trincee, ricerca di idrocarburi in ambiente marino, ripascimento di spiagge, manutenzione o creazione di strutture portuali. Queste attività possono causare il rilascio di agenti microbiologici patogeni o di agenti chimici tossici e interessare acque dove vengono svolte attività di balneazione o aree di allevamento o pesca, con possibili implicazioni sanitarie.

*Parole chiave:* dragaggi, estrazione di idrocarburi, contaminazione spiagge.

**Summary** (*Operations involving the seabed: possible health implications*). - Some activities on marine sediments, such as excavation of the bottom, search for hydrocarbons, deposit of sands on beaches, and harbour dredging or works are considered. These activities may cause the release of pathogens or chemical contaminants in waters used for recreational, rearing or fishery activities, so representing a threat to human health.

*Key words:* dredging, off shore activity, sand contamination.

### Introduzione

L'usuale gestione della risorsa marina prevede, oltre alla navigazione ed alla pesca, anche l'effettuazione di interventi a carico del fondale, che vanno dalla posa in opera di cavi o tubazioni alle realizzazioni di porti o ripristino della funzionalità di strutture esistenti, ricerca e/o sfruttamento di giacimenti di idrocarburi [1] e ripascimento di spiagge.

Tutte queste attività comportano o la movimentazione in spazi limitati del fondale stesso ovvero lo spostamento di porzioni di sedimenti da un punto ad un altro del fondale distanti tra loro. Operazioni tipiche del primo caso sono: lo scavo di una trincea per la messa in opera di cavi o tubazioni ed il successivo reinterro della stessa, così come la perforazione per lo sfruttamento di giacimenti di idrocarburi ed il rilascio in mare del materiale di risulta. Rientra nella seconda tipologia il prelievo di sabbie pulite da fondali per il ripascimento di spiagge poco distanti; o, infine, lo scarico in mare dei materiali derivanti dalla realizzazione di porti o dal ripristino della operatività degli stessi.

La ricaduta dei sedimenti sul fondale avviene nei due casi con modalità totalmente diverse, infatti nel caso di trincee i materiali scavati sono depositati accu-

mulandoli lungo la trincea stessa prima di essere utilizzati per ricoprirla; nell'attività *off shore* il fondale è soltanto rimaneggiato dagli ancoraggi cui, eventualmente, si aggiunge lo scarico di fanghi e detriti di perforazione. Se si effettua un ripascimento le sabbie sono scaricate sulla spiaggia o sotto costa con opportune tubazioni mentre per operazioni portuali i sedimenti da scaricare in mare sono stivati in una imbarcazione, una bettolina o la stessa draga, trasportati sul sito di discarica e, quando sono rilasciati in mare, si distribuiscono nella colonna d'acqua e sul fondale.

In particolare, anche in funzione della compattezza dei sedimenti [2], ad una certa profondità e prima di toccare il fondale del sito di discarica parte della frazione più fine, pelitica, si separa dalla massa dei sedimenti e si disperde nella colonna d'acqua venendo trasportata dalle correnti.

La frazione di sedimento che si deposita sul fondale viene, nel tempo, distribuita sullo stesso dalle correnti. La compattezza dei sedimenti varia in funzione dell'apparato utilizzato per il prelievo: una sorbona, pompa aspirante, versa nel mezzo di trasporto i sedimenti già fluidificati, che si distribuiscono ampiamente nella colonna d'acqua e sul sito di discarica; mentre una draga a benne preleva dal fondale il

sedimento compatto che resta in buona parte tale anche quando è rilasciato sul fondale.

Nel caso in cui il fondale soggetto a movimentazione sia stato interessato da un inquinamento microbiologico [3], le colonie batteriche presenti vanno incontro ad una serie di modifiche sia come stadio di sviluppo cellulare tipico di ogni genere, sia sotto l'aspetto del rapporto tra generi.

In particolare, all'interfaccia acqua-sedimento si ha una zona aerobia nella quale gli organismi sopravvivono in funzione della disponibilità di sostanza organica e dei nutrienti.

Procedendo in profondità nel sedimento si va verso l'anossia che diventa sempre più spinta, in tali condizioni le colonie batteriche sopravvivono in condizioni sempre più stressate sino a scomparire progressivamente ed in successione: i batteri fermentativi, i denitrificanti, i batteri solfato riduttori, sino ai batteri metanogeni; i batteri dei vari generi o si trasformano in spore come i batteri solfitoriduttori o scompaiono a favore della forma più resistente in ambiente anossico.

Tipico è il comportamento di *Vibrio cholerae* che in condizioni ambientali avverse (carenza di ossigeno e di elementi nutritivi), sopravvive riducendo la respirazione, le dimensioni e le proprie riserve cellulari, subendo cambiamenti morfologici.

Di questa realtà si deve tener conto nella caratterizzazione microbiologica di un sedimento marino. Infatti, poiché non tutte le cellule possono essere coltivate direttamente, devono essere utilizzati terreni di coltura che riportino allo stato vitale le forme dormienti prima della caratterizzazione vera e propria.

I riflessi sulla salute umana della movimentazione dei fondali possono essere diretti, dovuti al contatto con i materiali movimentati, o indiretti, a seguito del consumo di prodotti della pesca contaminati, come illustrato di seguito per le diverse tipologie di attività.

### Scavi di trincee

Il deposito in mare di cavi telefonici, cavi elettrici, oleodotti, collettori fognari, prese d'acqua per il raffreddamento industriale e quant'altro simile a questi comporta solitamente, nei tratti sotto costa, lo scavo di trincee [4] ed il successivo interro dei materiali *de quo* per proteggerli dalle mareggiate, da erroneo ancoraggio di imbarcazioni da diporto, dall'intrusione di estranei, ecc. Nel caso in cui la batimetria lo consenta, le suddette operazioni (escavo, deposito, ricopertura) sono realizzate in rapida successione da un unico natante che realizza l'opera riducendo il tempo della turbativa ambientale.

Queste realizzazioni in linea di principio non hanno implicazioni sanitarie ma, solo occasionalmente e per fondali di particolare natura (ad esempio per la

presenza di mercurio sui fondali della Toscana o di arsenico nel golfo di Trieste), la movimentazione può comportare una eccessiva esposizione della fauna marina agli inquinanti con assunzione degli stessi e successiva loro immissione nella catena alimentare.

### Operazioni petrolifere *off-shore*

La realtà industriale connessa con queste operazioni è più complessa della precedente, vale la pena descriverla brevemente per evidenziare le fonti di rischio.

La fase di ricerca di un giacimento di idrocarburi (gas o liquido) [5, 6] inizia utilizzando una nave appositamente attrezzata che effettua perforazioni di ricerca dopo essersi ancorata stabilmente al fondale con un numero elevato di ancore per contenere al massimo i movimenti della nave rispetto al fondale che potrebbero danneggiare le aste di perforazione. Individuato il giacimento si passa alla fase di produzione con piattaforme che poggiano sul fondale e restano operative anche per decenni.

Alla fine dell'attività estrattiva i pozzi, per ogni piattaforma se ne realizzano qualche decina, vengono chiusi, gli impianti ed i prodotti chimici [7] sono recuperati per altre piattaforme o, comunque, portati a terra, le strutture aeree o sommerse, che potrebbero costituire un pericolo per la navigazione, sono rimosse e portate a terra o rilasciate in mare in un sito che è diventato un'area di ripopolamento ittico.

Le fonti d'inquinamento possono essere così riassunte:

- durante la fase di ricerca si ha sicuramente il rima-  
neggiamento dei sedimenti dovuto agli ancoraggi, con  
possibili perdite accidentali di idrocarburi, lo scarico di  
acque reflue civili e il rilascio in mare volontario o  
accidentale di detriti e/o fanghi di perforazione;

- durante la fase di produzione si ha ancora il rima-  
neggiamento dei sedimenti, con le possibili conse-  
guenza appena menzionate; è inoltre possibile il  
rilascio dei prodotti chimici utilizzati sulla piattaforma  
e delle "acque di strato". Sono così definite le acque  
che in percentuale più o meno elevata sono associate  
agli idrocarburi.

Per queste attività, per altro limitate per l'Italia all'alto ed al medio Adriatico, le implicazioni sanitarie sembrano essere poco probabili e riconducibili soltanto al consumo di prodotti ittici contaminati dai prodotti e/o dai reflui eventualmente rilasciati, in quanto la balneazione a ridosso delle piattaforme è vietata così come lo è l'approdo di imbarcazioni che non siano al servizio delle piattaforme. E' tuttavia opportuno tenere presente che sono circa 90 le piattaforme operanti in Adriatico.

### Ripascimento di spiagge

Negli ultimi anni molte spiagge sono soggette a continui fenomeni di erosione con riflessi negativi sull'economia delle zone rivierasche. Tali fenomeni sono riconducibili, su grande scala, alle ridotte quantità di sedimenti che i fiumi portano a mare e, su scala locale, alle recenti realizzazioni [8] di porti turistici che, nei tratti sotto corrente, provocano la deviazione delle correnti costiere e spesso l'arretramento delle spiagge.

Tale situazione può essere contrastata con appositi "pennelli" da terra verso mare o realizzando delle barriere discontinue a poca distanza dalla linea di costa che, creando delle aree di calma, facilitino il mantenimento in questi ambienti delle sabbie portate in sospensione dalle mareggiate e spostate dalle correnti. Purtroppo, talvolta, il tempo di ripristino dell'arenile è di alcuni anni e la granulometria dei materiali che si depositano è mediamente inferiore all'originale, conferendo alla spiaggia così ricostruita una consistenza fangosa quando bagnata e polverosa se asciutta.

Un altro metodo utilizzato consiste nel prelevare dal fondale delle sabbie di granulometria simile a quella del sito da ripascere e di scaricarle direttamente sull'arenile interessato ovvero rilasciarle in mare sotto costa e lasciare che sia il moto ondoso a spostarle gradualmente sulla battigia.

Dal punto di vista tecnico lo scarico sull'arenile si può effettuare prelevando le sabbie del fondale con una pompa rifluente e lanciando tramite una tubatura il misto di acqua ( $\cong 70\%$ ) e sabbia ( $\cong 30\%$ ) sulla battigia; ottenuta la quantità di sabbia desiderata la spiaggia può essere livellata con pale meccaniche. Queste operazioni possono essere realizzate in ogni mese, ma se sono effettuate a ridosso della stagione balneare si possono avere riflessi negativi sulla trasparenza delle acque sino a rendere non idoneo alla balneazione il tratto di costa se le operazioni continuano dopo il 1° aprile quando inizia il periodo di monitoraggio previsto dal DPR n. 470/82.

Il ripascimento sotto costa viceversa può essere effettuato soltanto nella stagione in cui le correnti costiere trasportano sulla battigia le sabbie del fondale: la spiaggia è, così, naturalmente alimentata e non sono necessarie ulteriori operazioni meccaniche sulla riva. Questo tipo di operazioni solitamente viene realizzato a fine inverno e la torbidità provocata non influenza il periodo di monitoraggio prima e di balneazione poi.

Il rischio sanitario associato con il ripascimento delle spiagge è diretto; è importante conoscere il livello di contaminazione delle sabbie del fondale da cui si propone il prelievo non solo dal punto di vista chimico ma soprattutto per la presenza di microrganismi che potrebbero provocare riflessi negativi sulla salute dei frequentatori delle spiagge quali: micosi, otiti, congiuntiviti sino ad affezioni gastroenteriche.

Nel caso di ripascimento la caratterizzazione chimica e chimico-fisica dei materiali da dragare già prevista per i dragaggi portuali dovrebbe essere integrata con quella microbiologica (enterovirus e miceti).

### Dragaggi di ripristino della profondità del porto

I porti si possono insabbiare a causa delle mareggiate, delle correnti o per l'apporto di materiali solidi da terra. La riduzione della profondità del fondale come conseguenza di mareggiate, in genere, riguarda l'imboccatura del porto e nel caso in cui questa arrivi a rendere pericolosa la navigazione può essere attivata la "procedura d'urgenza" per procedere velocemente al ripristino della profondità *quo ante*.

L'insabbiamento per le correnti ha una maggiore gradualità temporale e anch'esso coinvolge in particolare l'area dell'imboccatura del porto.

L'apporto di materiali solidi da terra è più frequente per i porti-canale o per i porti di città rivierasche, a causa dell'immissione dei reflui civili, talvolta non trattati.

Le sabbie che si accumulano all'imboccatura del porto provengono quasi sempre dal mare aperto. Il grado di contaminazione presumibile è basso e può risultare conveniente, a seguito del necessario riscontro della qualità microbiologica, destinarle al ripascimento delle spiagge vicine, qualora ce ne sia la necessità.

Le sabbie che si depositano all'interno del porto di solito sono più contaminate e devono essere scaricate in aree marine già individuate e caratterizzate: come tipologia di fondale, per le correnti e per le risorse ittiche presenti in zona; se non, addirittura, in discariche controllate a terra. I materiali di dragaggio devono essere caratterizzati così come previsto dalle norme tecniche del DM 24 gennaio 1996 (GU 7/2/1996) per quanto non ancora modificato dalla successiva normativa in materia: DL.vo n. 258/2000 e Legge n. 179/2002 art. 21.

Per gli aspetti sanitari correlati con le sabbie destinate al ripascimento si è già detto; per le sabbie scaricate in mare vi può essere il rischio dell'esposizione della fauna e della flora marina agli inquinanti contenuti nei fanghi di dragaggio, soprattutto se l'area di scarico è a ridosso di zone di pesca.

### Nuove opere portuali

Nuove opere possono essere realizzate esternamente ad un porto esistente, ad esempio oltre la diga foranea a costituire un prolungamento della stessa, ovvero all'interno del porto per la creazione di nuove

banchine d'attracco o, infine, per la creazione di un porto *ex novo*. In ogni caso, è possibile prevedere materiali più o meno inquinati a seconda della collocazione dell'area, se interna al porto o in mare aperto. Comunque il destino finale dei materiali dragati dovrà essere stabilito sulla base della caratterizzazione chimica, chimico-fisica e microbiologica da effettuarsi sui fanghi da movimentare.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 23 gennaio 2003.

#### BIBLIOGRAFIA

1. International Juridical Organization. *Protocol for the protection of the Mediterranean Sea against pollution resulting from exploration and exploitation of the sea-bed and its subsoil*. Rome: IJO; June 27 1987.
2. De Wolf P, Baeteman M. Ecological impact of dredged material disposal in Belgian coast waters. In: *Characterisation and treatment of contaminated dredged material. Proceedings of CATS Congress*. Antwerpen (Belgium): Technological Institute of the Royal Flemish Society of Engineers (K VIV); 1991. p. 13-24.
3. Pommepuy M, Guillaud J F, Leguyader F, Dupray E, Cormier M (Ed.). The fate of the bacterial load of dredged sediments. In: *Proceedings of the international seminar on the environmental aspects of dredging activities*. Nantes, 27 nov-1 dec 1989. p. 79-92.
4. Italia. Decreto legislativo 24 gennaio 1996. Direttive inerenti le autorità istruttorie per il rilascio delle autorizzazioni di cui all'art. 11 della Legge 10 maggio 1976, n. 319, e successive modifiche ed integrazioni, relative allo scarico nelle acque del mare o in ambienti ad esso contigui, di materiali provenienti da escavo di fondali di ambienti marini o salmastri o di terreni litoranei emersi, nonché da ogni altra movimentazione di sedimenti in ambiente marino. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 31, 7 febbraio 1996.
5. Italia. Decreto legislativo 28 luglio 1994. Determinazione delle attività istruttorie per il rilascio dell'autorizzazione allo scarico in mare dei materiali derivanti da attività di prospezione, ricerca e coltivazione di giacimenti idrocarburi liquidi e gassosi. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 190, 16 agosto 1994.
6. Italia. Decreto legislativo 18 agosto 2000 n. 258. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale (Suppl.)* n. 246, 20 ottobre 2000.
7. EOSCA, E&P Forum. *Harmonised offshore chemical notification format*. London: E&P Forum; 1994.
8. Italia. Legge 31 luglio 2002, n. 179 art. 21. Disposizioni in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 189, 13 agosto 2002.

*Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorsa GUIDUCCI*

## Origini della contaminazione radioattiva naturale e artificiale dell'ambiente marino

Cristina NUCCETELLI

*Laboratorio di Fisica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - Oltre all'incidente di Chernobyl, che ha causato la più importante contaminazione su scala continentale europea, ancora oggi riscontrabile su matrici ambientali, esistono altre importanti sorgenti di radioattività artificiale e naturale che, soprattutto in passato, hanno avuto un impatto rilevante sull'ambiente e causato un rischio per la salute della popolazione. Dopo una rassegna dei più importanti eventi o processi che hanno determinato l'immissione di radionuclidi nei mari europei, si prende in analisi l'evoluzione dello stato di contaminazione delle acque costiere italiane, sia per quanto riguarda la radioattività artificiale che per la radioattività naturale concentrata in alcune zone del paese come conseguenza di attività industriali non nucleari.

*Parole chiave:* radioattività naturale, radioattività, fall out radioattivo, Chernobyl.

**Summary** (*Sources of natural and artificial radioactive contamination in the marine environment*). - Sources of natural and artificial radioactive contamination in the marine environment. The Chernobyl accident produced the most severe contamination of Europe, still detectable in environmental samples, but many other sources of artificial and natural radioactivity have produced a considerable impact on the environment and a risk for the public health. In this paper a review of the most important events or industrial processes that produced contamination of the European seas is presented; moreover, attention is paid to the situation of the coastal marine environment in Italy as regards the artificial radioactivity and the human enhanced radioactivity produced by non nuclear plants.

*Key words:* natural radioactivity, radioactivity, radioactive fall out, Chernobyl.

### Introduzione

La contaminazione radioattiva delle acque costiere, come dell'ambiente in genere, è il risultato di diversi processi alcuni dei quali, comunque presenti, sono di origine naturale; dopo il 1945, si è assistito alla comparsa della radioattività artificiale (o antropica), dispersa nell'ambiente in conseguenza dell'uso pacifico e militare dell'energia nucleare. In questa rassegna sullo stato di contaminazione radioattiva delle acque costiere si intende offrire una panoramica della evoluzione della situazione globale, europea e italiana negli ultimi venti anni. Verranno infatti riportati i dati relativi alle importanti contaminazioni artificiali del Mare del Nord, dell'Atlantico nord occidentale e del Mediterraneo. Per finire, sarà illustrata anche la situazione italiana, compreso un interessante ed emblematico caso di contaminazione da radioattività naturale "human enhanced".

### La radioattività ambientale

#### *La radioattività naturale*

Passando rapidamente in rassegna le origini della contaminazione ambientale, si deve ricordare che la radioattività naturale, mediamente la fonte di esposizione radiologica più importante per l'uomo [1], ha a sua volta due origini, una cosmica e una terrestre. Al primo tipo appartengono i radionuclidi cosmogenici, prodotti dalle reazioni nucleari dovute all'interazione tra i raggi cosmici (provenienti dal Sole e dalla galassia) ed elementi presenti nell'atmosfera. Questi radionuclidi, tra cui i più abbondanti sono  $^{40}\text{K}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{10}\text{Be}$ ,  $^7\text{Be}$  e  $^{26}\text{Al}$ , raggiungono la superficie del mare per deposizione dall'atmosfera. Di origine terrestre sono invece i radionuclidi primordiali, così chiamati perché risalenti alla formazione del sistema solare; questi radionuclidi ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$ ), che sono presenti nella crosta terrestre in diverse concentrazioni

di attività, con il decadimento radioattivo danno origine a “famiglie” di radionuclidi che possono essere movimentati dalle acque di dilavamento delle rocce e, attraverso i fiumi, raggiungere il mare.

#### *La radioattività artificiale*

La radioattività artificiale, come già accennato, si è diffusa nell’ambiente a seguito della utilizzazione massiccia, e su scala planetaria, dell’energia nucleare per uso pacifico e non.

La vastità e l’entità delle contaminazioni ambientali si sono rivelate fortemente dipendenti dal tipo e dal numero di eventi che le hanno determinate. Infatti, la dispersione di radionuclidi artificiali dipende dal tipo di rilascio che, come vedremo, può essere conseguenza di un incidente o, invece, essere previsto nell’ambito dell’attività nucleare.

Tipico degli eventi incidentali è il *rilascio acuto*; tra gli esempi più rilevanti si possono ricordare l’incidente di Chernobyl, nell’aprile del 1986, e il rientro in atmosfera del satellite TRANSIT 5BN-3, con conseguente vaporizzazione del combustibile nucleare, nel 1964. Lo stesso tipo di rilascio ha caratterizzato la ricaduta di radioattività artificiale a seguito di test nucleari in atmosfera. Negli anni '50 e '60 sono state provocate numerose esplosioni che, con minore frequenza, sono state effettuate fino all’ultimo test, avvenuto nel 1980 in Cina. A seguito del bando da parte della comunità internazionale, formalizzato nel 1996 con il Trattato di Proibizione Totale delle esplosioni nucleari (*Comprehensive Test Ban Treaty*), gestito dall’Organizzazione delle Nazioni Unite, non si prevede che questo tipo di eventi possa ripetersi.

I rilasci acuti di origine incidentale o bellica finora citati, essendo provocati da esplosioni nucleari avvenute negli strati alti dell’atmosfera, hanno avuto un impatto sull’ambiente su scala mondiale o conti-

mentale. Con dispersioni a carattere più locale sono state invece le contaminazioni causate da diversi incidenti di trasporto di materiale nucleare.

Di altro tipo sono i *rilasci continui*, normalmente prodotti in condizioni di esercizio di impianti nucleari di diversa potenza e di altri utilizzatori di materiale radioattivo; infatti in questo caso le principali sorgenti di contaminazione sono gli scarichi controllati da impianti di potenza e di riprocessamento e gli scarichi controllati da impianti di ricerca e da ospedali. Anche in questi casi, come per gli incidenti di trasporto, le conseguenze sono territorialmente limitate, anche se, come vedremo, si sono verificate situazioni che, pur non avendo un impatto globale, hanno determinato la contaminazione di interi ecosistemi. Si deve sottolineare che nel tempo una sempre crescente attenzione agli aspetti radioprotezionistici e ambientalisti ha fatto sì che l’impatto ambientale dell’attività di impianti nucleari di vario tipo si sia andato riducendo, come verrà mostrato in un esempio particolarmente evidente.

#### *Radioattività naturale “human enhanced”*

Infine vale la pena di menzionare la *radioattività naturale “human enhanced”*, dove con questo termine si intende il risultato di un insieme di processi nell’ambito di attività industriali non nucleari, che portano alla produzione di sostanze, solitamente residui, in cui si verifica una tale concentrazione di radionuclidi naturali, quali  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  e  $^{210}\text{Po}$ , da costituire un rischio dal punto di vista radiologico. Un esempio di queste attività industriali sono tipicamente le miniere, gli impianti di lavorazione dei fosfati e le centrali a carbone. Inoltre, bisogna sottolineare che per il  $^{210}\text{Po}$  il fattore di dose per ingestione è particolarmente elevato, come risulta dal confronto con quello del  $^{137}\text{Cs}$  [2, 3]. Peraltro, dalla Tab. 1, si vede come pesci,

**Tabella 1.** - Coefficienti di dose per ingestione dei radionuclidi artificiali ( $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{103}\text{Ru}$  e  $^{106}\text{Ru}$ ) e naturali ( $^{210}\text{Po}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  e  $^{226}\text{Ra}$ ) più diffusi nell’ambiente. Nelle ultime tre colonne sono riportati i relativi fattori medi di concentrazione per i prodotti ittici [2, 3]

Radionuclide	Coefficienti di dose Sv/Bq		Fattore di concentrazione (CF)		
	Bambini (10 anni)	Adulti	Pesce	Crostacei	Molluschi
$^{137}\text{Cs}$	$1,0 \cdot 10^{-8}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	100	30	30
$^{134}\text{Cs}$	$1,9 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^{-8}$			
$^{103}\text{Ru}$	$1,5 \cdot 10^{-9}$	$7,3 \cdot 10^{-10}$	2	100	2 000
$^{106}\text{Ru}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$7,0 \cdot 10^{-8}$			
$^{210}\text{Po}$	$2,6 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	2 000	50 000	10 000
$^{210}\text{Pb}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$7,0 \cdot 10^{-7}$	200	1 000	1 000
$^{226}\text{Ra}$	$8,1 \cdot 10^{-7}$	$2,8 \cdot 10^{-7}$	500	100	1 000

CF: Fattore di concentrazione = Bq kg<sup>-1</sup> peso fresco/ Bq l<sup>-1</sup>acqua di mare.

molluschi e crostacei concentrano in modo molto efficiente la contaminazione presente nell'acqua nel caso, in particolare, del  $^{210}\text{Po}$ , ma anche per il  $^{210}\text{Pb}$  e il  $^{226}\text{Ra}$ . La concomitanza di questi due fattori, elevato fattore di dose ed efficiente meccanismo di concentrazione, fa sì che in particolari condizioni di contaminazione alcuni radionuclidi naturali, quale il  $^{210}\text{Po}$ , possano causare dosi considerevoli a gruppi critici della popolazione, per esempio i forti consumatori di prodotti ittici.

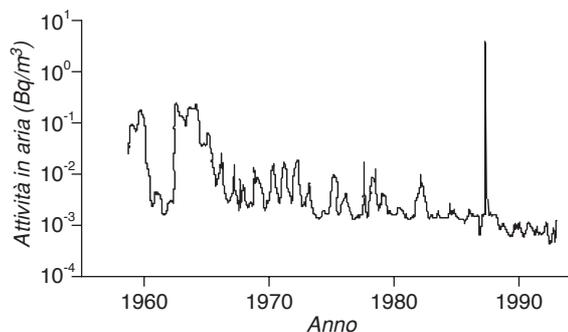
#### *Valutazione delle dosi prodotte dalla contaminazione marina*

A questo proposito, può essere utile riportare le valutazioni effettuate nell'ambito del progetto di ricerca coordinato dal Marine Environment Laboratory della IAEA (International Atomic Energy Agency) dal 1989 al 1993 e intitolato "Sources of Radioactivity in the Marine Environment and their Relative Contribution to Overall Dose Assessment from Marine Radioactivity (MARDOS)" [4]. Infatti, obiettivo del progetto era quello di raccogliere i dati disponibili in letteratura ed eseguire nuove misure di concentrazione di  $^{137}\text{Cs}$  e  $^{210}\text{Po}$  nelle acque di mare e nei prodotti ittici. Questa attività era finalizzata a fornire i dati necessari alla stima della dose ricevuta dalla popolazione mondiale per ingestione di  $^{137}\text{Cs}$  e  $^{210}\text{Po}$  a seguito del consumo di prodotti ittici nel 1990 [3]. I risultati sono stati ovviamente condizionati dalla qualità e quantità di informazioni disponibili relativamente alla contaminazione delle acque marine e, quindi, dei prodotti ittici. Infatti, nel caso del  $^{210}\text{Po}$ , i dati sono risultati scarsi ma uniformi, quindi le stime di dose sono state effettuate in base ai consumi. Invece per il  $^{137}\text{Cs}$  sono stati raccolti dati molto più numerosi e affidabili che hanno evidenziato zone di maggiore contaminazione. In particolare, sono stati individuati il bacino del Mediterraneo, per la ricaduta radioattiva conseguente all'incidente di Chernobyl, e l'Atlantico nord occidentale, contaminato principalmente, come si vedrà in seguito, dagli scarichi di Sellafield negli anni '70 e '80. La valutazione della dose ricevuta dalla popolazione mondiale a seguito del consumo di prodotti ittici ha comunque evidenziato che il contributo principale è dovuto al  $^{210}\text{Po}$ , la cui ingestione ha determinato, nel 1990, una dose collettiva di 2900 Sv persona per le popolazioni del Nord Europa e di 700 Sv persona per quelle del Mediterraneo [5]. La dose collettiva dovuta alla presenza di  $^{137}\text{Cs}$  è risultata molto inferiore, rispettivamente pari a 86 Sv persona e 6 Sv persona per i due gruppi di popolazione. Si deve comunque sottolineare che queste stime sono affette da notevoli incertezze che, per quanto riguarda il  $^{137}\text{Cs}$ , sono dell'ordine del 50%, mentre per il  $^{210}\text{Po}$  possono essere anche un fattore 5. Non esistono valutazioni basate su dati

aggiornati a questi ultimi anni ma, presumibilmente, la situazione non dovrebbe essere cambiata sostanzialmente per quanto riguarda il  $^{210}\text{Po}$ , mentre per il  $^{137}\text{Cs}$  ci si aspetta una riduzione generale delle concentrazioni nel mare e, quindi, della dose collettiva. Queste considerazioni vengono peraltro confermate da uno studio [6] che, proiettando all'anno 2000 i dati di concentrazione nel mare riportati dal progetto MARDOS, ottiene per le popolazioni del Nord Europa una dose collettiva, per consumo di prodotti ittici, di 56 Sv persona per l'ingestione di  $^{137}\text{Cs}$  e di circa 3000 Sv persona per l'ingestione di  $^{210}\text{Po}$ ; per le popolazioni del bacino del Mediterraneo, i valori stimati per i due radionuclidi risultano rispettivamente pari a 5 Sv persona e circa 1000 Sv persona.

#### **Contaminazione delle acque costiere su scala mondiale e continentale**

Come già accennato, a partire dal 1945 fino al 1980 [1], sono stati eseguiti 543 test nucleari in atmosfera che hanno provocato il rilascio di enormi quantità di radioattività nell'ambiente e, finora, hanno costituito la più importante fonte di esposizione da radionuclidi artificiali per la popolazione mondiale. Dalla Fig. 1 [7], che riporta i risultati di misure di radioattività beta del particolato atmosferico misurata in Italia, emerge quanto dagli anni '50, con un picco dal 1952 al 1958 e dal 1961 al 1962, i test militari abbiano provocato la deposizione nell'ambiente globale, e quindi anche nel mare, di quantità considerevoli di radioattività artificiale. L'UNSCEAR (United Nation Committee on the Effects of Atomic Radiation) [8] stima che le quantità totali di  $^{90}\text{Sr}$  depositate siano state pari a  $46 \times 10^{16}$  Bq nell'emisfero settentrionale e  $14,4 \times 10^{16}$  Bq in quello meridionale. Nella Fig. 1 si può comunque rilevare che dopo il 1963, anno del Trattato per il Bando parziale dei test nucleari eseguiti in aria, mare e spazio, le esplosioni in atmosfera effettuate dai paesi che non aderirono al trattato (per es. Cina, Francia, India,



**Fig. 1.** - Valori medi di concentrazione di radioattività beta in aria misurata in Italia dagli anni '50 fino al 1992 [7].

Pakistan) furono relativamente poche. Sempre in Fig. 1 si vede il segnale prodotto dall'incidente di Chernobyl, che per l'Europa ha rappresentato un evento dalle conseguenze molto rilevanti e di cui ancora oggi sono riscontrabili i segni nell'ambiente. Di questo si parlerà anche in seguito.

### Contaminazione artificiale in Europa

Negli anni '70 e '80 si è assistito allo sviluppo e all'utilizzo sempre più diffuso dell'industria nucleare. Questo processo non è stato però sempre accompagnato da una analoga evoluzione dell'atteggiamento radioprotezionistico delle industrie del settore. Ciò ha prodotto particolari condizioni di contaminazione delle acque costiere in prossimità di grandi impianti di riprocessamento. Allo scopo di quantificare lo stato di contaminazione dei mari europei e per tentare una stima della dose alla popolazione, furono intraprese due iniziative, promosse e finanziate dall'Unione Europea. La prima, alla fine degli anni '80, fu "Marina Project. The radiological exposure of the population of the European Community from radioactivity in North European marine waters" per il Nord Europa [9], seguita, nei primi anni '90, dal "Marina Med Project. The radiological exposure of the population of the European Community to radioactivity in the Mediterranean Sea" per il Mare Mediterraneo [10]. Di seguito vengono riportati i risultati più significativi di questi studi.

#### Nord Europa

Nei mari che lambiscono le coste dell'Europa nord occidentale (Nord Est Atlantico, Mare d'Irlanda, Mare di Norvegia) è stato riscontrato un livello allarmante di inquinamento radioattivo, generato dagli scarichi imponenti degli impianti di riprocessamento del combustibile nucleare. In particolare, l'impianto di Sellafield, situato sulla costa occidentale dell'Inghilterra, ha causato la contaminazione del mare d'Irlanda che, all'inizio degli anni '80, raggiunse valori fino a 1600 Bq/m<sup>3</sup> per il <sup>137</sup>Cs; in conseguenza di ciò i prodotti ittici presentavano una contaminazione di circa 200 Bq/kg. Successivamente, furono intraprese più efficaci misure radioprotezionistiche che portarono all'abbassamento dei livelli di contaminazione delle acque costiere. In Fig. 2 e 3 sono riportati gli andamenti delle concentrazioni di attività di <sup>137</sup>Cs nelle acque costiere e nei pesci del mare d'Irlanda dal 1980 al 1985. In base a questi dati fu stimato che il gruppo critico della popolazione, cioè i grandi consumatori di prodotti ittici, erano arrivati a ricevere una dose, solo per ingestione di <sup>137</sup>Cs, fino a 0,4 mSv all'anno. Tenendo conto anche degli altri radionuclidi artificiali introdotti nell'ambiente marino, quali <sup>106</sup>Ru, <sup>239</sup>Pu, <sup>240</sup>Pu, per gli abitanti della zona di Sella-

field forti consumatori di pesce la dose annua è stata stimata intorno ai 2mSv all'anno, dal 1977 al 1986.

Un altro contributo importante alla dose delle popolazioni dell'Europa settentrionale è stato individuato, nell'ambito del progetto Marina, provenire dal <sup>210</sup>Po. Infatti, sono state riscontrate concentrazioni anomale di questo radionuclide in matrici marine (sedimenti e mitili) provenienti dalle zone costiere di Inghilterra, Irlanda, Olanda e Francia in corrispondenza di insediamenti industriali che producevano rilasci di fosfogessi, quali impianti di trasformazione e produzione di fosfati, nelle vicinanze di scarichi di centrali a carbone e dell'impianto di riprocessamento di Sellafield. Poiché, come già sottolineato in precedenza, sia il fattore di dose per ingestione che l'accumulo nei prodotti ittici del <sup>210</sup>Po sono di gran lunga superiori a quelli, per esempio, del <sup>137</sup>Cs e del <sup>226</sup>Ra, è stata stimata, per le popolazioni residenti, una dose efficace di 2 mSv all'anno per il consumo di frutti di mare.

Poiché lo stato di contaminazione di quei mari è presumibilmente molto cambiato in questi ultimi 15 anni, in ambito europeo è in programma un nuovo progetto, Marina Project II, allo scopo di aggiornare il quadro della situazione.

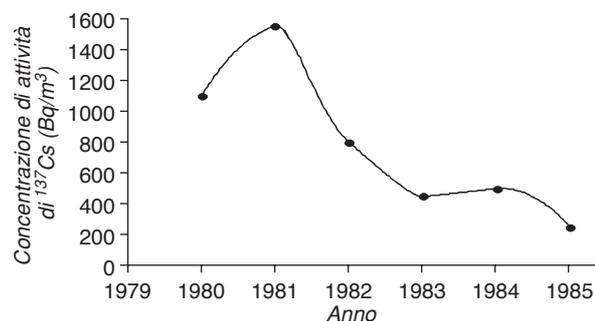


Fig. 2. - Valori medi annuali di concentrazione di attività (Bq/m<sup>3</sup>) di <sup>137</sup>Cs nelle acque costiere del mare d'Irlanda dal 1980 al 1985 [9].

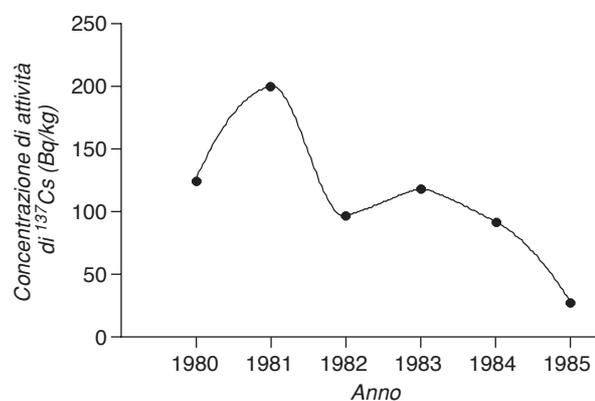


Fig. 3. - Valori medi annuali di concentrazione di attività (Bq/kg) di <sup>137</sup>Cs nel pesce del mare d'Irlanda dal 1980 al 1985 [9].

*Mediterraneo*

Il Mar Mediterraneo ha ovviamente raccolto la contaminazione prodotta dalla ricaduta dei test nucleari i quali, come è stato detto, hanno avuto un impatto globale. Naturalmente anche l'incidente di Chernobyl ha contribuito alla contaminazione del Mediterraneo. Come già accennato, seguendo le orme del progetto MARINA, relativo allo studio delle contaminazioni dei mari dell'Europa settentrionale, all'inizio degli anni '90 fu finanziato dalla Comunità Europea il progetto Marina Med per studiare, come dice il titolo esteso del progetto, "The radiological exposure of the European Community to radioactivity in the Mediterranean Sea". A questo scopo furono raccolti tutti i dati di concentrazione di  $^{137}\text{Cs}$  disponibili per i 10 bacini in cui fu suddiviso il mare Mediterraneo (Tab. 2). Dall'analisi dei dati emerse che, oltre alla contaminazione dovuta direttamente alla nube di Chernobyl, il Mediterraneo riceveva, e tuttora riceve, radioattività dal Mar Nero che raccoglie le acque di bacini altamente contaminati dagli impianti russi e ucraini. Infatti, dai valori riportati in Tab. 2, si può vedere che all'inizio degli anni '90 la concentrazione di attività di  $^{137}\text{Cs}$  nelle acque del Mediterraneo, pur risultando abbastanza omogenea, mostrava un andamento decrescente da est a ovest; inoltre, il valore medio della concentrazione di attività di  $^{137}\text{Cs}$  relativa al Mar Nero risultava circa dieci volte più alta di quella media del Mediterraneo, rivelando il ruolo di sorgente di contaminazione radioattiva del Mar Nero. E' stato comunque stimato che l'incidente di Chernobyl abbia portato la concentrazione di  $^{137}\text{Cs}$  nel Mediterraneo a livelli fino a tre ordini di grandezza superiori rispetto a quelli prima dell'incidente.

Esistono molti impianti nucleari i cui scarichi controllati confluiscono nel Mediterraneo. Probabilmente il più importante è stato il complesso di Marcoule, in Francia, situato sulle rive del Rodano a circa 100 km dal delta sul Mediterraneo. Gli scarichi del complesso di Marcoule hanno prodotto una contaminazione rilevabile del golfo di Lione. Questo sito comprendeva impianti di riprocessamento, reattori militari per la produzione di plutonio e trizio, due reattori di potenza (Phoenix e Melox) e diversi impianti di ricerca. Negli anni '90 i reattori militari e l'impianto di riprocessamento sono stati disattivati e si sta procedendo allo smantellamento e recupero del sito. Come risulta anche da recenti rilevamenti [11], come conseguenza degli scarichi di Marcoule, nelle acque del Rodano sono riscontrabili contaminazioni da prodotti di fissione (per es.  $^{137}\text{Cs}$  e  $^{90}\text{Sr}$ ), di attivazione (per es.  $^{60}\text{Co}$  e  $^{54}\text{Mn}$ ) e da elementi transuranici (per es.  $^{239}\text{Pu}$  e  $^{241}\text{Am}$ ): i risultati delle misure sono comunque tali da non prefigurare rischi per l'ambiente e per l'uomo.

**Tabella 2.** - Concentrazione di attività di  $^{137}\text{Cs}$  da dati relativi al 1990 nei dieci bacini in cui è stato diviso il Mare Mediterraneo per il progetto Marina Med [10]

Bacini del Mar Mediterraneo	Acqua di mare (Bq/m <sup>3</sup> )	Sedimenti (Bq/kg)
Mare d'Alboran	3,9 *	-
Bacino Algerino	4,3 ± 1,0	6,7 ± 0,4
Bacino Liguro-Provenzale	6,5 ± 2,3	5,7 ± 1,9
Mare Tirreno	4,7 ± 0,2	3,4 ± 0,7
Mare Ionio	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,2
Mare Adriatico	5,6 ± 0,1	15 ± 13
Mare Libico	3,8 **	-
Mare Egeo	9 ± 4**	4,9 ± 2,9**
Mare di Cipro	9 ± 3**	-
Bacino Levantino	7 ± 3**	-
Valore medio	5,7 ± 2,1	6,5 ± 4,4
Mar Nero	52 ± 1	164 ± 100

\* dati del 1991; \*\* dati del 1993.

**Contaminazione dei mari italiani**

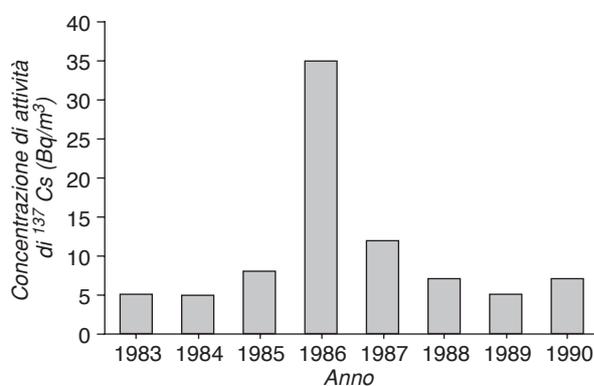
Fin dagli anni '50, la contaminazione radioattiva delle coste italiane è controllata con prelievi di acqua, sedimenti e prodotti ittici in punti che permettono di dare un panorama nazionale dello stato delle coste (Fig. 4). In passato, questi rilevamenti consentivano anche il controllo degli scarichi delle centrali nucleari, che hanno operato fino al 1987, anno del referendum popolare che sancì la sospensione dell'utilizzo dell'energia nucleare in Italia. L'organizzazione attuale prevede che, come per altre matrici, il rilevamento della radioattività nei mari italiani sia effettuato dalle Reti Nazionali di Sorveglianza della Radioattività ambientale, con il coordinamento tecnico dell'ANPA. Alle Reti partecipano le ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale) e altri istituti, quali l'ENEA, diverse università e alcuni PMIP (Presidi Multizonali di Igiene e Prevenzione) [12].

La contaminazione da radionuclidi artificiali delle acque italiane ha, ovviamente, diverse origini. Infatti, anche nei mari italiani sono state rilevate le conseguenze del fall out e, nel 1986, dell'incidente di Chernobyl, senza contare eventi locali di minore o maggiore entità. L'andamento nel tempo del valore medio della contaminazione delle acque costiere italiane dal 1983 al 1990 è molto ben rappresentata in Fig. 5 [13] dove è individuabile il picco di concentrazione di attività di  $^{137}\text{Cs}$  in corrispondenza dell'incidente di Chernobyl.

Per alcuni degli anni successivi, nelle Tab. 3 e 4 sono riportati i risultati delle misure di concentrazione di attività di  $^{137}\text{Cs}$  su campioni di acqua marina e di sedimenti, prelevati nelle diverse località della rete di



**Fig. 4.** - Località di prelievo delle acque costiere e dei sedimenti marini sul territorio italiano appartenenti alle Reti nazionali di sorveglianza della radioattività ambientale.



**Fig. 5.** - Valori medi annuali di concentrazione di attività ( $\text{Bq}/\text{m}^3$ ) di  $^{137}\text{Cs}$  nei mari italiani dal 1983 al 1990 [13].

monitoraggio [12, 13]; in Tab. 3, e solo per le acque costiere, sono riportati anche i dati relativi alla contaminazione da  $^{90}\text{Sr}$ , la cui misurazione, cominciata a partire dal 1993, richiede tecniche di radiochimica piuttosto lunghe ed elaborate [12]. Per quanto riguarda il  $^{137}\text{Cs}$ , di cui è qui stata riportata solo una piccola parte dei dati costituenti una lunga serie storica di misure, dalla Fig. 5 e dalla Tab. 3 si può osservare che, attualmente, i valori di concentrazione di attività si sono attestati a livelli simili a quelli precedenti l'incidente di Chernobyl, come confermato anche dal valore medio di concentrazione delle acque

costiere per il 1998, risultato pari a  $2,8 \pm 0,6 \text{ Bq}/\text{m}^3$  [14]. Anche se il numero di misure di  $^{137}\text{Cs}$  effettuate ogni anno risulta piuttosto esiguo (Tab. 3 e 4), utilizzando questo radionuclide come indicatore della presenza di radioattività artificiale, sembra si possa dire che, in assenza di eventi che apportino nuovi contributi, la contaminazione delle coste italiane è pressoché stazionaria.

Per quanto riguarda la radioattività naturale "human enhanced", anche in Italia esiste un caso emblematico di come un'industria non nucleare possa avere un impatto radiologico sull'ambiente, e quindi sull'uomo.

#### *La Laguna Veneta*

All'inizio degli anni '60 Porto Marghera diventò sede di un importante polo industriale chimico e petrolchimico. In particolare, per diversi decenni vi ha avuto sede un'industria per la produzione di acido fosforico; questo composto è elemento base per l'industria di fertilizzanti e viene utilizzato anche in altri settori (per es. chimico e alimentare). I rifiuti prodotti da questa industria, principalmente fosfogessi, sono stati smaltiti nella discarica di Passo a Campalto nella Laguna Veneta. L'attività di smaltimento è stata particolarmente intensa dalla metà degli anni '60 fino alla fine degli anni '70, provocando una grave contaminazione di quella zona della Laguna. Ciò è potuto avvenire anche perché, in quegli anni, non si aveva consapevolezza dei rischi associati alla presenza di radioattività naturale nei fosfogessi.

Nel 1998 l'ANPA e l'ARPA del Veneto hanno intrapreso uno studio preliminare, conclusosi l'anno successivo, per determinare lo stato di contaminazione delle acque e dei prodotti ittici della Laguna. I risultati del lavoro, i cui dettagli sono ampiamente riportati nella relativa pubblicazione [15], indicano che, come aspettato, la concentrazione di attività di  $^{210}\text{Pb}$  e  $^{210}\text{Po}$  nei sedimenti della Laguna diminuisce all'aumentare della distanza dalla zona di scarico dei fosfogessi. Un risultato che merita invece ulteriori approfondimenti è quello relativo alla contaminazione riscontrata nei molluschi, che aumenta allontanandosi dalla sorgente di contaminazione. Per spiegare questo andamento sono probabilmente necessari ulteriori studi sui meccanismi di trasporto e sulle correnti di questa zona della laguna.

#### **Conclusioni**

L'ambiente marino costiero, anche per ciò che riguarda la radioattività, risente fortemente delle attività umane, soprattutto quando, come in passato, è stata riservata poca attenzione al problema degli

**Tabella 3.** - Concentrazione di attività (Bq/m<sup>3</sup>) di <sup>137</sup>Cs e <sup>90</sup>Sr nelle acque costiere italiane [12, 13]

Località prelievo	1990 (media = 7,1)			1994 (media = 3,0)			1997 (media = 3,4)		
	Misure (n.)	Min	Max	Misure (n.)	Min	Max	Misure (n.)	Min	Max
<b><sup>137</sup>Cs</b>									
Cesenatico	2	8,7	8,9	2	2,9	3,4	2	3,0	3,1
La Maddalena	1	4,4		3	0,1	3,4	2	3,6	4,0
La Spezia	2	4,3	5,6	2	2,9	3,2	2	2,6	3,9
Napoli	1	4,8		2	3,1	3,2	-	-	-
Taranto	1	11,3		4	2,8	3,6	-	-	-
Venezia	2	6,9	10,7	2	3,3	3,5	2	3,0	4,3
<b><sup>90</sup>Sr</b>									
Cesenatico				2	1,1	1,7	2	1,1	2,0

**Tabella 4.** - Concentrazione di attività (Bq/kg peso secco) di <sup>137</sup>Cs nei sedimenti marini prelevati in diversi punti delle coste italiane [12]

Località prelievo	1994 (media =10,0)			1997 (media = 6,5)		
	Misure (n.)	Min	Max	Misure (n.)	Min	Max
Cattolica	2	6,2	6,4	2	5,3	5,7
Cesenatico	5	5,7	11,0	6	2,4	7,1
Goro	2	26,4	33,4	2	5,4	8,5
La Maddalena	15	0,4	6,6	6	0,6	8,5
La Spezia	3	1,1	10,3	3	7,0	9,1
Lido Adriano	3	8,1	14,5	2	5,9	10,7
Napoli	3	0,6	2,6	-	-	-
Porto Garibaldi	6	1,4	30,8	5	1,1	32,6
Rovigo	4	9,4	22,3	-	-	-
Taranto	3	2,2	7,1	-	-	-
Venezia	26	0,3	45,8	4	0,3	4,3

scarichi industriali sia nucleari che “convenzionali”. Al momento attuale la contaminazione da radioattività artificiale, sia a livello mondiale che nazionale, non sembra comunque essere tale da destare preoccupazione per l’ambiente e quindi per l’uomo, anche se esistono situazioni critiche, come il Mar Nero o alcuni bacini del Nord Europa. Dalla rapida rassegna presentata risulta però che la componente naturale della radioattività nelle acque marine riveste un ruolo predominante nel causare dose alla popolazione. Questa dovrebbe spingere ad ampliare e approfondire il monitoraggio di bacini che, per la costituzione dei fondali o per la presenza di attività industriali (ad es. Laguna Veneta), siano caratterizzati da elevate concentrazioni di radionuclidi naturali.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

#### BIBLIOGRAFIA

1. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *Sources and effects of ionising radiation*. New York: UNSCEAR, United Nations. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes; 2000.
2. International Commission on Radiological Protection. Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 2 ingestion dose coefficients. ICRP Publication 67. *Ann ICRP* 1993;23(3/4).
3. IAEA. *Sediment Kd, and concentration factors for radionuclides in the marine environment*. Vienna: IAEA; 1985. (IAEA Technical Report Series, 247).
4. IAEA. *Sources of radioactivity in the marine environment and their relative contribution to overall dose assessment from marine radioactivity*. Vienna: IAEA; 1995. (IAEA TECDOC Series, 838).
5. Aarkrog A, Baxter MS, Bettencourt AO, Bojanowski R, Bologna A, Charmasson S, Cunha I, Delfanti R, Duran E, Holm E,

- Jeffrey R, Livingston HD, Mahapanyawong S, Nies H, Osvath I, Pingyu L, Povinec PP, Sanchez A, Smith JN, Swift D. A comparison of doses from  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{210}\text{Po}$  in marine food: a major international study. *J Environ Radioactivity* 1997;34(1):69-90.
6. Livingston HD, Povinec PP. Anthropogenic marine radioactivity. *Ocean Coastal Management* 2000;43:689-712.
  7. ANPA. *Rapporto annuale sulla radioattività ambientale in Italia vol 1 - Reti Nazionali 1992*. Ingarrica A, Mancioffi S (Ed.). Roma: ANPA; 1995. (Pubblicazione ANPA-ARA-RAM/01/95).
  8. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *Sources and effects of ionising radiation*. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. New York: UNSCEAR, United Nations; 1993.
  9. CEC. *The radiological exposure of the population of the European Community from radioactivity in North European marine waters - Project "Marina"*. Luxembourg: Commission of the European Communities; 1990. (Report no. EUR 12483).
  10. EC. *The radiological exposure of the population of the European Community to radioactivity in the Mediterranean Sea, Marina-Med Project*. Brussels: European Commission; 1994. (Report no. EUR 15564 EN).
  11. St-Pierre S, Chambers DB, Lowe LM, Bontoux JG. Screening level dose assessment of aquatic biota downstream of the Marcoule nuclear complex in Southern France. *Health Phys* 1997;77(3):313-21.
  12. ANPA. *Reti di sorveglianza della radioattività ambientale in Italia 1994-1997*. Belli M, Notaro M, Rosamilia S, Sansone U (Ed.). Roma: ANPA; 1999. (Stato dell'Ambiente 3/99).
  13. ENEA/DISP. *Rapporto annuale sulla radioattività ambientale in Italia, vol 1 - Reti Nazionali 1990*. Ingarrica A, Mancioffi S (Ed.). Roma: ENEA/DISP; 1992. (Pubblicazione DISP-ARA-RAM/01/92).
  14. ANPA. *Reti di sorveglianza della radioattività ambientale in Italia 1998*. Roma: ANPA; 2002. (Stato dell'Ambiente 6/2001).
  15. ANPA. *Le discariche di fosfogessi nella laguna di Venezia: valutazioni preliminari dell'impatto radiologico*. Roma: ANPA; 2000. (Stato dell'ambiente 8/2000).

*Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorsa GUIDUCCI*

## La presenza di microcontaminanti organici persistenti in organismi del Mar Mediterraneo e il rischio correlato

Alessandro DI DOMENICO e Roberto MINIERO

*Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - I microcontaminanti organici persistenti sono stati oggetto di una convenzione mondiale che dovrebbe determinare la loro riduzione o eliminazione dalle emissioni di origine antropogenica. La loro presenza e i livelli riscontrati, però, negli organismi marini del Mar Mediterraneo possono destare attualmente qualche preoccupazione. La valutazione di rischio preliminare presentata per i contaminanti ad azione diossina-simile, infatti, evidenzia apparentemente alcune situazioni di attenzione per gli organismi che appartengono ai livelli più elevati della rete alimentare. Ad esempio, nelle uova di una specie di squalo i livelli di PCB ad azione diossina-equivalente risultano di un ordine di grandezza superiore alla soglia per effetti embriotossici rilevati in laboratorio su una specie di pesce. I mammiferi marini, in aggiunta, sembrano particolarmente sensibili ai livelli di POP presenti nei loro tessuti. La loro sensibilità a agenti patogeni sembra aumentata negli organismi che mostrano i livelli più elevati di questi microcontaminanti.

*Parole chiave:* microcontaminanti organici persistenti, Mar Mediterraneo, Convenzione di Stoccolma, valutazione di rischio.

**Summary** (*Persistent organic micropollutants in Mediterranean organisms and risk associated*). - Persistent organic pollutants are object of a global treaty between governments, including measures to reduce or eliminate their release in the environment. Their presence and levels found in some organisms of the Mediterranean Sea appear to give some concern. The preliminary risk assessment presented here, in fact, for dioxin-like action chemicals, shows a potential hazard for species belonging to higher levels of the food web. For example, in the eggs of a Mediterranean shark species, dioxin-like action PCBs concentration levels are one magnitude order higher than the No Observed Effect Level, evaluated on eggs of a laboratory fish species. Marine mammals, in addition, appear particularly sensitive to tissue levels of POPs. Their sensitivity to specific pathogenic organisms appears increased in specimen showing higher levels of these microcontaminants.

*Key words:* persistent organic micropollutants, Mediterranean Sea, Stockholm Convention, risk assessment.

### Introduzione

Numerosi fattori predispongono il Mar Mediterraneo al rischio chimico per gli organismi in esso presenti. E' un mare tendenzialmente chiuso, con un bacino molto profondo e con un ridotto ricambio di acqua di mare proveniente essenzialmente dall'Oceano Atlantico e, in misura molto minore, dal Mar Nero. Un ridotto regime tidale, inoltre, rallenta la degradazione e la diffusione dei contaminanti flottanti o adesi al particolato. Questi fattori contribuiscono in maniera significativa ad aumentare i tempi di residenza dei contaminanti chimici e a favorirne l'accumulo.

I microcontaminanti organici persistenti, oggetto di questa rassegna, sono un gruppo molto eterogeneo di inquinanti comprendenti insetticidi clorurati (per

esempio, DDT, p,p'-diclorodifeniltricloroetano; DDE, p,p'-diclorodifenildicloroetilene; HCB, esaclorobenzene), fenoli clorurati (per esempio, PCP, pentaclorofenolo), policlorobifenili (PCB), policloronaftaleni (PCN), polibromodifenili (PBB), polibromodifenileteri (PBDE), policloro-p-dibenzodiossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF). La loro presenza in matrici ambientali è dovuta al loro uso da parte dell'uomo (pesticidi clorurati, PCN, PBB, PBDE) o alla loro produzione involontaria, come risultato di processi industriali di sintesi chimica, processi di combustione (PCDD, PCDF), ecc. Su un sottogruppo di questi contaminanti (quelli più diffusi e tossicologicamente più rilevanti) sono state stipulate una serie di convenzioni intergovernative, concluse con la Convenzione di Stoccolma (22 maggio 2001) - un trattato

globale per proteggere la salute umana e l'ambiente dai microcontaminanti organici persistenti, adottato da parte dei singoli stati, finalizzato a intraprendere misure per eliminare o ridurre a livelli non pericolosi le emissioni di queste sostanze chimiche nell'ambiente [1].

Questi contaminanti, infatti, possiedono caratteristiche chimico-fisiche tali che consentono loro di rimanere nell'ambiente per lunghi periodi di tempo, di essere distribuiti ampiamente dal punto di vista geografico, di accumularsi nella componente lipidica degli organismi viventi e di risultare tossici per l'uomo e per la fauna selvatica.

In questa rassegna, sono stati presi in considerazione i livelli di alcuni POP in organismi del Mare Mediterraneo, con particolare riferimento alle coste italiane. Inoltre, per il gruppo di xenobiotici ad azione tossicologica diossina-equivalente (policlorobifenili coplanari, policlorodibenzodiossine, policlorodibenzofurani), è stata prodotta una valutazione di rischio preliminare.

### Contaminazione del biota

Dai primi anni '90, numerose ricerche dell'Istituto Superiore di Sanità si sono concentrate sulla laguna di Venezia. Nel passato, questi lavori hanno ricevuto un supporto economico addizionale da parte del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica, dalla Procura di Venezia, dal Ministero della Sanità, dal Ministero dell'Ambiente e dalla Regione Veneto.

Nell'ambito di queste indagini si è adottata una suddivisione della laguna veneta in aree virtuali di rischio in base all'impatto antropico presunto. In particolare, il biota è stato raccolto con il proposito di formulare degli scenari d'esposizione per la popolazione residente, per questi contaminanti che si trasferiscono prevalentemente attraverso la catena alimentare.

A titolo esplicativo, si deve specificare che, per quanto riguarda i livelli di composti chimici ad azione diossina-equivalente, in questa rassegna, i valori vengono presentati come "quantità di unità di concentrazione (TE) di sostanze chimiche ad azione tossica diossina-equivalente" (TEQ). Infatti, pur essendo composti chimici diversi, la loro azione tossica, nei vertebrati, almeno per quanto concerne mammiferi, uccelli e pesci, sembra essere prodotta attraverso un comune meccanismo d'azione comprendente una risposta mediata da un recettore [2]. Questo comune meccanismo d'azione ha spinto a formulare il concetto dei "fattori di equivalenza di tossicità" (TEF) al fine di facilitare la valutazione di rischio per l'esposizione a queste miscele. Infatti, una delle peculiarità di questi contaminanti è quella che si presentano sempre in miscele che, quantificate nei tessuti biologici, risultano diverse da quelle più probabili a cui gli organismi sono potenzialmente esposti. I valori TEF per i congeneri

individuali moltiplicati per le loro concentrazioni nella matrice di interesse vengono usati per calcolare la concentrazione equivalente di 2,3,7,8-T4CDD, con i contributi pesati di tutti i componenti delle miscele d'esposizione. Attualmente, esistono numerose scale che definiscono i TEF per i singoli congeneri ma, al momento, due sono quelle più usate: la scala nota come "internazionale" (I-TEF) [3] e la scala nota come WHO [4]. Quest'ultima include anche i TEF per i PCB ad azione diossina-equivalente e prende in considerazione anche dei TEF "ecologici" provvisori. Questi ultimi sono stati sviluppati per uccelli e pesci, oltre che per i mammiferi, sebbene per i primi due gruppi non siano disponibili database tossicologici ampi. In questa rassegna si è ritenuto opportuno presentare i dati senza specificare la scala tossicologica da cui questi sono stati generati in virtù del suo carattere generale. Inoltre, tra le diverse scale, la differenza fra le somme dei contributi dei singoli prodotti, derivanti dalla moltiplicazione dei singoli congeneri per i rispettivi TEF, apparentemente non risulta rilevante.

In molti casi, il biota stanziale costituito da molluschi bivalvi come vongole (*Tapes* sp.) e mitili (*Mytilus galloprovincialis*) è stato raccolto in siti di campionamento in cui sono stati prelevati anche reperti di sedimento. Sia per il biota che per i sedimenti, è stato rilevato un andamento crescente di contaminazione per PCDD, PCDF, IPA, HCB e metalli pesanti con l'aumento dell'impatto di origine antropica, muovendosi cioè da siti campionati nel bacino meridionale e settentrionale verso Porto Marghera e la Città di Venezia, nel bacino centrale. Nei mitili, in particolare è stato riscontrato un range di valori che va da 0,68 (bacino meridionale) a 4,9 (Porto Marghera) pgTE/g base fresca (b.f.), mentre nelle vongole un range che va da 0,079 a 2,7 pgTE/g (b.f.) [5]. Questo incremento di concentrazioni di PCDD e PCDF, sia analitiche sia TE, nel biota a contatto con il sedimento lagunare (*Tapes* sp.), appare correlato con i livelli misurati nei sedimenti [6].

I valori riscontrati negli esemplari campionati nel bacino lagunare meridionale non sembrano significativamente differenti da quelli trovati in esemplari di *Mytilus galloprovincialis* raccolti in allevamenti marini situati lungo la costa adriatica (0,11-0,24 pgTE/g b.f.). Naturalmente, questi molluschi, campionati in aree idonee all'allevamento dei bivalvi, non sembravano essere esposti direttamente a un impatto chimico di origine antropica. Queste analisi sono state effettuate nell'ambito di un'altra ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità, il Progetto PRISMA, attuato nel 1997-1998, in cui sono state prese in considerazione 12 specie edibili con l'obiettivo di stimare l'entità della contaminazione da PCDD, PCDF, PCB, DDT e DDE in prodotti della pesca, campionati da diverse aree del Mare Adriatico. Le specie marine selezionate avevano

un elevato valore commerciale e sono state ottenute in 19 porti di pesca, rispettivamente, dell'Adriatico settentrionale, centrale e meridionale. In generale, in questi campioni si è potuto osservare che la contaminazione da PCDD+PCDF appare piuttosto bassa. I risultati, comunque, evidenziano concentrazioni più elevate in quelle specie situate ai livelli più alti delle reti alimentari (sgombrò, 0,59-1 > triglia, 0,36-0,56 > acciuga, 0,23-0,47, tutti in pgTE/g b.f.). Con alcune eccezioni, il contributo dei furani appare sempre superiore a quello delle diossine e, in aggiunta, i valori cumulativi TE risultano maggiori in specie campionate nei porti dell'Adriatico settentrionale che non in quelle raccolte nei porti dell'Adriatico centrale e meridionale. La contaminazione da PCB ha rivelato una differenza più marcata tra le tre aree, con gli organismi dei porti settentrionali più contaminati, di quelli centrali e meridionali (10-180 > 5,5-160 > 3,7-94, in ng/g b.f.). In entrambi i casi, come atteso, la contaminazione sembra cambiare in accordo al livello trofico di appartenenza, con lo sgombrò risultante la specie più contaminata. Tuttavia, il grasso sembra giocare un ruolo importante nella definizione delle differenze osservate [7].

In generale, i grandi predatori risultano particolarmente interessanti per la loro posizione trofica e perché, dal punto di vista ecologico, possiedono un ruolo unico nelle reti alimentari. Nel grasso delle specie di squali *Prionace glauca* e *Rapias vulpinus*, i non-orto PCB variano tra 2,7 a 240 pgTE/g b.f., mentre nel muscolo del tonno *Thunnus thynnus* sono stati riscontrati livelli oscillanti tra 17 e 200 pgTE/g b.f. [8]. Nei muscoli di altre due specie di squali, *Centrophorus granulosus* e *Squalus bairdii*, le concentrazioni TEQ appaiono situate intorno ai livelli più bassi dei valori precedentemente indicati, mentre fegato e uova sembrano contenere livelli decisamente più elevati (rispettivamente, 200 e 100 pgTE/g b.f. per *Centrophorus granulosus*, e 170 e 45 pgTE/g b.f. per *Squalus bairdii*) [9].

Nel grasso dei delfini *Tursiops truncatus* e *Grampus griseus* sono state riscontrate concentrazioni di TCDD equivalenti rispettivamente di 19 e 21 ng/g b.f. [8, 10]. Queste concentrazioni sono state riportate per la riserva sottocutanea di grasso di individui morti, ritrovati spiaggiati, che contiene approssimativamente il 35-45% di lipidi. Queste stime di carico corporeo possono essere influenzate da molti fattori come la mobilizzazione dei lipidi che avviene durante la fase in cui gli organismi non si nutrono perché spiaggiati o sofferenti; questi fattori sono in grado di indurre un cambiamento nelle concentrazioni all'equilibrio tra i vari tessuti. In aggiunta, alle concentrazioni più elevate osservate, il sequestro epatico di questi composti potrebbe influenzare le stime di carico corporeo [4].

Per quanto riguarda i composti ad azione non diossina-simile alcune indagini sui mammiferi marini

hanno riportato che in esemplari di *Stenella coeruleoalba* e di *Balaenoptera physalus* gli omologhi a sei e sette gradi di clorosostituzione sembrano prevalere sugli altri PCB presenti nella miscela, con i PCB 138, 153, e 180 presenti in quantità maggiore [10, 11].

La stessa prevalenza di congeneri è stata osservata in pesci del piano infralitorale e del piano batiale mediterranei, così come nei grandi predatori pelagici, come tonni e squali, nei quali la concentrazione relativa di PCB 153 raggiunge, rispettivamente, 160 e 330 ng/g b.f. [7, 8, 12].

### Valutazione di rischio

La procedura di valutazione di rischio preliminare comprende la comparazione della concentrazione riscontrata in un tessuto target con una "dose di riferimento" (RfD), consistente in una stima di esposizione giornaliera, che durante un intero ciclo di vita risulta probabilmente senza effetti avversi. In pratica, la RfD viene stimata dividendo un endpoint adeguato come un NOAEC (NOAEL) o un LOAEC (LOAEL), derivato da esperimenti di laboratorio su modelli animali, per un "fattore di incertezza". Questo fattore tiene conto della variabilità specie-specifica di risposta, della sensibilità dell'endpoint, della stima di tossicità considerata, e delle estrapolazioni tra differenti modalità d'esposizione.

Il "quoziente di rischio" (HQ) corrisponde al rapporto tra la concentrazione nel tessuto divisa per l'RfD e si esprime come "unità tossiche" (TU). Questo tipo di approccio è accettabile solo per una valutazione di rischio preliminare; non considera, infatti, la variazione che potrebbe esistere in termini di esposizioni reali e suscettibilità, che dovrebbe pure essere valutata. Un HQ maggiore di 1 indica che la concentrazione misurata eguaglia le concentrazioni-soglia in grado di evocare una risposta avversa statisticamente significativa [13].

Per i contaminanti ad azione tossicologica diossina-simile, la migliore stima di concentrazione per comparare il rischio tra specie diverse è la concentrazione libera nel tessuto target dei composti di interesse, o carico corporeo [4]. Il carico corporeo, infatti, sembra integrare le emivite differenziali tra le specie.

Nei mammiferi gli endpoint più sensibili nel caso dei composti ad azione diossina-simile sono, sulla base della misura del carico corporeo: endometriosi, effetti neurotossici durante lo sviluppo, effetti immunotossici sia nei confronti dell'adulto sia nei confronti dell'organismo giovane. In particolare, la dose più bassa che dà origine a un effetto statisticamente significativo in seguito ad una esposizione è 28 ngTE/kg peso corporeo (b.f.) [4] (esiste un LOAEL più basso di un ordine di grandezza, ottenuto per effetti osservati sul

sistema immunitario, che non è stato preso in considerazione perché, recentemente, è stato criticato dal punto di vista metodologico). Nelle riserve di grasso sottocutaneo di *Tursiops truncatus* e *Grampus griseus* sono state riscontrate concentrazioni, rispettivamente, di 19 e 21 ngPCB-TE/g peso corporeo (b.f.) [8]. Il meccanismo di ripartizione tra un tessuto a forte componente lipidica e un altro a componente lipidica inferiore, per contaminanti lipofili come quelli di cui si tratta, implica che nei secondi ci siano concentrazioni più basse. In questi ultimi però, si collocano i tessuti target per l'azione tossicologica degli xenobiotici di interesse. Nei mammiferi acquatici, in particolare, è stato osservato che le concentrazioni date per la riserva sottocutanea di grasso sono approssimativamente due ordini di grandezza superiori a quelle riscontrabili nel cervello [14, 15]. Applicando un fattore 10 al LOAEL indicato in precedenza [4], per la compensazione della variabilità specie-specifica nelle risposte, è possibile riportare come RfD la concentrazione soglia in un tessuto che causa un effetto avverso definito. Per i mammiferi, tale concentrazione è 2,8 pg/g di 2,3,7,8-T4CDD b.f., basata sul carico corporeo materno. L'effetto avverso considerato, in questo caso, è sul sistema riproduttivo. Questa concentrazione, espressa in TEQ b.f., è più di un ordine di grandezza inferiore della concentrazione trovata nel grasso sottocutaneo dei due organismi considerati.

Nei pesci, applicando la stessa procedura ad un LOAEL di 40 pg/g b.f. di 2,3,7,8-T4CDD, riscontrato nelle uova di *Salvelinus fontinalis* [16], sulla base del carico corporeo, si ottiene come RfD la concentrazione di 4 pg/g. Questo livello, espresso in TEQ, risulta più di un ordine di grandezza inferiore alle concentrazioni trovate nelle uova dei due squali.

### Biomarker

Le ricerche effettuate negli ultimi anni hanno evidenziato una successione di legami tra la presenza di contaminanti ad azione tossicologica diossina-simile negli organismi e i loro effetti tossici. Tali effetti possono essere considerati, d'altra parte, come segnali d'avvertimento specifici: laddove essi si manifestano si può sospettare che siano presenti i contaminanti d'interesse senza la necessità di effettuare analisi chimiche specifiche. Tali eventi, quando risultano misurabili negli organismi, vengono riportati come biomarker. In particolare, la presenza di sostanze chimiche ad azione diossina-equivalente viene rilevata mediante un'attività enzimatica: l'attività EROD (7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity). Anche se esistono altri biomarker altrettanto specifici, questo è un saggio estremamente sensibile. L'utilizzo di queste tecniche sarebbe fortemente raccomandabile per legare

la presenza di questi xenobiotici all'effetto e ottenere così un rilevamento omnicomprensivo. Molti di questi biomarker, però, teoricamente utilizzabili per il monitoraggio ambientale, dovrebbero essere accuratamente validati rispetto alle varie matrici biologiche con cui possono essere utilizzati.

### Conclusioni

Basandosi su questa limitata raccolta di dati, appare evidente che a tutt'oggi, nell'ambito dei POP, si può tentare di produrre una valutazione di rischio preliminare solo per quel gruppo di contaminanti ad azione diossina-equivalente. Nonostante questa forte limitazione che si aggiunge al ridotto numero di stime di tossicità per pesci e uccelli presenti in letteratura, appare comunque evidente che per alcuni organismi è, in qualche misura, ipotizzabile un certo grado di pericolo. Ad ogni modo, le indagini dovrebbero prendere in considerazione più analiti e approfondire le relazioni esistenti tra livelli presenti negli organismi e risposte degli stessi. In particolare, una delle strade da percorrere potrebbe essere quella di utilizzare biomarker specifici e sensibili e validarli per il loro uso sul campo.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

### BIBLIOGRAFIA

1. UNEP-United Nations Environmental Programme; 2001. *Stockholm convention on persistent organic pollutants (PoPs)*. www.chem.unep.ch.
2. Giesy JP, Ludwig JP, Tillitt DE. Dioxins, dibenzofurans, PCBs and colonial, fish-eating water birds. In: Schecter A. (Ed.). *Dioxins and health*. New York: Plenum Press; 1994. p. 249-307.
3. USEPA-United States Environmental Protection Agency. *Interim procedures for estimating risks associated with exposure to mixture of chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (CDDs and CDFs)*. Washington DC: USEPA; 1989. (EPA/625/3-89/016).
4. World Health Organization. *Consultation on the assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI)*. Geneva: International Programme on Chemical Safety, WHO Centre for Environment and Health; 1998.
5. Di Domenico A, Turrio Baldassarri L, Ziemacki G, De Felip E, Ferrari G, La Rocca C, Cardelli M, Cedolini G, Dalla Palma M, Grassi M, Roccabella V, Volpi F, Ferri F, Iacovella N, Rodriguez F, D'Agostino O, Sansoni R, Settimo G. Priority microcontaminants in biota samples from the Venice Lagoon: a selection of concentration data and elements of risk analysis. *Organohalogen Compounds* 1998;39:199-204.
6. Di Domenico A, Miniero R. Transfer of PCDDs and PCDFs from bottom sediments to clams (*Tapes* sp) in the Venice lagoon: a preliminary assessment. *Organohalogen Compounds* 2000;49:473-6.

7. Bayarri S, Turrio Baldassarri L, Iacovella N, Ferrara F, Di Domenico A. PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 2001;43:601-10.
8. Corsolini S, Focardi F, Kannan K, Tanabe S, Borrell A, Tatsukawa R. Congener profile and toxicity assessment of polychlorinated biphenyls in dolphins, sharks and tuna fish from Italian coastal waters. *Marine Environmental Res* 1995;40:33-53.
9. Storelli MM, Marcotrigiano GO. Persistent organochlorine residues and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in sharks from the Mediterranean sea Italy. *Marine Pollution Bull* 2001;42:1323-29.
10. Borrell A, Aguilar A, Corsolini S, Focardi S. Evaluation of toxicity and sex-related variation of PCB levels in mediterranean striped dolphin affected by an epizootic *Chemosphere* 1996;32:2359-69.
11. Marsili L, Focardi S. Organochlorine levels in subcutaneous blubber biopsies of fin whale (*Balaenoptera physalus*) from the Mediterranean sea. *Environmental Pollution* 1996;91:1-9.
12. Solè M, Porte C, Albaigés J. Hydrocarbons, PCBs and DDT in the NW Mediterranean deep-sea fish *Mora moro*. *Deep-Sea Res I* 2001;48:495-513.
13. Giesy JP, Kannan K. Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implication for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 1998;28:511-69.
14. Jenssen BM, Shaare JV, Ekker M, Vongraven D, Lorentsen SH. Organochlorine compounds in blubber, liver and brain in neonatal grey seal pups. *Chemosphere* 1996;32:2115-25.
15. Tilbury KL, Stein JE, Meader JP, Krane CA, Chan SL. Chemical contaminants in harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) from the North Atlantic coast: tissue concentrations and intra- and inter-organ distribution. *Chemosphere* 1997;34:2159-81.
16. Spitzbergen JM, Walker MK, Olson JR, Peterson RE. Pathologic alterations in early life stages of lake trout; *Salvelinus namaycush*, exposed to 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin as fertilized eggs. *Aquatic Toxicol* 1991;191:41-72.

## Associazione tra balneazione ed infezioni gastroenteriche

Annamaria DIONISI (a), Nicola SCHINAIA (b), Romano ARCIERI (c),  
Giancarlo RIPABELLI (d) e Ida LUZZI (a)

(a) Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica; (b) Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica; (c) Laboratorio di Virologia; (d) Laboratorio di Medicina Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Le infezioni gastroenteriche rappresentano una delle maggiori cause di morbosità sia nelle regioni industrializzate che nelle aree in via di sviluppo. Lo stato di qualità delle acque marine costiere è un problema di particolare importanza in un paese come l'Italia la cui costa occupa una parte considerevole di territorio. Oltre agli aspetti sanitari la qualità di queste acque ha forti ripercussioni sull'economia nazionale, in considerazione dell'importanza dell'industria turistica e della pesca. Malgrado l'enorme mole di dati relativi alla balneazione come fattore di rischio per l'insorgenza delle infezioni gastroenteriche in Italia non sono stati riportati casi chiaramente associati ad attività ricreative in acque marine. Solo alcune segnalazioni sporadiche di casi di infezione intestinale seguita da infezione sistemica sono state riportate in soggetti immunodepressi o con gravi patologie di base a seguito di esposizione ad acqua marina. Il presente studio, sia per la parte relativa ad uno studio caso controllo che ad una sorveglianza attiva sembra confermare l'assenza di una associazione tra balneazione e sviluppo di infezioni gastroenteriche. Uno dei più importanti fattori di rischio per l'insorgenza di queste infezioni rimane il consumo di prodotti ittici, molluschi in particolare.

*Parole chiave:* balneazione, infezioni, batteri.

**Summary** (*Association between sea recreational water and gastroenteritis*). - Gastrointestinal infections represent one of the main cause of morbidity both in developing and industrialized areas. Quality of coastal waters is particularly important for countries as Italy that has several regions on coasts. Public health and economy aspects could be hardly affected by poor quality of sea waters. Several studies have been addressed to the association between sea recreational water and development of gastrointestinal infection but in Italy only sporadic cases of infection have been reported especially in immunocompromised hosts. Results of this study, either in the case control or in the active surveillance study seem to confirm the absence of an association between sea exposure and intestinal infections. One of the main risk factors for the development of these infections is still represented by the seafood consumption especially shellfish.

*Key words:* recreational water, infections, bacteria.

### Introduzione

Le infezioni gastroenteriche rappresentano una delle maggiori cause di morbosità sia nelle regioni industrializzate che nelle aree in via di sviluppo [1, 2]. Negli USA le gastroenteriti acute rappresentano la seconda causa più comune tra le patologie di breve durata che colpiscono la popolazione [3].

In particolare, i microrganismi patogeni a trasmissione oro-fecale rappresentano un problema di grande rilevanza per la salute umana, specie in correlazione con determinate condizioni ambientali.

Recentemente, negli Stati Uniti è stata descritta un'importante epidemia di infezione da *Escherichia coli* 0157, dovuta ad attività ricreative in acque di balneazione [4]. E sempre negli Stati Uniti in un'indagine

svolta nel periodo 1991-92, sono state riportate 11 epidemie di gastroenteriti associate ad acque di balneazione. In sei di questi casi, riferiti ad acque di lago, sono stati identificati come agenti etiologici *Giardia* (4 casi) e *Cryptosporidium* (2 casi). Non risultano invece disponibili dati sulla presenza di questi protozoi in acque marine.

Popolazioni abitanti le coste sono particolarmente esposte ad eventuali rischi, a seguito dell'abitudine a consumare alimenti ittici crudi o insufficientemente cotti e alla balneazione in acque con cariche microbiche elevate [5-11].

Dati recenti sulla qualità delle acque costiere italiane suggeriscono come si stia verificando una riduzione della densità dei microrganismi considerati indicatori di inquinamento fecale (coliformi totali e

fecali, streptococchi fecali). Tuttavia, altri microrganismi che sfuggono ai normali controlli batteriologici delle acque (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, enterovirus, adenovirus, rotavirus, calicivirus, virus del gruppo Norwalk) vengono ora considerati causa importante di gastroenterite acuta, sia a carattere epidemico che sporadico [12, 13].

In particolare, negli ultimi anni, nel mare Adriatico è andato mutando il microclima, rappresentato da componenti organici ed inorganici. Fenomeni quali l'eutrofizzazione e le fioriture fitoplanctoniche verificatesi nel mare Adriatico hanno indotto l'alterazione degli equilibri biologici preesistenti, con conseguente modificazione della flora microbica ambientale.

In Italia, relativamente agli aspetti geografici, le problematiche relative alle acque di balneazione sono state avviate già nei primi decenni del secolo, dove veniva vietata la balneazione entro i 200 metri dallo sbocco di fogne. Successivamente, nel 1971, il Ministero della Sanità definiva una norma igienica limitata ad un singolo indicatore microbiologico, quale la concentrazione nelle acque dei "coliformi fecali". L'attuale normativa nazionale sulle acque di balneazione deriva dalla direttiva unica comunitaria n. 76/160 dell'8 dicembre 1975, che fino ad oggi è stata sottoposta a numerose revisioni, tuttavia i principi su cui tale normativa si è sempre basata erano fondamentalmente improntati sulla i) tutela della salute pubblica e sulla ii) salvaguardia dell'ambiente.

Il DPR n. 470 dell'8 giugno 1982, impone limiti particolarmente severi alla qualità delle acque di balneazione, e si basa sulla valutazione per la sorveglianza della salute dei bagnanti basata su: a) quattro parametri batteriologici, quali indicatori di inquinamento fecale (coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali) e della presenza di uno specifico patogeno (salmonella); b) quattro indicatori di inquinamento di origine industriale (pH, fenoli, sostanze tensioattive, oli minerali); c) tre parametri chimici-fisici (ossigeni disciolti, colorazione, trasparenza).

Questa normativa si basa su criteri assolutamente rigidi, anche rispetto alle indicazioni dettate dalla Comunità Europea (Direttiva 76/160), proprio perché l'Italia per le sue specifiche condizioni climatiche e idrologiche, e per l'intensa ed estensiva pratica di balneazione ha sempre affrontato tale problematica con estrema rigidità. Inoltre, nelle norme tecniche si definiscono le distanze minime tra due punti di prelievo della costa, comunque, con una distanza non superiore a 2 km per zone ad alta densità di balneazione e con una frequenza di rilevazione bimensile.

I compiti di individuare le aree costiere dedicate alla balneazione e di identificare i punti di prelievo per la valutazione di acque balneabili spetta alle Regioni in collaborazione con i Comuni posti sul territorio.

Tuttavia, tale sistema, presenta dei limiti di valutazione, relativi alla frequenza di osservazione e all'impossibilità di correlare questi dati con "l'Uomo" e la "Salute umana".

In tal senso, per aumentare le conoscenze scientifiche in questo settore, si è avviato uno studio specifico, in convenzione tra il Ministero della Ricerca Universitaria (MURST), il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Gli obiettivi specifici dello studio sono stati quelli di: determinare l'associazione fra balneazione e gastroenterite, mediante uno studio analitico di tipo caso-controllo; istituire un sistema di sorveglianza attivo per le infezioni gastroenteriche in alcune zone della costa adriatica.

## Materiali e metodi

### Studio caso-controllo

Sono stati arruolati nello studio tutti i soggetti presenti da almeno 3 giorni in 4 aree balneari della costa Adriatica: a) area settentrionale: Venezia, Mestre, Jesolo; area centro settentrionale: Cesenatico, Forlì; b) area centro meridionale: Pescara; c) area meridionale: Bari); con età compresa fra i 5 e 60 anni. Sono stati inclusi sia i residenti, che i non residenti. I bambini al di sotto dei 5 anni sono stati esclusi dallo studio, sia per la relativa bassa frequenza con la quale vengono a contatto con il mare, sia per il maggior rischio di sviluppare gastroenteriti proprio di questa classe di età.

Per ogni soggetto incluso nello studio è stata compilata una scheda riportante i dati anagrafici, anamnestici, clinici-epidemiologici, nonché i risultati delle indagini microbiologiche effettuate.

È stato definito come caso sospetto di gastroenterite un paziente che presentava tre o più evacuazioni di feci liquide o semi liquide nelle 24 ore; con l'aggiunta di almeno uno dei seguenti sintomi minori nelle 24 ore: due o più episodi di vomito alimentare; rialzo termico  $> 38^{\circ}\text{C}$  (temperatura esterna); dolori addominali; nausea. È stato definito come caso confermato un paziente che rispondeva alla definizione di caso sospetto, dalle cui feci veniva isolato un agente infettivo causale di gastroenteriti.

Veniva definito controllo un soggetto che aveva soggiornato da almeno 3 giorni nella località balneare con età compresa fra i 5 e 60 anni senza i sintomi di gastroenterite acuta. Il rapporto caso/controllo era pari a 1:2. I due controlli da arruolare erano possibilmente non residenti ovvero uno non residente e uno residente, ed entrambi erano appaiati al caso per classe di età e per periodo di osservazione.

Un questionario, dedicato e standardizzato veniva somministrato a tutti i soggetti arruolati nello studio,

da parte del personale dei servizi sanitari aderenti allo studio. Il questionario è stato suddiviso in sezioni, che hanno permesso di raccogliere informazioni relative a dati demografici, clinici (solo per i casi), di laboratorio (per i casi e per un controllo appaiato) e comportamentali per i casi (negli ultimi tre giorni precedenti la comparsa della manifestazione clinica) e per i controlli.

Sono state inoltre raccolte informazioni sulle caratteristiche della balneazione (luogo, frequenza, durata, immersione parziale, immersione subacquea, ingestione di acqua di mare); luoghi di consumazione dei pasti; cibi ingeriti; uso di acqua di mare per la cottura di cibi; presenza di lesioni di continuità cutanee; uso di acqua di mare per igiene personale.

#### *Componente microbiologica*

E' stata definita la diagnostica microbiologica, tenendo conto che i campioni di feci raccolti nelle aree dello studio, un campione per il caso ed uno per un controllo, sono stati in parte processati a livello dei laboratori operanti nelle aree di studio e in parte presso l'Istituto Superiore di Sanità.

#### *Raccolta campioni*

Per ogni caso e per un controllo, all'interno di ogni coppia di controlli, è stato raccolto un campione di feci (e non un tampone rettale). Oltre agli esami sotto descritti per ogni campione sono state conservate tre aliquote di campione di feci in provette da criogenia preparate e conservate secondo le seguenti caratteristiche: tre aliquote di campioni di feci da conservare in congelatore; una sospensione di feci in soluzione acquosa di formalina al 10%, conservata a +4 °C.

Sia le aliquote che la sospensione sono state inviate all'Istituto Superiore di Sanità e hanno costituito i campioni per potere effettuare le indagini per agenti virali e parassitari, tossine batteriche e per opportuni controlli di qualità e comunque rappresentano campioni di riserva sui quali potevano essere effettuate ulteriori indagini, se ritenute indispensabili: esami di laboratorio effettuati nei laboratori periferici; esame parassitologico dopo concentrazione: osservazione a fresco e con colorazione di Lugol per *Giardia* e di Zielh-Neelsen per *Cryptosporidium*; coprocultura di routine (isolamento di salmonella, shigella, yersinia, aeromonas); ricerca di vibroni aggiungendo alla metodica di routine una piastra di TCBS; ricerca di *Campylobacter* eseguita mediante la tecnica di semina su membrana o terreno selettivo; ricerca di Rotavirus con test al lattice o test Elisa.

In caso di isolamento di *Escherichia coli* si è proceduto all'allestimento di pool di 5-10 colonie, lattosio fermentanti seminate per infissione in criotubi contenenti agar nutriente (forniti prima dell'inizio dello studio).

Dopo incubazione a 37 °C per 18 ore, i criotubi sono stati conservati a temperatura ambiente, al buio, e successivamente inviati all'Istituto Superiore di Sanità. I pool sono stati esaminati presso l'Istituto Superiore di Sanità con tecniche biologiche attraverso sonde geniche per identificare i diversi tipi di *Escherichia coli* patogeni (ETEC, EPEC, VTEC).

Tutti i questionari compilati a livello periferico sono stati inviati dagli epidemiologi responsabili dello studio all'ISS, dove è stato costituito un archivio computerizzato. I dati sono stati successivamente analizzati con il pacchetto informatico Epi Info 5.00 e con il sistema informatico BMDP.

#### *Sorveglianza dei casi sporadici di gastroenterite*

*Dimensione del campione.* - Il campione selezionato è consistito nell'arruolamento di una coorte di circa 15000 soggetti, che rappresentano il numero complessivo degli assistiti di tutti i medici di medicina generale coinvolti nello studio e residenti nell'area della provincia di Brindisi e Bari. Il numero di assistiti per ciascun medico di medicina generale è stato di circa 1000 soggetti. A ciascun medico di medicina generale è stato attribuito un codice di identificazione.

*Definizione di caso.* - E' definito caso un paziente che presenta al momento della visita o della telefonata al medico di medicina generale sintomi quali diarrea e/o vomito.

E' stato realizzato un protocollo operativo che prevedeva la somministrazione, a ogni soggetto che fosse ricorso al medico di medicina generale per sintomatologia gastroenterica, di un questionario standardizzato per identificare possibili fattori di rischio associati all'insorgenza della patologia gastroenterica. Contemporaneamente all'intervista del questionario, per ogni caso, il medico di medicina generale ha richiesto l'esame coproculturale del campione di feci che quindi è stato consegnato direttamente dal paziente al laboratorio microbiologico del PMIP di Brindisi e il laboratorio dell'Istituto di Igiene dell'Università di Bari per le indagini alla ricerca di Salmonella, Shigella, Vibrio, Campylobacter, *E. coli* patogeni e altri patogeni enterici. I laboratori periferici hanno provveduto a conservare a -20 °C un'aliquota del campione di feci del paziente per l'invio successivo all'ISS.

L'ISS poteva anche ricevere eventuali stipiti di patogeni enterici isolati che richiedessero indagini approfondite e/o successive tipizzazioni. Il protocollo ha previsto anche che l'ISS ricevesse periodicamente i dati raccolti su supporto elettronico, per procedere all'analisi dei medesimi e alla realizzazione di report periodici per il feed-back delle informazioni.

E' stato realizzato un questionario cartaceo, suddiviso in 3 sezioni, che ha permesso di raccogliere informazioni comprendenti rispettivamente i dati ana-

grafici del paziente, i dati clinico-epidemiologici e i dati di laboratorio.

Sono state raccolte informazioni sulle caratteristiche demografiche del paziente (cognome e nome, sesso, età, comune e provincia di residenza, recapito telefonico).

Sono state raccolte, per ogni caso di gastroenterite nella fase acuta, informazioni cliniche (data della visita o data della telefonata, data inizio sintomatologia, diarrea, numero massimo di evacuazioni al giorno, sangue nelle feci, vomito, dolore addominale, febbre) e informazioni epidemiologiche del paziente (assunzione di antibiotici prima dell'insorgenza dei sintomi, storia di viaggi recenti, esposizione a potenziali fonti o veicoli di infezione ambientale quali cibi ingeriti, luogo di consumo dei pasti, attività di balneazione, casi simili tra altre persone), e infine il recapito del medico di medicina generale.

Sono state raccolte informazioni relative alle indagini di laboratorio eseguite localmente, quali la data di raccolta del campione di feci del paziente e il risultato dell'eventuale patogeno enterico isolato.

La scheda di notifica, considerata l'importanza delle informazioni da raccogliere, conteneva sezioni da compilare sia da parte dei medici di medicina generale, sia da parte dei laboratori periferici.

Ogni medico di medicina generale ha indicato sulla scheda di notifica il proprio codice di identificazione e il numero progressivo di notifica del caso.

*Creazione di un archivio elettronico per la raccolta dei dati informatizzati.* - E' stato preparato un programma per la raccolta e il controllo dei dati informatizzati, utilizzando il software Epi-Info versione 6.04 specifico per l'epidemiologia che, avendo funzioni di statistica descrittiva, ha permesso di elaborare i dati computerizzati.

*Analisi dei dati epidemiologici.* - E' stato sviluppato un programma per la gestione e l'elaborazione dei dati computerizzati inviati all'ISS, relativi alla sorveglianza delle infezioni gastroenteriche associate ad esposizioni ambientali.

*Metodi microbiologici.* - Le attività microbiologiche svolte nello studio in oggetto consistevano negli esami di laboratorio per la diagnosi delle infezioni da batteri enteropatogeni eseguita localmente.

## Risultati

### Studio caso-controllo

Al 10 settembre 1997 sono pervenuti presso l'ISS 126 questionari compilati. Di questi, 46 (36,5%) sono relativi a casi di gastroenterite segnalati durante un periodo di osservazione compreso tra il 15 giugno e il 1 settembre 1997. Mentre i restanti 80 questionari sono relativi ai controlli arruolati nello studio.

Stratificando per sesso, i 126 soggetti arruolati nello studio risultano essere prevalentemente di sesso maschile (65,1%). L'età media della popolazione è di 33 anni, di cui circa il 48% risulta essere diplomato. Confrontando le differenze di frequenza delle caratteristiche demografiche tra i casi e i controlli non si evidenziano differenze statisticamente significative per sesso, per età media e per regione di residenza ( $p = 0,34$ ;  $p = 0,85$ ;  $p = 0,39$  rispettivamente).

Tutti i 46 casi di gastroenterite notificati rispondono alla definizione di caso, infatti tutti hanno avuto almeno 3 scariche diarroiche nell'arco delle 24 h con un sintomo minore associato. In particolare, nel 15,2% dei casi dissenteria, nel 30,4% nausea, nel 23,9% vomito, nell'84,8% dolori addominali, nel 23,9% rialzo termico, nel 45,7% cefalea. Ovviamente, la somma dei sintomi minori supera il 100% dei casi, avendo molti casi segnalato più di un sintomo minore. Inoltre, è stato segnalato un caso con disidratazione, ed un caso con otite.

Dai 126 soggetti arruolati nello studio sono stati raccolti 68 (54%) campioni biologici di feci. Di cui, 35 (76%) sono relativi ai soggetti con gastroenterite e 33 (41%) sono relativi ai soggetti arruolati come controlli.

Dalle analisi microbiologiche effettuate per i 35 campioni di feci relativi ai casi sono stati isolati nell'11,4% dei casi Salmonelle, nel 20% dei casi *Escherichia coli*, nel 2,9% dei casi Rotavirus. Inoltre, in 8 casi la sindrome è stata attribuita ad una infezione da *Clostridium perfringens*. Le analisi microbiologiche relative ai 33 campioni di feci dei controlli hanno evidenziato nel 6,1% dei casi Salmonelle e *Escherichia coli*, nel 3% *Campylobacter* e Rotavirus.

Dall'analisi dei questionari non è stata messa in evidenza una differenza significativa tra casi e controlli in relazione all'attività di balneazione e quindi non è stata riscontrata un'associazione evidente tra infezioni gastroenteriche e balneazione. Si è invece confermato come principale fattore di rischio per l'insorgenza delle infezioni gastroenteriche il consumo di prodotti ittici in particolare di molluschi.

### Sorveglianza delle gastroenteriti sporadiche

Alla fine dell'estate 2000 sono pervenute all'Istituto Superiore di Sanità 130 schede di notifica inviate dal Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione di Brindisi e dall'Istituto di Igiene di Bari relative a soggetti che rispondevano alla definizione di caso, ovvero pazienti con sintomatologia gastroenterica corrispondente a diarrea e/o vomito, segnalati durante il periodo di osservazione dello studio. Il 54,3% dei casi notificati era di sesso maschile, e il 51,4% era costituito da bambini entro i 6 anni di età (la mediana era: 6 anni).

La distribuzione della sintomatologia nei casi notificati è mostrata in Tab. 1. La manifestazione clinica più frequentemente riportata è rappresentata dalla diarrea.

La distribuzione dei casi per data di inizio della sintomatologia includeva un periodo compreso tra l'inizio di aprile e la metà di ottobre 2000.

Nell'ultimo mese prima dell'insorgenza dei sintomi l'8,8% dei casi aveva viaggiato in Italia e solo un caso aveva effettuato un viaggio all'estero (in Germania).

Tra i casi notificati, negli ultimi 3 giorni prima dell'insorgenza dei sintomi il 28,4% ha consumato uova, il 21,6% frutti di mare crudi, il 20,6% verdura cruda, il 12,7% altri prodotti ittici cotti o crudi, e il 10,8% frutti di mare cotti.

Il 94,1% dei pazienti negli ultimi 3 giorni prima dell'insorgenza dei sintomi aveva consumato il pasto a casa, il 5,9% fuori casa (alla mensa, al ristorante, o in spiaggia).

Il 57,9% dei casi notificati ha svolto attività di balneazione: di questi il 50,0% al mare e il 7,9% in piscina. Il 27,5% dei casi notificati era a conoscenza di casi simili di gastroenterite avvenuti in famiglia, tra amici, tra colleghi di lavoro o tra commensali del ristorante.

*Dati di laboratorio:* la Tab. 2 indica il numero totale di isolamenti di patogeni enterici identificati a livello periferico e dall'ISS. Dalle indagini microbiologiche è risultato che nel 59,8% dei casi sono stati isolati patogeni enterici. Tra i casi per i quali è stato possibile identificare i patogeni enterici, la distribuzione degli isolamenti mostra che le salmonelle sono state i patogeni enterici più frequentemente identificati (rap-

presentano il 66,7% degli isolamenti totali) con il 30,3% e il 21,2% degli isolamenti costituiti rispettivamente da *S. enteritidis* e da *S. typhimurium*. Una proporzione non trascurabile degli isolamenti (33,3%) era costituita dai virus enterici (adenovirus, rotavirus, virus di Norwalk e virus di Sapporo) che hanno la peculiarità di colpire i bambini nei loro primi anni di vita e infatti più della metà dei pazienti era costituita da bambini in età pediatrica.

La distribuzione stagionale dei casi di infezione è mostrata in Fig. 1. Il maggior numero di casi si è verificato nei mesi di luglio e agosto con 78 casi (82,1%) su 95, mentre in 10 casi mancano le informazioni temporali.

Nella Fig. 2 si può notare come il maggior numero di isolamenti dei patogeni enterici sia avvenuto nei mesi estivi (solo in luglio il 42,4%) a conferma dell'andamento tipicamente stagionale delle malattie a diffusione oro-fecale, anche per quanto riguarda i virus enterici normalmente caratterizzati dalla diffusione dell'infezione nella stagione invernale.

## Conclusioni

Lo stato di qualità delle acque marine costiere è un problema di particolare importanza in un paese come l'Italia la cui costa, estendendosi per oltre 7000 km, occupa una parte considerevole di territorio. Oltre agli aspetti sanitari la qualità di queste acque ha forti ripercussioni sull'economia nazionale, in considerazione dell'importanza dell'industria turistica e della pesca.

Gli scarichi urbani, zootecnici e industriali non adeguatamente trattati sono responsabili dell'immissione in mare di microrganismi patogeni e di contaminanti chimici.

L'uomo può essere esposto ai microrganismi patogeni attraverso il consumo di prodotti ittici e lo svolgimento di attività ricreative.

Le infezioni intestinali causate da diverse specie di *Campylobacter*, il cui principale serbatoio è dovuto agli animali da allevamento, rappresentano un'importante causa di morbosità e gli indicatori di contaminazione fecale non costituiscono un buon indice di presenza nelle acque di questo microrganismo [14].

Anche alcuni vibriani ambientali, che fanno parte della flora batterica autoctona dell'ambiente marino, possono causare infezioni gastroenteriche ed extraintestinali associate all'esposizione all'acqua di mare o al consumo di prodotti ittici [15].

Malgrado l'enorme mole di dati relativi alla balneazione come fattore di rischio per l'insorgenza delle infezioni gastroenteriche in Italia non sono stati riportati casi chiaramente associati ad attività ricreative in acque marine. Solo alcune segnalazioni sporadiche di casi di infezione intestinale seguita da infezione

**Tabella 1.** - Presentazione clinica dei casi di infezione

Sintomi	n.	%
Diarrea	96	94,1
Vomito	52	51,0
Dolore addominale	74	72,5
Febbre	75	73,5

**Tabella 2.** - Numero totale di isolamenti di patogeni enterici identificati

Patogeno enterico	n. isolamenti
* Adenovirus	9
** Rotavirus	8
<i>S. Arizona</i>	2
<i>S. Braenderup</i>	4
* <i>S. Enteritidis</i>	20
<i>S. Sandiego</i>	1
<i>S. Typhimurium</i>	1
Salmonella grup. 4,5	2
Salmonella species	1

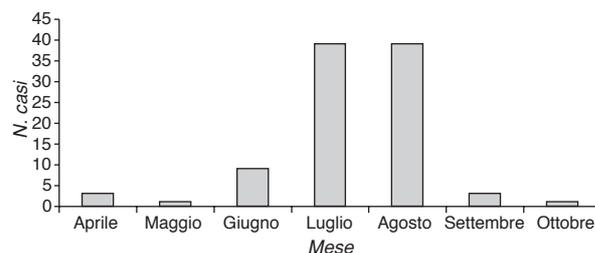


Fig. 1. - Distribuzione mensile dei casi notificati.

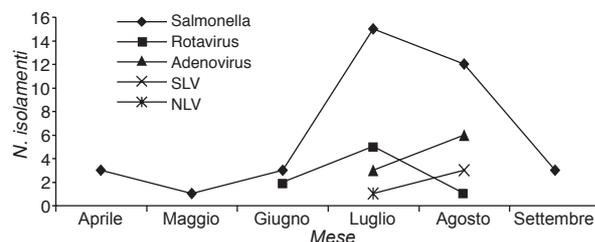


Fig. 2. - Andamento stagionale degli isolamenti dei patogeni enterici identificati.

sistemica sono state riportate in soggetti immunodepressi [16] o con gravi patologie di base [17] a seguito di esposizione ad acqua marina.

I risultati di questo studio sia per la parte relativa al caso controllo che alla sorveglianza attiva confermano l'assenza di una associazione tra balneazione e sviluppo di infezioni gastroenteriche e confermano come uno dei più importanti fattori di rischio per l'insorgenza di queste infezioni sia il consumo di prodotti ittici, molluschi in particolare.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 10 febbraio 2003.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bean NH, Griffin PM. Foodborne disease outbreaks in the United States. 1973-1987: pathogens, vehicles and trends. *J Food Prot* 1990;53:804-17.
2. Waites WM, Arbutnot JP. Foodborne illness: an overview. *Lancet* 1990;336:722-5.
3. Monto AS, Koopman S. The Tecumseh Study. XI. Occurrence of acute enteric illness in the community. *Am J Epidemiol* 1980; 112:323-33.
4. Moore AC, Herwaldt BL, Craun GF, Calderon RL, Highsmith AK, Juranek DD. Waterborne disease in the United States, 1991 and 1992. *MMWR Surv Summ* 1993;19:1-22.
5. Keswick BH et al. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:1290.
6. Ivanova OE et al. Isolation of enteroviruses from water. *Acta Virol* 1986;30:443.
7. Fiore L, De Paolis E, Novello F, Divizia M, Panà A. Characterization by T1 oligonucleotide fingerprinting of three strains of human hepatitis A virus isolated in Italy. *Eur J Epidemiol* 1990;6:29.
8. Eastaugh J, Shephers S. Infectious and toxin syndromes from fish and shellfish consumption. *Arch Intern Med* 1989;149: 1735-40.
9. Kappus KD, Marks JS, Holman RC, Brynant JK, Baker C, Gary GW, Greenberg HB. An outbreak of Norwalk gastroenteritis associated with swimming in a pool and secondary person-to-person transmission. *Am J Epidemiol* 1982;116:834-9.
10. Hedberg CW, Hosterhol MT. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* 1993;6: 199-210.
11. Centers for Disease Control (CDC). Viral agents of gastroenteritis: public health importance and outbreak management. *MMWR* 1990;39(RR-5):1-24.
12. Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberg LB, Feldman R, Greenberg RC. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute non bacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1982;96:756-61.
13. Morse DL, Guzewish JJ, Hanrahan JP, Stricof R, Shayegani M, Deibel R, Grabau JC, Nowak NA, Herrmann JE, Cukor G, Blacklow NR. Widespread outbreaks of clam and oyster-associated gastroenteritis: role of Norwalk virus. *N Engl J Med* 1986;314:678-81.
14. Bolton FJ, Surman SB, Martin K, Wareing DR, Humphrey TJ. Presence of *Campylobacter* and *Salmonella* in sand from bathing beaches. *Epidemiol Infect* 1999;122(1):7-13.
15. Weast PA, Lee JV. Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae*, in natural waters of Kent, England. *J Appl Bacteriol* 1982;52:435-48.
16. Farina C, Luzzi I, Lorenzi N. *Vibrio cholerae* O2 sepsis in a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18: 203-5.
17. Farina C, Gnechi F, Luzzi I, Vailati F. *Vibrio cholerae* O2 as a cause of a skin lesion in a tourist returning from Tunisia. *J Travel Med* 2000; 7(2):92-4.

## Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici

Luciana CROCI e Elisabetta SUFFREDINI

*Laboratorio di Alimenti, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - I prodotti ittici costituiscono da sempre un'importante fonte per l'alimentazione umana. L'aumento del loro consumo e i dati epidemiologici che confermano il ruolo dei prodotti della pesca, specialmente molluschi, come vettori di tossinfezione alimentare hanno determinato tuttavia l'esigenza di un maggiore controllo delle loro caratteristiche microbiologiche. In questa rassegna vengono presi in considerazione i principali microrganismi patogeni associati con tali prodotti, con particolare attenzione verso i patogeni emergenti non considerati nella normativa (patogeni ambientali, ad es. vibrioni e virus enterici) esaminando le modalità della loro presenza e sopravvivenza nell'ambiente marino, i meccanismi mediante cui essi contaminano i prodotti ittici e la loro resistenza ai trattamenti subiti dall'alimento prima della commercializzazione ed al momento del consumo.

*Parole chiave:* prodotti della pesca, *Vibrio*, virus enterici, contaminazione.

**Summary** (*Microbiological risk associated to seafood consumption*). - Seafood has always been an important source for human nutrition. The increase of its consumption, however, and the epidemiological data, confirming the role of seafood, especially shellfish, as a carrier of foodborne toxoinfections, has brought the need of a greater control of his microbiological characteristics. In this review we considered the main pathogenous microorganisms associated to such products, with a special attention towards the emerging pathogens not yet considered in the legislation (autochthonous pathogens, e.g. vibrios and enteric viruses). We examined the conditions of their presence and survival in the marine environment, the mechanisms through which they contaminate seafood and their resistance to the treatments endured by food before the commercialization and at the moment of the consumption.

*Key words:* seafood, *Vibrio*, enteric virus, contamination.

### Introduzione

I prodotti della pesca costituiscono per l'uomo un importante apporto nutrizionale in quanto fonte di proteine di elevata qualità, accompagnata, in alcune specie, ad un costo contenuto. L'incremento nella richiesta di tali alimenti ha determinato la necessità di un più rigoroso controllo sanitario al fine di prevenire le malattie da essi trasmesse, per la maggior parte costituite da intossicazioni di origine microbiologica. In aggiunta alla naturale presenza di microrganismi patogeni nell'ambiente marino, infatti, la contaminazione delle acque da parte di scarichi fognari ricchi di batteri e virus enterici e le fioriture fitoplanctoniche delle acque costiere (con conseguente possibile modificazione della flora microbica e selezione di particolari ceppi batterici) hanno accresciuto l'eventualità di comparsa di situazioni di rischio sanitario.

In questa rassegna saranno presi in analisi i principali fattori di rischio microbiologico associati con il consumo dei prodotti della pesca, specialmente

molluschi, prestando particolare attenzione ai patogeni emergenti non considerati nella normativa (patogeni ambientali, ad es. Vibrionaceae e virus enterici).

### Contaminazione microbiologica dei prodotti ittici

La flora microbica di un prodotto ittico è strettamente correlata alle sue abitudini di vita e alle caratteristiche microbiologiche dell'ambiente in cui esso nasce e si sviluppa. In vita il pesce sano presenta microrganismi vitali sulla cute, sulle branchie e nell'intestino, mentre le masse muscolari sono essenzialmente sterili. I pesci provenienti da mari freddi sono prevalentemente colonizzati da batteri Gram-negativi psicofili, mentre quelli provenienti da mari tropicali prevalentemente da batteri Gram-positivi mesofili. La maggior parte dei Gram-negativi appartiene ai generi *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium* e *Cytophaga*. I Gram-positivi, invece, appartengono più spesso ai generi

*Micrococcus* e *Bacillus*. Nei gamberi tropicali sono state rinvenute significative colonizzazioni da parte di *Corynebacterium* e Gram-negativi bastoncellari.

Sulla cute e nelle branchie generalmente predominano specie aerobie (*Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Moraxella* spp, *Cytophaga*), mentre a livello intestinale si ritrovano germi Gram-negativi aerobi-anaerobi facoltativi (*Vibrio* spp in gran maggioranza, *Alcaligenes* spp, *Flavobacterium* spp, *Xanthomonas* spp) e in forma più modesta alcuni Gram-positivi (*Micrococcus* spp, *Bacillus* spp, *Corinebacterium*) [1].

Il momento più delicato in cui può verificarsi la contaminazione della massa muscolare del pesce è quello riguardante le operazioni iniziali che si compiono direttamente sul peschereccio: scelta, lavaggio, eventuale mondadura, eviscerazione e dissanguamento del pesce. I pericoli sono dati dall'originaria contaminazione del pesce stesso e dalla possibilità di contaminazioni crociate tra i vari esemplari. Se le operazioni non vengono condotte con le dovute cautele, in particolar modo nelle fasi di eviscerazione e lavaggio, si possono avere trasferimenti di microrganismi e parassiti dalla cute e dai visceri alle masse muscolari. Nel muscolo del pesce, inoltre, sono presenti alcune proteasi, (catepsine e peptidasi) che nello stato *post mortem*, pur non provocando eccessivi danni diretti, favoriscono, mediante reazioni autolitiche, la graduale invasione batterica dall'intestino e la proliferazione.

Dopo 2-3 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione tendono a prevalere i batteri psicofili Gram-negativi aerobi, in particolare *Pseudomonas* e *Alteromonas* spp mentre in pesci provenienti da mari tropicali anche germi quali *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* e *Moraxella* possono inizialmente raggiungere livelli apprezzabili. Con l'ulteriore protrarsi della conservazione, *Pseudomonas* raggiunge livelli notevoli, potendo in alcuni casi costituire oltre l'80% della microflora presente. Nel caso di un ritardo iniziale nella conservazione a basse temperature, quando il prodotto raggiunge uno stato di deterioramento più o meno evidente, si può invece riscontrare un elevato numero di *Bacillus* e *Aeromonas* [2].

Per quanto riguarda l'induzione di patologie nell'uomo, alcune specie di *Pseudomonas*, *Klebsiella* o *Staphylococcus* sono state in diverse occasioni segnalate come responsabili; sono poi ampiamente documentati casi di gastroenteriti da Vibrionaceae, specialmente dopo il consumo, senza cottura, di pesci provenienti da mari caldi. Anche le contaminazioni del pesce da parte di spore botuliniche, provenienti dall'acqua o dai sedimenti fangosi, non sono un evento raro ed un piccolo numero di *Clostridi* produttori di tossine botuliniche può albergare nell'intestino dei pesci. Le eventuali azioni pericolose, tuttavia, si

creano in questi casi solo dopo cottura inadeguata e conservazione sottovuoto a temperatura ambiente. Rare enteriti umane sono infine dovute a *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*, mentre non sono importanti le infezioni virali. In via teorica, infatti, contaminazioni fecali umane possono produrre contaminazioni dei pesci con virus enterici, ma non ne risulta mai una concentrazione tale da essere pericolosa.

## Molluschi eduli lamellibranchi

### Notizie epidemiologiche

I molluschi eduli lamellibranchi sono implicati da sempre nella trasmissione di malattie gastroenteriche di diversa gravità come febbri tifoide e colera.

Soltanto dagli anni '50 comunque, grazie al miglioramento delle tecniche per il trattamento delle acque di scarico e grazie allo sviluppo di standard per la classificazione delle aree di allevamento e raccolta dei molluschi, l'incidenza di tali malattie, soprattutto della febbre tifoide, iniziò a declinare. Ciò nonostante i molluschi non hanno smesso di costituire un pericolo per la salute umana.

Secondo i dati del Center for Disease Control (CDC), ad esempio, nel decennio '78-'87, si sono verificate solo negli USA un totale di 128 epidemie gastroenteriche di vario tipo (comparsa di due o più casi collegati alla stessa sorgente alimentare) e 3747 casi associati con il consumo di molluschi (National Advisory Committee On Microbiological Criteria for Foods, 1992). E' ragionevole comunque ritenere che i dati epidemiologici a disposizione siano sottostimati; in molti casi, infatti, il consumo di molluschi provoca solo sintomi gastrointestinali di lieve entità, che non determinano il ricorso al sistema sanitario.

Un dato epidemiologico è particolarmente rilevante nella descrizione dei problemi sanitari connessi al consumo di molluschi: negli ultimi 25 anni è stato possibile riscontrare che i patogeni batterici associabili a contaminazione fecale delle acque (ad es. coliformi e salmonelle) sono stati responsabili solo del 4% delle epidemie associate a questi prodotti, mentre i batteri naturalmente presenti nell'ambiente marino sono risultati responsabili per il 20% delle malattie e per il 99% delle morti [3]. Fra tali patogeni autoctoni dell'ambiente marino un ruolo primario nelle patologie dovute al consumo di molluschi è svolto dai microrganismi appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae.

Per quanto riguarda *V. cholerae*, i molluschi sono sicuramente tra i maggiori fattori della sua trasmissione in diverse parti del mondo. Una ricerca del Foodborne and Diarrheal Diseases Branch del CDC ha

evidenziato come nel triennio '92-'94 in 20 Stati americani sottoposti a sorveglianza si verificarono 160 casi di colera, legati principalmente a due epidemie (a bordo di un volo Lima-Los Angeles e al termine di una crociera nel sud-est asiatico). Nel nostro Paese epidemie di colera nel 1973 interessarono la zona di Napoli e la Puglia [4], ripetendosi poi nel 1979 anche in Sardegna e del tutto recentemente, fra ottobre e dicembre del 1994, 12 casi di colera furono segnalati nella provincia di Bari in soggetti che avevano consumato molluschi e gasteropodi crudi [5]. Analisi di laboratorio consentirono di collegare con sufficiente certezza i casi di Bari all'epidemia che nel settembre del 1994 aveva coinvolto l'Albania meridionale e che aveva prodotto 300 casi, dovuti principalmente all'utilizzo di acqua municipale inquinata [6].

Un ruolo importante tra le malattie virali veicolate dai molluschi riveste sicuramente l'epatite A. Al consumo di tali prodotti, infatti, sono attribuiti per gli USA, la Gran Bretagna e la Germania rispettivamente il 19, il 25 e il 20% dei casi di epatite A notificati in quei Paesi. In Italia, secondo i dati del Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA), più del 60% dei casi di epatite A segnalati negli ultimi anni sono stati correlati al consumo di molluschi [7]. Altri virus di grande rilevanza sono i *Calicivirus*, in particolare i *Norwalk-like virus*, responsabili della malattia già nota sin dagli anni '30 come sindrome di vomito invernale. In Olanda tali virus sono responsabili di circa l'80% dei casi di gastroenterite, in Gran Bretagna ed in USA di circa il 30%. Tale incidenza è tuttavia sottostimata poiché, trattandosi di una patologia relativamente lieve, solo occasionalmente necessita dell'ospedalizzazione.

#### Normativa

La produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi, considerati alimenti ad alto rischio, sono disciplinate dal DL.vo 530/92. Tale decreto, recependo le raccomandazioni della direttiva CEE 91/492, stabilisce che i molluschi subiscano un destino diversificato in base alla zona di provenienza. Le acque destinate alla mitilicoltura vengono classificate dalle Regioni, attraverso un procedimento ripetuto con scadenza triennale, in tre categorie:

1) *zona A*: i cui molluschi possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto. Tali molluschi devono soddisfare i seguenti requisiti:

- contenere meno di 300 coliformi fecali o meno di 230 *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intervalvare;
- non contenere salmonelle in 25 g di polpa;
- non contenere sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente in quantità tale che l'assunzione tramite alimenti superi la DGA (dose giornaliera ammissibile) per l'uomo;

- avere un tenore massimo di nuclidi radioattivi non superiore ai limiti fissati dalla CEE;

- avere un tenore massimo di biotossine algali PSP (*paralytic shellfish poison*) nelle parti commestibili non superiore a 80 µg per 100 g (misurato mediante metodo biologico);

- non dare, con i metodi di analisi biologica, reazione positiva per la presenza di tossine DSP (*diarrhetic shellfish poison*);

- avere un tenore massimo di ASP (*amnesic shellfish poison*) non superiore ai 20 µg di acido domoico per grammo (metodo di analisi HPLC).

2) *zona B*: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 6000 coliformi fecali per 100 g di polpa o 4600 *E. coli* per 100 g di polpa nel 90% dei campioni. Mediante depurazione o stabulazione, i molluschi provenienti da tali zone di produzione dovranno arrivare a soddisfare i requisiti fissati per i molluschi delle zone A.

3) *zona C*: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A; la stabulazione può essere associata o meno ad un processo di depurazione intensivo. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 60 000 coliformi fecali per 100 g di polpa.

La depurazione, effettuata in centri riconosciuti dal Ministero della Salute, deve consentire ai molluschi di raggiungere i parametri precedentemente citati mediante il rilascio della contaminazione residua. I molluschi devono essere messi nelle condizioni di riprendere rapidamente la nutrizione mediante filtrazione e devono mantenere intatta la loro vitalità. Nel corso del processo di depurazione è possibile utilizzare acqua di mare pulita (o resa tale mediante trattamento) ovvero acqua di mare ricostituita mediante aggiunta dei suoi principali componenti chimici all'acqua potabile. Il processo di depurazione deve essere ininterrotto e deve garantire che lotti diversi di molluschi non si trovino mai a stabulare nelle medesime vasche nello stesso momento.

I centri di depurazione devono garantire il rispetto delle buone pratiche di lavorazione mediante controllo da parte di un laureato in discipline mediche, biologiche o chimiche e devono provvedere ad effettuare i controlli analitici sulle caratteristiche igienico-sanitarie dei molluschi in un laboratorio annesso alla struttura o avvalendosi di un laboratorio esterno riconosciuto dal Ministero della Salute.

Successivamente nel Decreto del 31 luglio 1995 sono state pubblicate le metodiche di analisi per la determinazione nei molluschi bivalvi dei coliformi fecali, di *Escherichia coli*, delle salmonelle e delle biotossine algali.

#### Modalità di contaminazione

I molluschi sono, nella maggioranza dei casi, animali scavatori sessili o sedentari, che si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell'acqua o nei sedimenti mediante un meccanismo di filtrazione pressoché ininterrotto. A seconda delle dimensioni, della specie e della temperatura di stabulazione, i molluschi sono in grado di filtrare quantità variabili di acqua: un mitilo filtra a 14 °C circa 1,5 litri di acqua l'ora, l'ostrica europea ne filtra 12 a 15 °C, mentre quella americana supera i 18 litri se tenuta a 20 °C [8]. Durante questa intensa attività di filtrazione i molluschi trattengono nel loro organismo non solo il plancton necessario al loro metabolismo, ma anche batteri e virus eventualmente presenti nell'ambiente.

La normativa vigente sui molluschi, basandosi sul controllo di batteri fecali, non assicura che tali prodotti siano esenti da agenti patogeni. E' ormai, infatti, ampiamente documentato che la presenza di batteri indice di contaminazione fecale, non è correlata a quella di Vibrionaceae, che sono normalmente presenti nell'ambiente marino, né alla presenza di virus enterici. Questi ultimi, infatti, sebbene provenienti da contaminazioni fecali, risultano più resistenti dei batteri ai comuni trattamenti di bonifica delle acque di scarico e possono quindi ritrovarsi anche in acque prive di batteri fecali [9].

### Le Vibrionaceae

La famiglia delle Vibrionaceae comprendeva fino ad alcuni anni or sono i generi *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Con la trasformazione degli ultimi due gruppi in famiglie, le Vibrionaceae hanno continuato a racchiudere solo il genere *Vibrio* ed alcuni generi meno noti nell'ambito della microbiologia degli alimenti come *Catenococcus*, *Listonella*, *Moritella*, *Photobacter* e *Photobacterium* (NCBI Taxonomy browser). Attualmente più di 40 specie vengono riconosciute appartenere al genere *Vibrio* (a fronte delle 26 indicate nella prima edizione del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) tutte isolate da o associate con l'ambiente acquatico.

#### Il genere *Vibrio*

Il genere *Vibrio* comprende bacilli Gram-negativi con dimensioni tra 0,5-0,8 µm in larghezza e 2-3 µm in lunghezza, a forma talvolta leggermente ricurva e

mobili per la presenza di un flagello polare monotrico o multitratico, racchiuso in un rivestimento continuo con la membrana esterna della parete cellulare. I vibrioni presentano metabolismo sia fermentativo che aerobio e non producono spore. Le specie appartenenti a questo genere, ad eccezione di *V. metschnikovii*, sono ossidasi-positive [10] e fermentano il glucosio, alcune con produzione di gas. La crescita della maggioranza dei vibrioni è stimolata dalla presenza di sodio e, per alcune specie, tale ione è indispensabile.

Molte specie di vibrioni sono parte della flora batterica acquatica autoctona e circa metà di essi è stata associata in modo più o meno definitivo con infezioni nell'uomo o in animali acquatici.

Alcune infezioni da vibrioni rivestono una certa importanza, poiché comprese fra quelle malattie che richiedono quarantena ed obbligo di notifica alla World Health Organization (es. *V. cholerae*), perché note per causare alta mortalità (es. *V. vulnificus*) o perché causa di un alto numero di tossinfezioni in alcuni Paesi (es. *V. parahaemolyticus* in Giappone). Oltre a queste, almeno altre nove specie sono riconosciute patogene per l'uomo (Tab. 1) [11, 12]. Fra queste *V. mimicus*, così chiamato per la sua somiglianza a *V. cholerae* O1, *V. alginolyticus* e *Photobacterium damsela* (precedentemente denominato *V. damsela*).

#### *Vibrio cholerae*

*V. cholerae* è diviso in sierogruppi in base all'antigene somatico O, un polisaccaride termostabile dello strato lipopolisaccaridico presente sulla superficie della cellula. Il sierogruppo O1 include i ceppi responsabili del colera epidemico ed è ulteriormente suddiviso in due biotipi: Classico, responsabile di sei pandemie verificatesi tra il 1817 e il 1923 ed El Tor, responsabile della settima pandemia che iniziò nel 1961 [13].

I ceppi appartenenti a sierogruppi diversi da O1 sono conosciuti come *V. cholerae* non-O1. Essi sono associati a casi sporadici di gastroenterite e lievi forme di malattia simili al colera e, fino a qualche anno fa, erano ritenuti incapaci di provocare colera epidemico. Tuttavia alcune epidemie di colera tipico sono state attribuite ad un sierogruppo emergente, il *V. cholerae* O139 (o *V. cholerae* Bengala). Dalla sua comparsa in India e Bangladesh nel 1992 si è diffuso talmente rapidamente da indurre alcuni ricercatori a parlare di un'ottava pandemia in corso.

Il colera è una diarrea secretoria che si manifesta per ingestione di acqua o cibo contaminato da *V. cholerae* O1 e O139, dopo un periodo di incubazione variabile tra le 12 e le 72 ore. Data la sensibilità del vibrione all'acidità gastrica la dose infettiva è piuttosto alta (circa 10<sup>8</sup> batteri), però pazienti affetti da ipocloridria o problemi gastrici sono suscettibili a dosi infettanti

Tabella 1. - Vibrioni patogeni associati a patologie umane

Specie <i>Vibrio</i>	Sito di infezione						
	Tratto gastro-intestinale	Ferita	Orecchio	Setticemia primaria	Batteriemia	Polmone	Meningi
<i>V. cholerae</i> O1/O139	++	(+)	?	?	?	?	?
<i>V. cholerae</i> non-O1 / non-O139	++	+	+	(+)	(+)	?	(+)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	+	(+)	?	(+)	(+)	(+)
<i>V. vulnificus</i>	+	++	?	++	+	(+)	(+)
<i>V. fluvialis</i>	++	?	?	?	?	?	?
<i>V. alginolyticus</i>	?	++	+	?	(+)	?	?
<i>V. damsela</i>	?	++	?	?	?	?	?
<i>V. furnissii</i>	(+)	?	?	?	?	?	?
<i>V. hollisae</i>	++	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. mimicus</i>	++	+	+	?	?	?	?
<i>V. metschnikovii</i>	(+)	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. cincinnatiensis</i>	?	?	?	?	(+)	?	(+)
<i>V. carchariae</i>	?	++	?	?	?	?	?

++ più comune sito di infezione; + altri siti di infezione; (+) raro sito di infezione; ? da stabilire. Modificata da [11, 12].

inferiori ( $10^3$ - $10^5$  organismi) [14]. La simultanea ingestione di cibo inoltre può fornire ai batteri una barriera protettiva contro l'acidità gastrica, permettendo alle cellule sopravvissute di colonizzare le pareti dell'intestino tenue [15].

I fattori di virulenza principali di tali ceppi sono: l'enterotossina colerica (CT) e il pilo coregolato con la tossina (TCP), che media la colonizzazione dell'intestino tenue.

#### *Vibrio parahaemolyticus*

Il *V. parahaemolyticus* fa parte della flora batterica autoctona nell'ambiente marino costiero nelle regioni tropicali e temperate di tutto il mondo. La sua distribuzione e concentrazione in un certo luogo è influenzata da fattori ambientali (in particolare salinità dell'acqua e temperatura) e dalla sua interazione con forme di vita superiori dell'ambiente marino. Nelle regioni temperate l'andamento stagionale registra una proliferazione di tali batteri nei mesi estivi più caldi, mentre tali germi non sono rintracciabili durante i mesi invernali, quando la temperatura delle acque è inferiore a 20 °C.

Vista la scarsa correlazione di questi microrganismi con l'inquinamento fecale [16], la contaminazione dei prodotti della pesca freschi, es. crostacei, molluschi e pesce, è strettamente legata alla presenza naturale dei vibrioni nell'ambiente da cui i prodotti sono stati raccolti.

Le concentrazioni di *V. parahaemolyticus* nei prodotti della pesca sono generalmente inferiori a  $10^3$  c.f.u. per g, ma possono essere più alte quando la raccolta avviene da acque molto calde [17]. Tale even-

tualità, unita con i rapidi tempi di replicazione di questo microrganismo, risulta essere particolarmente pericolosa poiché permetterebbe di raggiungere rapidamente concentrazioni in grado di indurre malattia negli adulti sani, nei quali la dose infettante è superiore alle  $10^5$  unità [18].

#### *Vibrio vulnificus*

Il *V. vulnificus* è comunemente isolato dai molluschi. Si trova solitamente in concentrazione inferiore rispetto al *V. parahaemolyticus* ma il suo numero può raggiungere  $10^5$  cellule per g di mollusco, quando vengono raccolti da acque molto calde [19]. A differenza del *V. parahaemolyticus* sembra dimorare anche in acque fredde tanto che, in alcuni casi, è stato isolato nelle coste del Maine e della Nuova Scozia, nonché in acque costali dell'Olanda [6].

Le infezioni da *V. vulnificus* sono abbastanza sporadiche e sono solitamente associate al consumo di ostriche, mentre pesci e crostacei sembrano avere minore peso nella trasmissione dell'infezione. La dose infettante per questa specie però è, a differenza degli altri vibrioni, molto bassa ( $10^3$  unità) specialmente in alcuni gruppi con patologie predisponenti (malattie epatiche, diabete, immunodepressione, tumori maligni) o con comportamenti a rischio (abuso di alcol) [20, 21]. I sintomi delle infezioni alimentari da *V. vulnificus* si manifestano principalmente al di fuori dell'intestino ed includono febbre, brividi e nausea piuttosto che gastroenterite. Il batterio, inoltre, causa setticemia e, in molti casi, lesioni cutanee, come vesciche e ulcere necrotizzanti, che si sviluppano nelle estremità e nel tronco [14]. Il periodo di incubazione

(in media 38 ore) è seguito da un rapido deterioramento delle condizioni del paziente fino, eventualmente, alla morte che occorre nel 40-60% dei casi [22] anche in presenza di terapie antibiotiche aggressive.

#### *Sopravvivenza dei vibrioni nell'ambiente marino e fattori interferenti*

I vibrioni, come altri batteri autoctoni ambientali, sono costretti a subire profonde e frequenti modificazioni dell'ambiente circostante, relative a vari fattori, quali temperatura, concentrazione dei nutrienti, salinità, pressione osmotica, pH, ecc. A tali cambiamenti i vibrioni reagiscono mediante una serie di adattamenti di carattere fisiologico e biochimico. Il più interessante di questi adattamenti è l'ingresso in una fase di quiescenza, durante la quale essi rimangono vitali ma diventano non coltivabili con i metodi tradizionali di isolamento. In tali condizioni i microrganismi, pur mantenendo intatta la loro patogenicità, subiscono diverse modificazioni morfologiche e fisiologiche:

- cambiano dimensione (si riducono da 15 a 300 volte); in queste condizioni quindi possono non essere trattenuti sulle membrane con pori da 0,45 µm comunemente utilizzate per filtrare le acque;
- modificano il proprio metabolismo riducendo il ritmo di respirazione e orientandosi verso vie metaboliche in grado di evitare i danni strutturali indotti da carenze di specifici nutrienti;
- arrestano i cicli di divisione.

I fattori che intervengono più direttamente sulla vitalità dei vibrioni sono la temperatura e la salinità. L'andamento stagionale dei vibrioni nell'ambiente, come pure l'incremento nei mesi estivi delle tossinfezioni prodotte dai vibrioni, sono stati ormai ampiamente documentati. In diversi studi è stato evidenziato come al di sopra di 17 °C la frequenza di isolamento di *V. cholerae* sia strettamente correlata alla temperatura, mentre l'isolamento di pressochè tutte le specie diventa piuttosto raro quando la temperatura scende al di sotto dei 10 °C.

Rispetto alla salinità i vibrioni hanno comportamento variabile: *V. cholerae* e *V. mimicus*, le cui principali riserve ambientali sono costituite dalle acque sia estuarine che fluviali, tollerano salinità comprese fra lo zero e il 3%, mentre altri vibrioni, tipici invece degli ambienti costieri (es. *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*), risentono maggiormente delle concentrazioni di Na<sup>+</sup> e crescono più rapidamente con una salinità uguale o superiore al 3%.

Un altro fattore in grado di influenzare la sopravvivenza dei vibrioni nell'ambiente è il pH. I vibrioni sono infatti molto sensibili alle condizioni acide, anche se studi recenti hanno evidenziato come alcuni ceppi di *V. cholerae* (sia O1 che non-O1) producano una

matrice intercellulare che favorisce l'aggregazione dei batteri e fornisce protezione al microorganismo nei confronti di condizioni avverse. Anche l'associazione con zoo e fitoplancton (copepodi, alghe verdi, cianofite) e con macrofite (alghe brune) può permettere ai vibrioni una sopravvivenza più lunga rispetto alle cellule *free-living*.

#### *Rilevamento di vibrioni nei molluschi*

Si riportano a tale proposito i risultati ottenuti in alcuni studi condotti su molluschi allevati in mari italiani. Per quanto riguarda i batteri autoctoni è noto che tra questi è facile riscontrare batteri con caratteristiche di patogenicità. Ad esempio Cattabiani nel 1990 [23] isolò da mitili provenienti dal mare Adriatico il *V. vulnificus*. Un altro studio condotto in una zona compresa tra Pescara e Porto San Giorgio ha evidenziato che circa il 12% dei germi rinvenuti apparteneva al genere *Vibrio* [24]. Inoltre già dagli anni '70 erano stati isolati più volte da pesci pescati nel Golfo di Trieste ceppi di *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* che possono occasionalmente provocare patologie nell'uomo [25].

Più recentemente, un'indagine condotta presso i nostri laboratori nell'ambito del progetto Prisma sulla salvaguardia del Mare Adriatico ha evidenziato che su 726 ceppi isolati da molluschi il 46,86% apparteneva al genere *Vibrio*, il 29,75% al genere *Aeromonas*, mentre il rimanente 23,39% era costituito dai generi *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Agrobacterium* e *Ochrobacterium*. Tra i batteri appartenenti al genere *Vibrio* veniva riscontrato *V. alginolyticus* (67,95%) e specie patogene come *V. parahaemolyticus* (10%), *V. vulnificus* (10%) e *Photobacterium damsela* (10,88%). Tale rinvenimento subiva comunque delle differenziazioni a seconda della stagione; il rinvenimento di batteri del genere *Vibrio*, infatti, risultava particolarmente frequente nella stagione estiva, diminuiva in autunno ed in primavera mentre era piuttosto scarso nei mesi invernali [26]. La stagionalità degli isolamenti era probabilmente correlata all'ingresso nella già descritta fase di quiescenza che i vibrioni, analogamente ad altri autoctoni ambientali, effettuano in presenza di condizioni avverse.

### **Virus enterici**

Sono conosciuti oltre 120 differenti tipi di virus enterici, suddivisi in diversi gruppi a seconda delle loro caratteristiche morfologiche, fisiche, chimiche ed antigeniche (Tab. 2).

Soltanto per alcuni, comunque, è stata epidemiologicamente provata la trasmissione in seguito al consumo di alimenti, anche se, potenzialmente, qualsiasi virus enterico, la cui ingestione è causa di malattia, può essere trasmesso mediante i cibi.

**Tabella 2.** - Principali virus enterici umani

Virus	n. di sierotipi conosciuti	Sintomatologia causata	
Enterovirus	Poliovirus	3	Meningite, paralisi, febbre
	Echovirus	32	Meningite, diarrea, rash, febbre, malattie respiratorie
	Coxsackievirus A	23	Meningite, erpagina, febbre, malattie respiratorie
	Coxsackievirus B	6	Miocarditi, anomalie cardiache congenite, pleurodinia, malattie respiratorie, febbre, rash, meningite
	Nuovi enterovirus (tipi 68-71)	> 4	Meningiti, encefaliti, congiuntivite acuta emorragica, febbre, malattie respiratorie
Calicivirus	Epatite A (enterovirus 72?)	1	Epatite infettiva
	Rotavirus	6	Diarrea, sintomi respiratori
	Adenovirus	47	Febbre, sintomi respiratori, congiuntiviti, diarrea
	Reovirus	3	Non chiaramente stabilito
	Norwalk-like(*)	2	Diarrea, vomito, febbre
	Sapporo-like(**)	?	Diarrea, vomito, età pediatrica
	Epatite	1	Epatite
	Astrovirus e altri piccoli virus a struttura rotondeggiante (SRSVs)	5+7	Gastroenteriti
	Coronavirus e altri possibili virus (torovirus, picobirnavirus, parvovirus, ecc.)	?	?

(\*) Anche conosciuti come *small round structured viruses* o SRSV; (\*\*) anche definiti come *calicivirus tipici*.

*Modalità di infezione*

I virus passano da ospite a ospite sotto forma di particelle inerti, che si presentano irregolarmente sferiche con un diametro che varia da 25-35 nm (Picornavirus come il virus dell'epatite A, e Calicivirus come i Norwalk-like virus), a 75 nm (Rotavirus).

I virus più piccoli trasmessi con gli alimenti contengono una singola catena di RNA, mentre i Rotavirus sono a doppia catena. Sono conosciuti anche virus enterici a DNA ma per nessuno di essi è stata provata la trasmissione attraverso alimenti o acqua.

La superficie esterna dei virus è costituita da un rivestimento proteico altamente specifico che protegge l'RNA e funge da antigene contro cui si attiva la risposta immunitaria dell'ospite. Essendo particelle inerti, non si riproducono al di fuori dell'ospite e quindi, a differenza dei batteri, non si moltiplicano né producono tossine negli alimenti, ma possono essere semplicemente veicolati da questi nel momento dell'ingestione. In base all'interazione tra il rivestimento proteico e i recettori della cellula ospite i virus presentano specificità relativamente alla specie di ospite e ai tessuti che possono infettare, perciò virus di origine non umana, eventualmente presenti negli alimenti, sono raramente un pericolo per la salute dell'uomo [27].

L'efficienza con cui i virus ingeriti infettano non è ben nota. E' stato riferito che dosi minime, fino ad una singola unità infettante le culture cellulari, hanno

prodotto infezione per via orale, ma alcuni studi hanno evidenziato effetto solo in presenza di dosi considerevolmente maggiori (il vaccino di Sabin, ad esempio, è somministrato a livelli di almeno 100 000 dosi infettanti per assicurare una risposta del 90%). Evidenze epidemiologiche, comunque, indicano per molti virus enterici una dose infettante molto bassa, dell'ordine di 10-100 unità virali [28]. E' noto tuttavia che la sola presenza dell'agente patogeno non è condizione sufficiente a determinare la malattia, che dipende da una serie di fattori quali la virulenza dell'agente eziologico, le condizioni ambientali, biologiche, sociali e fisiche dell'ospite.

Dopo essere stati ingeriti con gli alimenti i virus iniziano l'infezione a livello dei tessuti dell'intestino tenue. Nella maggior parte dei casi essi si replicano a livello della mucosa intestinale, vengono liberati probabilmente insieme alle cellule infettate nel lume intestinale e passano attraverso il colon con il chimo. Alcuni virus liberati durante la fase intestinale dell'infezione possono essere trasportati tramite il sistema linfatico ed il sangue ad altri organi, provocando infezioni secondarie (poliomielite, miocarditi, ecc.). Durante la malattia i virus vengono eliminati con le feci in gran quantità (10<sup>8</sup>-10<sup>10</sup> virus/g). E' evidente quindi che una piccola frazione di g di feci può contenere abbastanza virus da indurre la malattia nell'uomo e, per tale motivo, è estremamente importante osservare tutte le norme igieniche necessarie ad evitare la contaminazione dei cibi.

### *Sopravvivenza nell'ambiente e contaminazione dei molluschi*

I virus enterici eliminati con le feci degli individui infetti, attraverso gli scarichi, arrivano alle acque superficiali. Tali virus sono di norma più resistenti dei batteri ai comuni trattamenti di bonifica (compresa la clorazione) ed è stato dimostrato che possono sopravvivere fino a 130 giorni in acqua di mare, cioè per periodi più estesi rispetto ai batteri, come i coliformi, che vengono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale dell'acqua e dei molluschi [29]. Inoltre molti fattori possono influenzare la sopravvivenza di tali virus: la temperatura, la salinità, l'antagonismo microbico, le radiazioni solari e l'associazione con particelle solide del plancton, che svolgono un'azione protettiva [30]. Di tutti questi fattori la temperatura è probabilmente il più importante. È noto, ad esempio, che molti virus enterici possono sopravvivere anche per parecchi mesi a temperature inferiori a 10 °C. I sedimenti marini, inoltre, costituiscono il reale reservoir dei virus e li proteggono dall'azione inattivante di temperatura, pH e UV, dall'antagonismo microbico ed anche dall'azione dei disinfettanti.

I virus, una volta arrivati nei molluschi, vengono trattenuti per diversi giorni, anche se questi vengono posti in acque di stabulazione pulite ed è stato dimostrato che permangono anche dopo che i molluschi hanno rilasciato i batteri indici di contaminazione fecale.

La legge che regola la commercializzazione dei molluschi (DL.vo 530/92), come già riportato, basa il giudizio di idoneità microbiologica al consumo di tali prodotti solo sulla determinazione di parametri batteriologici (salmonelle ed *E. coli*) data la mancanza di metodi per la ricerca dei virus da utilizzare routinariamente. È però ormai ampiamente documentato il fatto che la presenza di virus non è sempre correlata alla presenza di batteri di origine fecale [31]. Di contro, alcuni autori hanno dimostrato che in acque fortemente contaminate da germi, in particolare Gram-negativi, il reperimento di virus è molto scarso, forse a causa dell'azione inattivante di metaboliti batterici. Pertanto, dal punto di vista di una contaminazione virale, mitili stabulati in acque batteriologicamente pulite potrebbero essere più pericolosi.

### *Sopravvivenza negli alimenti sottoposti a trattamenti di conservazione o inattivazione*

I virus enterici, una volta arrivati negli alimenti, possono sopravvivere per periodi più o meno lunghi anche se questi vengono sottoposti a trattamenti di conservazione. Ad esempio il congelamento di frutti di mare consente la sopravvivenza dei virus enterici e dell'HAV per settimane o addirittura mesi; nel 1980,

infatti, in USA si verificò un episodio di gastroenterite da Norwalk virus, causato da mitili che erano stati congelati per 15 settimane prima del consumo. Alcuni autori hanno dimostrato che i poliovirus sopravvivono per 30-90 giorni in ostriche congelate e oltre 300 giorni in gamberetti sgusciati mantenuti a -20 °C [32].

Alcuni trattamenti di bonifica, come il riscaldamento (al di sopra di 70 °C) e l'irraggiamento, provocando una denaturazione delle proteine del capsido e/o una frammentazione dell'acido nucleico, sono in grado di inattivare i virus presenti.

Il trattamento più vantaggioso rimane tuttora quello termico, anche se spesso gli stessi componenti degli alimenti (ad esempio l'ambiente proteico) possono proteggere i virus dall'effetto della temperatura. Da alcuni studi risulta, ad esempio, che i molluschi forniscono una buona protezione verso il trattamento termico: il 7-13% di poliovirus aggiunto, infatti, sopravvive in ostriche sottoposte a vari metodi di cottura (al forno, in umido, a vapore, friggitura). Prove sperimentali da noi condotte hanno confermato il ruolo protettivo svolto dai tessuti dei molluschi su HAV. È stato evidenziato infatti che nell'omogenato di mollusco trattato a 80 °C occorre prolungare i tempi di trattamento (oltre 15 min) per inattivare una determinata quantità di virus, a fronte di tempi nettamente più brevi (3 min) per ottenere l'inattivazione nella sospensione virale. Inoltre, alcuni autori hanno dimostrato che temperature di 85-90 °C all'interno del mollusco per 1 min sono sufficienti ad inattivare completamente il virus presente [33]. I dati da noi ottenuti dimostrano che, dopo immersione in bagnomaria a 100 °C per 1 min, il virus presente in un omogenato di mollusco si riduce, ma è ancora quantitativamente determinabile (da 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml a 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/ml). Infatti, poiché la temperatura interna raggiunge gli 85 °C dopo 30 s ed i 90 °C dopo un min, solo mantenendo il campione in immersione per altri 60 s il virus risulta completamente inattivato [34]. Considerando che per alcune preparazioni domestiche i molluschi si ritengono cotti all'apertura delle valve e che essa può avvenire nella cottura a vapore ad una temperatura inferiore a 70 °C dopo 47±5 secondi [35], risulta evidente come tale trattamento non sia assolutamente sufficiente a rendere salubri molluschi contaminati. Durante i procedimenti di cottura, quindi, pur preservando la gustosità del prodotto, è consigliabile porre particolare attenzione ai tempi e alle temperature, le quali devono essere raggiunte anche al cuore del prodotto dove nei primi minuti di trattamento si registra una temperatura mediamente di 7-8 °C inferiore a quella esterna.

### *Efficacia dei processi di depurazione*

La normativa stabilisce che tutti i molluschi non classificati idonei al consumo diretto, ovvero quelli provenienti dalle zone B e C, siano sottoposti a depurazione.

Attualmente i metodi di disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei molluschi si basano sulla utilizzazione di particolari agenti chimici, quali cloro, iodofori ed ozono o agenti fisici quali UV e filtrazione.

La depurazione con il cloro è stato il primo procedimento usato e sebbene sia efficace nel ridurre la contaminazione batterica non risulta altrettanto efficace nei confronti dei virus enterici. Inoltre il cloro, anche a bassi livelli di concentrazione, può influenzare l'attività di filtrazione dei molluschi e quindi il cloro residuo nell'acqua deve essere abbattuto mediante tiosolfato e aereazione prima che l'acqua venga immessa nelle vasche di depurazione.

Gli iodofori vengono utilizzati a concentrazioni che vanno da 0,1 a 0,4 mg/l; essi non hanno alcun apparente effetto sulla attività dei molluschi e sulle loro caratteristiche di edibilità, riducono in breve tempo la quantità di batteri presenti, ma non sono efficaci nei confronti dei virus enterici se non a concentrazioni che danneggiano i molluschi stessi (l' HAV viene inattivato a concentrazioni di iodio attivo superiori a 100 ppm).

Un altro processo di disinfezione si basa sull'impiego dei raggi UV: questo sistema è capace di distruggere i microrganismi quando questi vengano a stretto contatto con la luce e si è dimostrato efficace nei confronti sia di batteri che di virus. Inoltre, a differenza degli altri metodi, non lascia residui e non influenza i processi fisiologici dei molluschi. E' un metodo molto utilizzato negli USA, ma necessita di un'acqua poco torbida, di un flusso a strato sottile e di lampade sempre efficienti. Il sistema deve essere regolarmente pulito per permettere una buona penetrazione della luce UV, pena la perdita di efficacia della disinfezione. Proprio per queste ragioni questo metodo comporta costi di esercizio molto elevati.

L'utilizzo della disinfezione mediante ozonizzazione ha avuto un incremento negli ultimi anni anche nel nostro Paese. L'ozono agisce sui batteri con azione combinata di ossidazione delle proteine, alterazione delle strutture molecolari (aggredisce in particolare i gruppi SH) e blocco enzimatico. I virus sono soggetti allo stesso processo di eliminazione dei batteri, con la differenza che l'ossidazione delle loro proteine avviene più facilmente in quanto privi di membrana cellulare.

Una volta depurata, l'acqua viene immessa in apposite vasche dove vengono posti a stabulare i mitili che, mediante un meccanismo di rilascio riescono a purificarsi dei microrganismi accumulati.

I tempi di depurazione (48 h) attualmente in uso si basano comunque su parametri batteriologici, ma è stato ormai più volte provato che i tempi di rilascio dei virus sono più lunghi di quelli necessari per i batteri coliformi o altri batteri patogeni; è stato inoltre dimostrato che il virus dell'epatite A viene eliminato più difficilmente rispetto agli altri Enterovirus [36]. Già da

alcuni anni nel nostro laboratorio è stata affrontata la problematica, conducendo prove su molluschi sperimentalmente contaminati con poliovirus ed HAV. Campioni di molluschi venivano posti contemporaneamente sia in acqua non trattata che in acqua trattata con ozono, effettuando dei prelievi a tempi stabiliti fino alle 72 h. I molluschi posti in acqua ozonizzata presentavano un rapido decremento del virus nelle prime ore di trattamento; la velocità di rilascio, però, rallentava notevolmente nelle ore successive e dopo 72 h di trattamento era ancora possibile evidenziare una significativa quantità di virus (poliovirus  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml; HAV 10 TCID<sub>50</sub>/ml) [37]. Al contrario, prove effettuate contaminando i campioni con *E. coli*, germe utilizzato come indice di contaminazione fecale, hanno dimostrato che poche ore di trattamento sono sufficienti ad eliminare la contaminazione [38], confermando che tale germe non è un parametro sufficiente a garantire l'assenza di virus nei molluschi e quindi la mancanza di rischio per il consumatore.

Altri studi sono stati condotti sulla depurazione dei molluschi, con l'utilizzo di vasche di nuova concezione nelle quali è possibile regolare e mantenere costanti parametri come salinità e temperatura. Tali parametri, infatti, sono particolarmente importanti per il metabolismo dei molluschi e per ogni specie esistono delle condizioni ottimali, tali da rendere più veloce ed efficace il meccanismo di rilascio dei virus da parte del mollusco. In tali condizioni le nostre prove hanno mostrato, nelle prime 48 h di trattamento, un rapido decremento della concentrazione di HAV da  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml fino ad una quantità inferiore al limite di rilevabilità del metodo quantitativo su cellule ( $< 10$  TCID<sub>50</sub>/ml). Il virus, però, evidenziato mediante RT-nested-PCR, rimane ancora presente anche in campioni mantenuti in depurazione per 120 h [39].

Prove analoghe condotte con batteri del genere *Vibrio*, in particolare *V. cholerae* O1 e *V. parahaemolyticus*, hanno ugualmente dimostrato la scarsa efficacia dei sistemi di depurazione anche su questi microrganismi. E' emerso, infatti, che sia *V. cholerae* O1 che *V. parahaemolyticus* presentano un comportamento differente rispetto a *Escherichia coli*. In particolare, nel corso del trattamento in acqua ozonizzata di 44 ore si ottiene un abbattimento della concentrazione iniziale che per *E. coli* risulta pari ad un fattore 1000, mentre per i due vibrii suddetti è pari ad un fattore 10 [40]. Nella realtà un rapido rilascio dei batteri coliformi può determinare, dopo poche ore di trattamento (5 ore), il raggiungimento dei limiti batteriologici imposti per legge e quindi consente agli stabilimenti di depurazione dei molluschi di utilizzare tempi brevi, economicamente più vantaggiosi. Tali trattamenti di ridotta durata, però, condotti su molluschi con un'alta concentrazione di partenza di vibrii (ad es. molluschi

raccolti da acque molto calde), indurrebbero una riduzione di questi ultimi non sempre sufficiente a garantire la sicurezza di quelle fasce di consumatori a rischio, suscettibili anche a dosi infettanti inferiori alla norma. Inoltre, in caso di conservazione poco idonea, si potrebbero determinare condizioni particolarmente favorevoli alla proliferazione dei vibrioni presenti, vista la diminuzione di microflora competitiva.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

### BIBLIOGRAFIA

- Shewan JM. The microbiology of sea-water fish. In: Borgstrom G (Ed.). *Fish as food*. New York & London: Academic Press; 1961.
- Orefice L. Contaminazione microbiologica dei prodotti ittici. In: Stacchini A (Ed.). *Contaminazione chimica e biologica dei prodotti della pesca*. Roma, Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti Istituzionali, 97/5). p. 22-36.
- Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech* 1997;16:620-40.
- Baine W, Mazzotti M, Pocchiari F et al. Epidemiology of cholera in Italy in 1973. *Lancet* 1974;2(7893):1370-4.
- Maggi P, Carbonara S, Fico C et al. Epidemiological, clinical and therapeutic evaluation of the Italian cholera epidemic in 1994. *Eur J Epidemiol* 1997;13:95-7.
- Greco D, Luzzi I, Sallabanda A et al. Cholera in the Mediterranean: outbreak in Albania. *Eurosurveillance*, settembre 1995; 1-2.
- Mele A, Mazzolini A, Tosti ME, Ciccozzi M, Stroffolini T. SEIEVA - Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta. Rapporto 1995-1996. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti Istituzionali, 97/36).
- Richards GP. Microbial purification of shellfish. *J Food Prot* 1988;51:218-51.
- Goyal SM, Adams WN, O'Malley ML, Lear DW. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle Atlantic region. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:758.
- Murray PR (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press; 1995.
- West PA. The human pathogenic Vibrios. A public health update with environmental perspectives. *Epidemiol Infect* 1989;103:1-34.
- Oliver JD, Kaper JB. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. (Ed.). *Vibrio species*. Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Washington DC: ASM Press; 1997. p. 228-64.
- Barua D, Greenough WB. *Cholera*. New York: Plenum Medical Book Company; 1992.
- Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. *Medical microbiology*. London: Wolfe International Student Edition; 1994.
- Roberts D. Growth and survival of *Vibrio cholerae* in foods. *PHLS Microb Digest* 1992;9:24-31.
- Koh EGL, Huyn JH, LaRock PA. Pertinence of indicator organisms and sampling variables to *Vibrio* concentrations. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3897-900.
- De Paola A, Hopkins LH, Peeler JT et al. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U. coastal waters and oysters. *Appl Environ Microb* 1990;56:2299-302.
- Cliver DO. *Foodborne diseases*. San Diego: Academic Press; 1990.
- Desmachelier PM. *Vibrio*, introduction, including *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. In: Robinson RK (Ed.). *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press; 2000. p. 2237-57.
- Chart H, Griffiths E. The availability of iron and the growth of *Vibrio cholerae* in the sera of patients with haemochromatosis. *FEMS Microbiol Lett* 1985;26:2227-31.
- Johnson JM, McFarland LM. *Vibrio vulnificus*: man and the sea. *J Am Med Assoc* 1985;253:2580-3.
- Varnam AH, Evans MG. *Foodborne pathogens*. London: Wolfe Publishing Ltd; 1991.
- Cattabiani F, Freschi E. Primo isolamento di *V. vulnificus* (biotipo 1) da mitili provenienti da allevamenti del mare Adriatico. *Arch Vet Ital* 1990;41:83-91.
- Gianelli F, Cabassi E, Ciani G, Freschi E. Distribuzione qualitativa dei batteri organotrofi del mare Adriatico. *Vet Ital* 1971;XXII:606-2.
- Babudieri B, Rottini GD, Schreiber F. Primo isolamento di vibrioni alofili, sierologicamente correlati a *V. parahaemolyticus*, da pesci del golfo di Trieste. *Boll Ist Sierot Mil* 1971;50:403-8.
- Croci L, Serratore P, Cozzi L, Stacchini AI, Milandri S, Suffredini E, Toti L. Detection of Vibrionaceae in mussels and their sea water growing area. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:57-61.
- Cliver DO. Virus transmission via foods. *Food Technol* 1988; 241-8.
- Iverson WD, Gill M, Bartlett CLR, Cubitt WD, Mc Swigga DA. Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus; evidence of prolonged infectivity in a food handler. *Lancet* 1987;8558:556-8.
- Melnick JL, Gerba CP. The ecology of enteroviruses in natural waters. *CRC Crit Rev Environ Control* 1980;10:65.
- Sobsey MD, Dean CH, Kunckles ME, Wagner RA. Interaction on survival of enteric viruses in soil material. *Appl Environ Microbiol* 1980;40:92-101.
- Douglas AW, Hackeney CR, Carrick RJ, Lovelace G, Sobsey MD. Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J Food Prot* 1983;46:493-6.
- Di Girolamo R, Liston J, Matches JR. Survival of virus in chilled, frozen and processed oyster. *Appl Microbiol* 1970;20:58-63.
- Millard J, Appleton H, Parry JV. Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. *Epidemiol Infect* 1987;98:397-414.

34. Croci L, Ciccozzi M, De Medici D, Di Pasquale S, Fiore A, Mele A, Toti L. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J Appl Microbiol* 1999;87:884-8.
35. Koff RS, Sear HS. Internal temperature of steamed clams. *N Engl J Med* 1967;276:737-9.
36. Sobsey MD, Davis AL, Rullman VA. Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated Easter oysters. *Proc Oceans* 1987;5:1740-5.
37. Croci L, De Medici D, Gabrieli R, Franco E, Di Pasquale S, Toti L. Effectiveness of water disinfection treatment on depuration of shellfish. *Microb Alim Nutr* 1992;10:229-32.
38. Franco E, Toti L, Gabrieli R, Croci L, De Medici D, Panà A. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* experimentally contaminated with hepatitis A virus. *Int J Food Microbiol* 1990; 11:321-8.
39. De Medici D, Ciccozzi M, Fiore A, Di Pasquale S, Parlato A, Ricci-Bitti P, Croci L. Closed-circuit system for the depuration of mussels experimentally contaminated with hepatitis A virus. *J Food Prot* 2001;64:887-90.
40. Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *E. coli*, *V. cholerae* O1 and *V. parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol* 2002; 92:460-5.

## Il rischio associato alle attività di balneazione e le difficoltà legate alla sua previsione attraverso l'uso degli indicatori di contaminazione fecale

Lucia BONADONNA

*Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - La molteplicità dei fattori propri dell'ambiente acquatico e l'associazione tra uso ricreativo delle zone adibite alla balneazione e patologie specifiche possono rendere difficile l'interpretazione dei dati ricavati dalle indagini di controllo. Pertanto, dall'esperienza acquisita nel corso degli ultimi anni sul controllo dei rischi di natura sanitaria correlati alla balneazione è emerso che l'adozione di un criterio basato esclusivamente sulla valutazione analitica della qualità delle acque può fornire informazioni incomplete per la valutazione dei rischi di esposizione. Vengono quindi di seguito esposte le difficoltà relative alla previsione del rischio attraverso l'uso dei parametri indicatori stabiliti dalle normative attualmente in vigore.

*Parole chiave:* acque di balneazione, indicatori batterici, valutazione del rischio.

**Summary** (*The risk associated to bathing activities and difficulties for its prevision through the use of bacterial indicators of faecal contamination*). - There are many elements and factors that intervene to affect the quality of the coastal areas as all and none of them, taken individually, seems fundamental in defining the characteristics and to determine in a coherent way the risk associated to its use. Despite evident successes in the protection of public health, the present approach to the regulation of bathing water quality suffers several limitations. Difficulties in risk assessment due to the use of indicators of faecal contamination as parameters stated by law are discussed.

*Key words:* bathing water, bacterial indicators, risk assessment.

### Introduzione

I rischi associati all'uso ricreativo dell'ambiente marino sono di natura e origine diversa. Gli aspetti legati ai rischi sanitari associati alla balneazione sono tuttavia il punto critico e quelli su cui comunque si basano le normative attualmente in vigore - la Direttiva Europea 76/160/CEE e il conseguente DPR 470/82, norma italiana di recepimento [1, 2].

Tuttavia, innanzitutto, bisogna considerare che, sebbene le condizioni dell'ambiente marino siano state, fino ad alcuni anni orsono, principalmente valutate dal punto di vista medico-igienistico, ormai viene riconosciuta l'importanza che assumono i fattori ambientali nel condizionarne la qualità.

Infatti, in un ambito più globale di controllo dei requisiti igienico-sanitari bisogna considerare che gli elementi che intervengono a influenzare la qualità delle acque marine possono essere numerosi e nessuno, singolarmente, risulta determinante per definirne le caratteristiche [3].

Infatti, tutti quei parametri che sono funzione della pressione antropica, derivanti dall'uso del territorio, possono assumere una forte rilevanza.

Quindi l'urbanizzazione, la presenza di fonti potenziali di contaminazione legata ad attività industriali, agricole e zootecniche, l'immissione nei corpi idrici recettori e in mare di fonti puntiformi di contaminazione (fiumi, torrenti e scarichi diretti) e non puntiformi, nonché la presenza di impianti di trattamento delle acque reflue e il grado e la tipologia di trattamento che esse subiscono, ma anche la configurazione fisica dell'area, il clima, le caratteristiche idro-geologiche e meteo-marine (livelli di marea, direzione dei venti e delle correnti, moto ondoso), gli eventi meteorologici e tutti quegli elementi biotici e abiotici che caratterizzano un ecosistema concorrono a determinare la qualità delle acque [4].

La conoscenza di tutti i diversi fattori, caratteristiche e specificità del territorio capaci di avere effetto sulla qualità dell'ambiente e di concorrere alla variabilità delle condizioni ambientali, può permettere di pro-

muovere il miglioramento progressivo della qualità ambientale per predisporre le più appropriate misure di prevenzione e tutela della salute pubblica.

### Riferimenti normativi e strumenti organizzativi

Attualmente, la normativa stabilisce [1, 2] che giudizi di idoneità alla balneazione vengano espressi in base alla conformità a valori-limite stabiliti di una serie di parametri. In particolare, per verificare la qualità igienico-sanitaria delle acque di balneazione, la normativa prevede la determinazione di parametri batterici - i batteri indicatori di contaminazione fecale - che costituirebbero un indice della potenziale presenza di microrganismi patogeni (batteri, virus, parassiti). In Tab. 1 vengono riportati i valori limite indicati nella normativa italiana relativamente ai parametri indicatori.

Il controllo degli indicatori di contaminazione fecale nelle acque è da sempre utilizzato in alternativa a quello diretto dei patogeni perché attualmente non è possibile determinare, su base routinaria, le concentrazioni di tutti i patogeni eventualmente presenti nelle acque. La principale difficoltà nella ricerca dei patogeni è legata alla scarsa disponibilità di metodi che, di routine, permettano di rilevare basse concentrazioni di patogeni in grandi volumi di acqua. Oltretutto questi metodi non sono in grado di determinare per ogni singolo patogeno la vitalità o la virulenza. Quindi il monitoraggio della qualità sanitaria delle acque di balneazione è stato tradizionalmente basato sulla misura degli indicatori, che non sono di per sé causa di infezioni o malattie, ma che dovrebbero “predire” il rischio potenziale legato alla presenza, che essi segnalerebbero, di patogeni enterici. Vengono usati come indicatori i coliformi e gli streptococchi, perché più facili da isolare e da identificare e che, vivendo nel tratto gastrointestinale degli animali a sangue caldo e dell'uomo, entrano a far parte del ciclo a trasmissione fecale-orale [5].

Per potere assolvere al ruolo di indicatore di contaminazione fecale, è necessario che i gruppi di organismi o le specie prescelte rispondano a determinati requisiti, primo fra tutti quello di presentare una correlazione dotata di significato statistico con agenti eziologici specifici di malattie, i patogeni. Inoltre, l'indicatore deve:

- essere presente esclusivamente là dove è presente il patogeno;
- essere presente con densità almeno uguali, o meglio maggiori, rispetto al patogeno stesso;
- rispondere in ugual misura, rispetto al patogeno, alle condizioni ambientali e agli eventuali trattamenti di disinfezione e sopravvivere almeno tanto a lungo quanto il patogeno;
- essere caratterizzato da incapacità di replicazione nell'ambiente;
- essere facilmente rilevabile con metodologie pratiche, ripetibili, economiche e specificatamente selettive.

Tuttavia gli indicatori forniscono soltanto una misura approssimativa 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 fattori diversi, condurrebbero a conclusioni in merito meno attendibili. Infatti, la presenza dei patogeni nelle acque dipende dalla diffusione e prevalenza delle diverse patologie all'interno della comunità; in più, specialmente, in acque di balneazione, il rapporto tra indicatori e patogeni è fortemente alterato dalle condizioni locali e viene influenzato da:

- clima: elevata insolazione e quindi alti livelli di radiazione ultravioletta contribuiscono a ridurre selettivamente i microrganismi più sensibili;
- temperatura: la temperatura dell'acqua influenza la sopravvivenza dei microrganismi che vivono più a lungo in acque più fredde;
- torbidità: la presenza di particolato sospeso nelle acque favorisce la sopravvivenza dei microrganismi, agendo come fonte di nutrimento ed espletando azione protettiva;
- fonte della contaminazione: il rapporto indicatori/patogeni è influenzato dal tipo di fonte di contaminazione, considerando anche che i trattamenti a cui vengono sottoposte le acque alterano il rapporto in base alla diversa sensibilità dei microrganismi;
- vicinanza della fonte di contaminazione rispetto all'area di balneazione.

Per dare un'idea dell'importanza di questo fattore, si può fare riferimento alle concentrazioni di microrganismi presenti nei reflui civili che, per quanto riguarda gli indicatori di contaminazione fecale, sono dell'ordine di decine o centinaia di milioni per ogni 100 ml di acqua.

Nel caso in cui i reflui non vengano sottoposti a depurazione, i liquami fognari, qualora vengano rilasciati in mare, determinano zone a concentrazione elevata di inquinanti che si concentrano in aree a scarso ricambio. Tuttavia bisogna anche considerare che i liquami, una volta sversati in mare sono sottoposti ad una serie di processi.

**Tabella 1.** - Requisiti di qualità delle acque di balneazione (DPR n. 470/82). Parametri indicatori [2]

Parametri	Valore limite
Coliformi totali/100 ml	2000
Coliformi fecali/100 ml	100
Streptococchi fecali/100 ml	100

Il primo è quello della dispersione, legato al diffondersi del carico inquinante nell'ambiente marino, che può comportare, ad una distanza variabile dal punto di scarico, una diluizione tale da non consentire più di rilevare sperimentalmente la presenza degli inquinanti.

Questo fenomeno che si potrebbe semplicisticamente ritenere risolutivo del problema trova, nella realtà, limiti molto seri in due ordini di eventi:

- la presenza di apporti massivi di inquinanti può portare a grandi distanze il limite al di là del quale si arriva ad un rapporto infinito di diluizione;

- fenomeni di scarsa miscibilità dell'effluente rispetto al corpo recettore (dovuti a differenze di salinità, di temperatura, ecc.) e particolari movimenti meteomarinari possono determinare la mancata dispersione del carico inquinante e, di conseguenza, il trasporto a distanza di inquinanti non diluiti, ben al di là delle previsioni teoriche.

Oltre alla dispersione, nell'ambiente marino, i microrganismi vanno anche incontro ad un processo di epurazione. L'autoepurazione nell'ambiente marino è riferibile a:

- fenomeni di adsorbimento su particelle organiche o minerali in sospensione cui fa seguito la sedimentazione sul fondo;

- azione dei raggi solari;

- fattori chimici (solo in minima parte noti);

- fenomeni di antibiosi, parassitismo e batteriofagia, ecc.

Non si può negare che esista una attività epurativa del mare sui microrganismi che vi vengono scaricati; tuttavia va sottolineato che tale attività non è infinita e si può fare affidamento su di essa come elemento favorente, a patto che siano rispettate le norme di salvaguardia dell'ambiente marino, prima fra tutte quella di evitare lo sversamento indiscriminato degli inquinanti.

Sono state effettuate valutazioni sperimentali circa la capacità autoepurativa delle acque marine nei confronti dei principali microrganismi. Generalmente questa viene valutata attraverso il T90 che indica il tempo medio (in ore) necessario per ottenere una riduzione del 90% dei microrganismi in un determinato campione di acqua. Nel caso del mare Mediterraneo è stato calcolato un T90 per i batteri di circa 1 ora, mentre, è superiore alle sette ore quello per i virus enterici [6].

Considerati i valori delle concentrazioni microbiche riscontrati nei liquami e considerati i valori di T90 indicati, prescindendo da fenomeni di dispersione, nell'ambiente marino, è stato quindi calcolato che sono necessarie circa 8 ore per i batteri e circa un giorno per gli enterovirus, per ottenere nelle acque valori accettabili di microrganismi [6].

Da ciò risulta evidente che, a causa delle sue capacità di dispersione e di autoepurazione, l'ambiente marino possiede caratteristiche naturali che gli consen-

tono, con una certa rapidità, di "digerire" i carichi inquinanti (limitatamente a quelli di natura organica e perciò biodegradabili).

Relativamente agli indicatori, inoltre, è da considerare che i più recenti dati epidemiologici hanno alimentato dubbi sulla validità degli indicatori batterici come indice accurato di presenza e densità di patogeni, dubbi legati ai fenomeni di cui sopra e alle evidenze relative allo sviluppo di fenomeni che possono provocare un aumento della densità di microrganismi ambientali autoctoni la cui crescita e moltiplicazione è favorita da sostanze e macronutrienti riversati nei corpi idrici attraverso gli scarichi trattati e non. È noto che, nelle acque di balneazione, l'aumento della concentrazione della componente microbica autoctona, di cui fanno parte anche patogeni primari e potenziali, può aumentare di fatto il rischio per la salute dei bagnanti [7].

### Valutazione critica

Sulla base delle evidenze attualmente disponibili, è difficile tentare sia di quantificare il rischio effettivo derivato dall'immersione in acque contaminate, così definite sulla base della misura dei classici indicatori, sia, d'altra parte, di correlare questo rischio a specifici livelli di contaminazione calcolati sulla base di un maggior numero di indicatori. Dal punto di vista qualitativo, tuttavia, l'evidenza indica chiaramente che il rischio esiste ed è più pronunciato in aree direttamente esposte a contaminazione da scarichi non trattati.

Poiché i microrganismi attualmente utilizzati come indicatori di contaminazione fecale indicano solo la potenziale presenza dei patogeni, si correlano poco con il rischio reale che un bagnante corre immergendosi in acque contaminate, rischio comunque legato anche alle condizioni di predisposizione dell'ospite, e perciò individuale, e naturalmente alla patogenicità del microrganismo. La previsione del rischio diventa ancora più complessa se si prendono in considerazione quei microrganismi che non seguono una diffusione legata ad una specifica contaminazione fecale. Infatti, va ricordato che, essendo gli indicatori, batteri di origine enterica, non sono in grado di segnalare la presenza di microrganismi a diffusione diversa da quella fecale-orale, che si trasmettono, per esempio, per inalazione o per contatto e comunque non sono in grado di mettere in evidenza il rischio legato alla presenza di microrganismi più resistenti alle condizioni ostili del mezzo ed ai trattamenti di depurazione dei reflui, come i virus, i parassiti e le loro forme di resistenza (cisti, uova, ecc.).

Gli studi epidemiologici svolti per verificare l'accertamento del rischio correlato alla balneazione sono numerosi, ma anche contraddittori e non univoci [8].

In questo tipo di valutazioni è da notare che diversi sono i fattori da prendere in considerazione: durata del

bagno, modalità di immersione, capacità natatorie, distanza dalla riva, oltre che le condizioni individuali dei soggetti indagati, l'età e il sesso.

Nei paesi nordici, il bagno in mare si svolge in genere rapidamente, a differenza ad esempio delle immersioni prolungate e ripetute che vengono effettuate nei nostri mari. In più, un'immersione in mare nuotando con la testa sott'acqua può comportare rischi diversi da quelli che si corrono tenendo la testa fuori dall'acqua.

Da gran parte degli studi svolti risulta evidente anche che esiste una correlazione tra balneazione e comparsa di sindromi minori che possono interessare l'apparato genito-urinario e respiratorio, la cute, le mucose dell'orecchio e dell'occhio [8]. Tuttavia, ancora la maggior parte degli studi epidemiologici tendenti a mettere in evidenza una eventuale correlazione tra qualità igienica delle acque di balneazione e patologie nelle popolazioni esposte sono stati finalizzati al rilevamento di infezioni a carattere gastroenterico, ritenute più facilmente rilevabili e quantificabili da parte delle strutture sanitarie [9].

A questo tipo di impostazione va mosso tuttavia un rilievo.

La possibilità dell'insorgenza di una patologia gastroenterica conseguente alla balneazione è ragionevolmente da attendersi solo in presenza di livelli di inquinamento microbico sensibilmente elevati in quanto il quantitativo di acqua, soprattutto marina, che può essere ingerito durante le immersioni è relativamente modesto: fino a un massimo di 100-200 ml. Inoltre, le occasioni di infezione dell'apparato gastroenterico legate a fattori non balneari (soprattutto le tossinfezioni alimentari) sono così frequenti nel periodo estivo che certamente non è facile rilevare la frazione di disturbi gastro-enterici correlabili con la sola balneazione [10].

Sulla base della esperienza medica la patologia certamente più rilevante correlabile con la balneazione in acque contaminate sembra doversi individuare nelle affezioni dermatologiche e delle mucose esposte (dermatosi batteriche, micotiche, virali, vulvo-vaginiti, congiuntiviti, infezioni del condotto uditivo, ecc.) [11].

Risulta inoltre evidente che la fascia di popolazione più esposta a questi tipi di lesioni cutanee e mucose è quella infantile per un doppio ordine di motivi, di tipo comportamentale (lunghe e/o ripetute immersioni in acqua) e di tipo biologico (livello non ancora completo delle difese immunitarie e di quelle del manto cutaneo e mucoso).

E' anche evidente che, nel meccanismo patogenetico alla base dell'insorgenza di lesioni cutanee e delle mucose esposte, oltre alla significativa presenza degli agenti patogeni causali delle malattie (batteri, miceti, virus) giocano un ruolo fondamentale anche altri fattori inquinanti presenti nelle acque costiere conta-

minate (tensioattivi, idrocarburi, ecc.) che possono avere un ruolo almeno favorente nell'insorgenza delle patologie cui si è fatto cenno (attraverso, ad esempio, una modifica della permeabilità cutanea).

L'azione patogena degli inquinanti può inoltre essere favorita dall'azione irritante dei raggi solari, dal contenuto salino dell'acqua di mare, nonché dall'uso di prodotti cosmetici (creme "protettive", abbronzanti, ecc.).

Tutto quanto finora esposto offre un quadro certamente complesso della situazione che non consente, al momento, di pervenire ad una quantificazione del rischio da balneazione e da soggiorno marino in generale.

Relativamente ai criteri attuali di controllo delle acque di balneazione, fermo restando le osservazioni sopra discusse, è opportuno anche considerare che negli ultimi anni sono emerse alcune evidenti limitazioni di questo tipo di valutazione: la determinazione della qualità delle acque è di carattere retrospettivo, sia perché l'idoneità o meno alla balneazione di una determinata zona deriva dai risultati dei controlli effettuati nell'anno precedente, sia perché le risposte degli esami analitici svolti per la ricerca degli indicatori di contaminazione si ottengono comunque solo dopo l'eventuale avvenuta esposizione al pericolo. Inoltre, il controllo della qualità delle acque viene attualmente effettuato solamente per verificare se esiste rispondenza ai risultati delle analisi con i valori parametrici fissati dalla normativa. Inoltre, come riconosciuto dalla comunità scientifica, i parametri indicati nelle normative in vigore, sembrerebbero poco significativi per la valutazione della qualità di acque adibite alla balneazione e i metodi analitici, spesso diversi da Paese a Paese, non permettono di ottenere risultati comparabili [12].

Un sistema di valutazione del rischio, preliminare essenziale nello sviluppo di politiche di controllo, gestione e pianificazione sanitaria, basato su questi elementi può risultare quindi non appropriato nell'ambito della previsione del rischio e dei programmi di informazione e segnalazione al pubblico, anche se alla interpretazione dei dati analitici si affiancano indagini epidemiologiche e di sorveglianza sanitaria. Se è pur vero che le più recenti indagini epidemiologiche hanno confermato come ad un aumento delle conte microbiche degli indicatori batterici sia correlato un aumento del rischio per la salute dei bagnanti, tuttavia l'associazione tra patologie e balneazione costituisce un argomento di studio estremamente difficile [13].

Gli studi più recenti hanno individuato negli enterococchi, microrganismi di più specifica origine intestinale rispetto agli streptococchi fecali, parametro attualmente utilizzato nella normativa, gli indicatori batterici che meglio sembrano correlati con la manifestazione di patologie acquisite durante il nuoto [14]. D'altra parte,

l'evoluzione delle conoscenze scientifiche ha messo in dubbio la rappresentatività, come indice di contaminazione, dei coliformi totali [15]. Infatti, questi microrganismi, attualmente inseriti tra i parametri sanitari da ricercare per valutare la qualità delle acque di balneazione, come è stato da qualche tempo riconosciuto, sono largamente distribuiti nell'ambiente, caratteristica che toglie valore alla loro funzione di indicatori di contaminazione. Nello stesso ambito, è stato rivalutato il ruolo della specie *Escherichia coli* che sembra possa rappresentare un indice di contaminazione fecale più significativo e accurato rispetto ai microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi fecali, parametro attualmente ricercato per stabilire l'idoneità delle acque di balneazione. Infatti, se nel gruppo dei coliformi fecali sono comprese specie che possono anche non essere abituali ospiti dell'intestino, *E. coli* è invece una specie tassonomicamente ben 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 [16].

Dall'esperienza acquisita nel corso degli ultimi anni sul controllo dei rischi di natura sanitaria correlati alla balneazione è emerso che l'adozione di un criterio basato esclusivamente sulla valutazione analitica della qualità delle acque può fornire informazioni incomplete per la valutazione dei rischi di esposizione. Inoltre, la molteplicità dei fattori propri dell'ambiente acquatico e l'associazione tra uso ricreativo delle zone adibite alla balneazione e patologie specifiche possono rendere difficile l'interpretazione dei dati ricavati dalle indagini di controllo [15].

La complessità dei sistemi ambientali è, infatti, tale che difficilmente esiste una correlazione univoca tra fenomeno che si vuole osservare e variabile che si controlla. In particolare, i traccianti microbiologici, utilizzati come indicatori teorici di rischio, sono soggetti ad oscillazioni rapide nel tempo, legate alla loro scarsa capacità di sopravvivenza nelle acque e a un'ampia serie di fattori chimico-fisici e biologici, caratteristica che comporta che l'esposizione individuale al potenziale rischio di infezione possa essere molto limitata nel tempo e, per questo motivo, poco prevedibile [17].

Da queste osservazioni, e coerente con le nuove conoscenze tecnico-scientifiche, negli ultimi anni, è andata quindi maturando una filosofia olistica che, basandosi su principi di programmazione e gestione integrata delle risorse, ha permesso di elaborare nuovi criteri di controllo e valutazione dei rischi per la salute che, basati sull'acquisizione della conoscenza di tutti i fattori che possono influenzare le condizioni ambientali, impongono ormai la revisione della normativa sulle acque di balneazione. Su questa linea è stata formulata la Direttiva Quadro sulle Acque che rappresenta senza

dubbio un passaggio decisivo nell'unificazione di tutte le normative ambientali europee in materia. Tuttavia, se i criteri stabiliti nella Direttiva Quadro sulle Acque permettono di valutare la qualità ambientale/ecologica in base a specifici standard, i principi per il controllo delle acque di balneazione devono, mantenendo una identità separata, costituire l'elemento trainante per la tutela ambientale ai fini della salute pubblica, e, contemporaneamente, contribuire alla integrazione delle politiche in materia ambientale per l'attuazione mirata della Direttiva Quadro sulle Acque.

Il nuovo approccio, integrando le informazioni fornite dalle determinazioni analitiche con la valutazione ed interpretazione di nuovi elementi e di caratteristiche territoriali, può offrire la possibilità di effettuare una coerente previsione del rischio per la salute e, come conseguenza, l'elaborazione e la pianificazione di programmi di tutela e/o risanamento delle aree critiche.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Council of the European Communities 1976. Directive of the 8th of December 1976 concerning the quality of bathing waters (76/160/EEC). *Off J Eur Commun* 19, L31/1-7.
2. Decreto del Presidente della Repubblica 8 giugno 1982, n. 470. Attuazione della Direttiva (CEE) 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione. *GU* no. 203 del 26 luglio 1982.
3. Bonadonna L, Conte G, Dal Cero C. L'incertezza nelle procedure di controllo ambientale: il caso delle analisi delle acque di balneazione. *Inquinamento* 1994;11:60-3.
4. Bonadonna L, Bucci M, di Girolamo I, Dottarelli P, Fabiani C, Gramaccioni L, Iozzelli M, Mazzoni M, Melly A, Oleari F, Rosini R, Sarti N, Scalera G, Vescovi U, Zapponi GA. *Le pressioni ambientali e la balneazione. Un caso studio: la Toscana. Rapporto sulla qualità delle acque di balneazione*. Roma: Ministero della Sanità; 2000.
5. Cabelli VJ, Dufour AP, Levin MA, McCabe LJ, Haberman RW. Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. *Am J Public Health* 1979; 69(7):690-6.
6. Brisou J-F, Denis FA. *Hygiène de l'environnement maritime*. Masson: Paris; 1978.
7. Bonadonna L, Briancesco R, Casiere AR, Coccia AM, Della Libera S, Scenati R, Semproni M. Studio della variabilità stagionale di microrganismi ambientali di interesse sanitario in aree costiere dell'Adriatico e valutazione del rischio per l'uomo. In: *Alcuni studi su problematiche sanitarie per la salvaguardia del Mare Adriatico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1999. (Rapporti ISTISAN, 99/34).
8. Kueh CSW, Tam TY, Lee T. Epidemiological study of swimming-associated illnesses relating to bathing-beach water quality. *Water Sci Technol* 1995;31:1-4.
9. La Torre G. *Studi epidemiologici sugli effetti sulla salute umana delle acque di balneazione: revisione della letteratura inter-*

- nazionale. Roma: Ministero della Sanità, Commissione Balneazione; 12 aprile 2000.
10. Pruss A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *Int J Epidemiol* 1998; 27(1):1-9.
  11. Fleisher JM, Kay D, Salmon RL, Jones F, Wyer MD Godfree AF. Marine waters contaminated with domestic sewage: nonenteric illnesses associated with bather exposure in the United Kingdom. *Am J Publ Health* 1996;86:1228-34.
  12. Bird ECF. *Beach management*. Chichester: John Wiley and Sons; 1996.
  13. Kay D, Jones F, Fleisher J, Wyer M, Salmon RL, Lightfoot N, Godfree A, Pike E, Figueras MJ, Masterson B. *Relevance of faecal streptococci as indicator of pollution. Report to DG XI of the Commission of the European Communities*. Leeds, University of Leeds: Centre for Research into Environmental Health; 1996.
  14. Kay D, Fleisher J, Wyer MD, Salmon RL. *Re-analysis of the seabathing data from the UK randomised trials*. A report to DETR. Aberystwyth, University of Wales: Centre for Research into Environment and Health; 2001.
  15. World Health Organization. *Guidelines for safe recreational-water environments: coastal and freshwaters*. Geneva: WHO; 1998. (Consultation draft).
  16. Bartram J, Rees G (Ed.). *Monitoring bathing waters*. London and New York: Taylor and Francis Publisher; 2000.
  17. Cheung WHS, Chang KCK, Hung RPS. Variations in microbial indicator densities in beach waters and health-related assessment of bathing water quality. *Epidemiol Infect* 1991;106:329-44.

## Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine

Paola ADE (a), Enzo FUNARI (a) e Roberto POLETTI (b)

(a) *Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro di Ricerche Marine, Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, Cesenatico (FO)*

**Riassunto.** - Delle circa 5000 specie algali identificate, all'incirca 75 producono tossine. Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle dinoflagellate e quindi a quelli delle diatomee. Le intossicazioni dell'uomo finora accertate sono state associate al consumo di molluschi bivalvi. Le principali sindromi da intossicazione sono state descritte, in base alla tipologia dei sintomi, come paralitiche, diarrotiche, neurotossiche ed amnesiche, rispettivamente abbreviate in: PSP (*paralytic shellfish poisoning*), DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*), ASP (*amnesic shellfish poisoning*). Questo lavoro costituisce una rassegna del problema sanitario rappresentato dalle alghe tossiche marine, con particolare riferimento alla situazione del Mediterraneo e delle coste italiane.

*Parole chiave:* alghe tossiche marine, tossine algali.

**Summary** (*Risk to human health associated with marine toxic algae*). - Among the about 5000 of marine algal species, some 75 produce algal toxins. These latter mainly belong to the taxa first of dinoflagellates and then diatoms. The so far known human intoxications have been associated with mollusc consumption. The main poisoning syndromes have been termed, on the basis of the observed symptoms, as paralytic, diarrhetic, neurotoxic and amnesic and shortened as: PSP (paralytic shellfish poisoning), DSP (diarrhetic shellfish poisoning), NSP (neurotoxic shellfish poisoning), ASP (amnesic shellfish poisoning), respectively. This paper is a review of the problem of human health implications associated with marine toxic algae, with particular reference to the situation of the Mediterranean and the Italian coastal areas.

*Key words:* marine toxic algae, algal toxins.

### Introduzione

Nelle zone marine costiere, la presenza di organismi fitoplanctonici tossici rappresenta uno dei principali rischi per la salute umana. Alcuni di questi organismi producono tossine molto potenti che possono raggiungere concentrazioni particolarmente elevate in occasione di fioriture.

Attualmente il problema delle alghe tossiche marine a livello mondiale sembra assumere dimensioni preoccupanti sia per l'aumentare del numero delle specie riconosciute come dannose sia per l'aumento dei fenomeni di fioritura algale e. Tale aumento sembra essere dovuto da un lato all'eutrofizzazione delle aree costiere e dall'altro alla progressiva diffusione di specie tossiche in nuove aree geografiche attraverso, ad esempio, l'acqua di zavorra trasportata dalle navi da carico.

Per dar luogo ai cambiamenti di colore dell'acqua, la proliferazione dei microrganismi deve essere notevole. Le dinoflagellate conferiscono colore

all'acqua con un numero di microrganismi non inferiore a un milione di cellule per l; queste alghe, in condizioni particolarmente favorevoli, possono raggiungere densità di 60-70 milioni di cellule per l [1].

Vengono definiti come "harmful algal bloom" i fenomeni associati alla presenza di alghe tossiche e/o dannose [2, 3]. Questa definizione si applica non solo alle alghe microscopiche ma anche alle macroalghe bentoniche e planctoniche, che possono proliferare in condizioni di elevate concentrazioni di nutrienti, producendo danni ecologici dovuti all'allontanamento di specie autoctone, alle alterazioni dell'habitat e alle condizioni di ipossia dei fondali.

Le fioriture algali in mare sono note fin dall'antichità, ma negli ultimi decenni sono notevolmente aumentate [4-6]. In alcune aree, come ad esempio il Mar Baltico, il Mare del Nord, il Mare Adriatico, lungo le coste giapponesi e nel Golfo del Messico, sono diventate un fenomeno ricorrente. In Italia, fenomeni di proliferazione algale si verificano con una certa frequenza dal 1975 nella zona costiera a sud della foce

del Po [7]. I primi eventi significativi si verificarono nel 1975 e 1976 e causarono un'elevata mortalità di fauna bentonica e di pesci [8]. Da allora, fioriture algali di maggiore o minore entità si sono verificate ogni anno, interessando progressivamente altre zone costiere. L'evento più significativo fu quello del 1984, quando si verificarono imponenti fioriture di *Gymnodinium* sp., con valori di clorofilla fino a 800 mg/m<sup>3</sup> in corrispondenza della foce del Po e fino a 200 mg/m<sup>3</sup> nelle vicinanze di Ancona [1].

Allontanandosi dalla costa emiliano-romagnola, il fenomeno diminuisce di entità, ma è stato segnalato a volte sulla costa marchigiana [9] e nel golfo di Trieste [10, 11] dove nel 1976 e 1977 la balneazione fu vietata per alcune settimane.

Negli estuari, il verificarsi di fioriture di alghe marine dipende dalla quantità di nutrienti e di sostanze umiche trasportate con le acque dei fiumi. Condizioni particolarmente favorevoli si verificano soprattutto a seguito di forti piogge.

Le fioriture algali sono favorite dal fenomeno dell'*upwelling*, che consiste nel verificarsi di correnti ascensionali di masse d'acqua, ricche di nutrienti. Quest'ultimo fenomeno è la causa principale delle "acque colorate" nell'India del sud, nel sud-ovest dell'Africa, nell'est dell'Australia, sulle coste dell'Arabia, Perù, Cile e California.

Organismi alieni, e tra questi le alghe tossiche marine, possono essere trasportati con le acque di zavorra delle navi da carico da un'area geografica ad un'altra anche molto distante, che può quindi essere colonizzata. Questo problema è da tempo al centro dell'attenzione della comunità scientifica internazionale [12].

Si ritiene che l'antropizzazione delle aree costiere ed in particolare il progressivo aumento dell'immissione nell'ambiente marino di effluenti urbani, industriali, agricoli e zootecnici abbiano favorito lo sviluppo di alghe tossiche marine [13].

Sono circa 5000 le specie algali identificate, delle quali circa 75 sono quelle che producono tossine [14]. Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle diatomee e delle dinoflagellate. Gli altri taxa sono molto meno rappresentati, sia quantitativamente che qualitativamente, e la loro presenza è legata a condizioni particolari; così, ad esempio, le silicoflagellate si osservano nei mesi più freddi, le coccolitoforidee sono per lo più pelagiche, le cloroficee e le euglenoficee prediligono condizioni estuariali.

Le fioriture di alghe tossiche, a seconda degli effetti da esse prodotti, possono essere classificate in [14]:

- fioriture di specie che provocano soltanto una colorazione dell'acqua con diminuzione della visibilità e della qualità estetica, ed eventualmente morie di pesci e invertebrati acquatici a causa delle conseguenti condizioni di ipossia. Appartengono a questo gruppo

soprattutto specie di dinoflagellati (ad es., *Noctiluca scintillans*) e di diatomee (ad es., *Skeletonema costatum*);

- fioriture di specie che producono potenti tossine che si accumulano nella catena alimentare e che possono causare effetti vari nei consumatori secondari (uomo e animali superiori). Si tratta per lo più di dinoflagellate appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Dinophysis* e di diatomee del genere *Nitzschia*;

- fioriture di specie che, nella maggior parte dei casi, non sono tossiche per l'uomo ma risultano dannose in vario modo per pesci ed invertebrati. Esempi di queste specie sono: *Alexandrium tamarense*, *Gyrodinium aureolum*, *Chaetoceros convolutus*, *Nodularia spumigena*, *Chattonella antiqua*;

- fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa (ad es., *Gymnodinium breve*).

### Le tossine algali

Le tossine prodotte dai dinoflagellati sono, nell'ambito delle tossine di natura non proteica, tra le più potenti sino ad oggi conosciute. Non è ancora chiaro il possibile ruolo di queste molecole nel metabolismo delle alghe, ma si ipotizza un loro intervento nel mantenimento dell'equilibrio fisiologico dell'organismo: alcune tossine sono importanti nella sintesi di acidi nucleici, altre nella sintesi della parete cellulare.

A seconda della loro solubilità, le tossine possono essere divise in tossine idrosolubili (tra cui la saxitossina e i suoi derivati) e liposolubili (come le brevetossine e le tossine del tipo DSP).

L'uomo può essere esposto a queste tossine attraverso il consumo di organismi ittici, che le accumulano, e lo svolgimento di attività ricreative.

Mentre non sono noti casi di intossicazione umana riconducibili allo svolgimento di attività ricreative in acque marine interessate da fioriture algali, importanti intossicazioni umane si verificano a seguito dell'ingestione di molluschi bivalvi. Questi ultimi sono organismi filtratori che si nutrono di plancton e che, pur accumulando le tossine, ne subiscono gli effetti solo marginalmente. Tuttavia, in un singolo mollusco, in determinate circostanze possono essere raggiunte concentrazioni tali da risultare letali per l'uomo [2]. I molluschi bivalvi maggiormente interessati da questo tipo di intossicazione appartengono ai generi *Argopecten*, *Cardium*, *Mya*, *Mytilus*, *Pecten*, *Saxidomus* e *Spisula*. Le ostriche accumulano le tossine algali, ma nella gran parte dei casi in misura minore rispetto ai generi appena elencati [15].

Nei paesi industrializzati, i programmi di controllo degli allevamenti di molluschi permettono un sostanziale contenimento di questo rischio, vietando la com-

mercificazione di questi organismi quando vengono raggiunte concentrazioni inaccettabili di tossine nei tessuti dei molluschi.

Per quanto riguarda l'Italia il DL.vo 30 dicembre 1992 n. 530 recepisce la Direttiva Comunitaria 91/492/CEE del 15 luglio 1991 che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi. Nella direttiva comunitaria si considerano esplicitamente le biotossine PSP e DSP.

Negli altri paesi, i danni alla salute provocati dalle tossine algali sono invece frequenti, soprattutto nelle aree dove le popolazioni ricavano dalle risorse marine gran parte dei prodotti per l'alimentazione.

Le tossine algali marine possono anche provocare morie di pesci sia direttamente che in seguito ad ingestione di piccoli molluschi planctonici contaminati. I pesci sono in genere molto sensibili a queste tossine e muoiono prima che vengano raggiunte nelle loro carni concentrazioni pericolose per l'uomo [2]. Tuttavia alcune tossine liposolubili, come le ciguatossine, non hanno effetti significativi sui pesci ma tendono ad accumulare lungo la catena alimentare fino a raggiungere elevate concentrazioni nei grossi pesci predatori che risultano quindi tossici per l'uomo.

Le principali sindromi da intossicazione umana associate al consumo di molluschi sono state descritte, in base alla tipologia dei sintomi, come paralitiche, diarrotiche, neurotossiche ed amnesiche, rispettivamente abbreviate in: PSP (*paralytic shellfish poisoning*), DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*), ASP (*amnesic shellfish poisoning*).

### Tossine PSP

La sindrome paralitica da molluschi bivalvi è una sindrome neurotossica che si manifesta a seguito del consumo di molluschi eduli che hanno accumulato saxitossina e/o suoi prodotti di degradazione. L'origine algale di questa intossicazione è stata dimostrata da tempo [16], rendendo tossici molluschi sani alimentandoli con *Gonyaulax catenella*. Successivamente, il ruolo del fitoplancton nel causare la PSP nell'uomo fu ulteriormente evidenziato con l'isolamento della saxitossina da *Mytilus californianus* e da *Saxidomus giganteus* [17].

#### *Specie tossiche e loro distribuzione*

Nelle acque temperate, le tossine idrosolubili del tipo PSP sono prodotte da specie algali appartenenti al genere *Alexandrium* quali *A. tamarense*, *A. catenella*, *A. acatenella*, *A. fundyense* e *A. minutum* [18]. Responsabile della produzione di PSP nei mari tropicali è invece *Pyrodinium bahamense*, var. compressa. Un'altra specie che produce tossine PSP è *Gymnodinium*

*catenatum*, che ha un'ampia distribuzione geografica, che va dalla costa atlantica e mediterranea della Spagna alla costa pacifica dell'America, al Giappone, all'Australia.

Nel Mediterraneo sono presenti specie del genere *Alexandrium* e ceppi di *G. catenatum*, che producono tossine PSP.

Nel Golfo di Trieste sono state identificate *A. fundyense*, *A. pseudogonyaulax*, *A. lusitanicum* [19]; è stata identificata anche *A. catenella* e ne è stata messa in evidenza la produzione di tossine PSP [20]. Nel 1993, in mitili provenienti dalle principali aree di allevamento della costa dell'Emilia Romagna furono rilevate goniautossine a livelli assai bassi, indicando tuttavia la presenza di alghe (non identificate in quell'occasione) produttrici di tossine PSP nel mare Adriatico [21]. Nel maggio del 1994, in occasione dell'identificazione di tossine PSP nei mitili lungo la costa dell'Emilia-Romagna, fu osservata la simultanea presenza di *A. minutum* nella stessa area [21]. Tracce di tossine PSP associate a fioriture di *A. minutum* sono state rilevate nel medio Adriatico nella baia di Kastela [22].

*A. tamarense* è stata evidenziata nel Tirreno settentrionale e in Adriatico [23, 24].

Nei golfi di Napoli e Salerno sono state identificate *A. tamarense*, *A. minutum* e *A. balechi* [25]. *Gymnodinium catenatum* è stata segnalata nel Tirreno [26], nell'Adriatico [27] e nel mare Egeo [28]. Tossine PSP associate ad *A. minutum* e *A. catenella* in Sardegna, nel maggio del 2002, hanno determinato il divieto di raccolta e di commercializzazione di mitili nel golfo di Olbia (Poletti, comunicazione personale).

Delle diverse specie di molluschi analizzate nel periodo 1989-1996 nelle stazioni di monitoraggio del Friuli Venezia Giulia, Veneto ed Emilia Romagna, le tossine PSP sono state rilevate in *Mytilus galloprovincialis* e *Tapes philippinarum* dal 1994, con percentuali di presenza non superiori all'1,1% e allo 0,4% rispettivamente [29].

#### *Chimica delle tossine PSP*

Le tossine PSP sono rappresentate dalla saxitossina e dai suoi 21 analoghi. La saxitossina fu isolata per la prima volta dal mollusco *Saxidomus giganteus*, raccolto in zone costiere dell'Alaska dove mantiene livelli di tossicità durante tutto l'anno [17].

La struttura di base delle saxitossine è una tetroidropurina con due gruppi guanidinici; uno di questi (inserito nel cerchietto), è responsabile del blocco dei canali del Na<sup>+</sup> (Fig. 1).

Le tossine carbammate sono i principali costituenti presenti nei molluschi bivalvi, mentre i composti N-sulfocarbamilici rappresentano il gruppo dominante nelle cellule dei dinoflagellati [30, 31]. In tutti i casi si tratta di composti idrosolubili, resistenti al calore, stabili in ambiente acido ma non in quello alcalino [32].

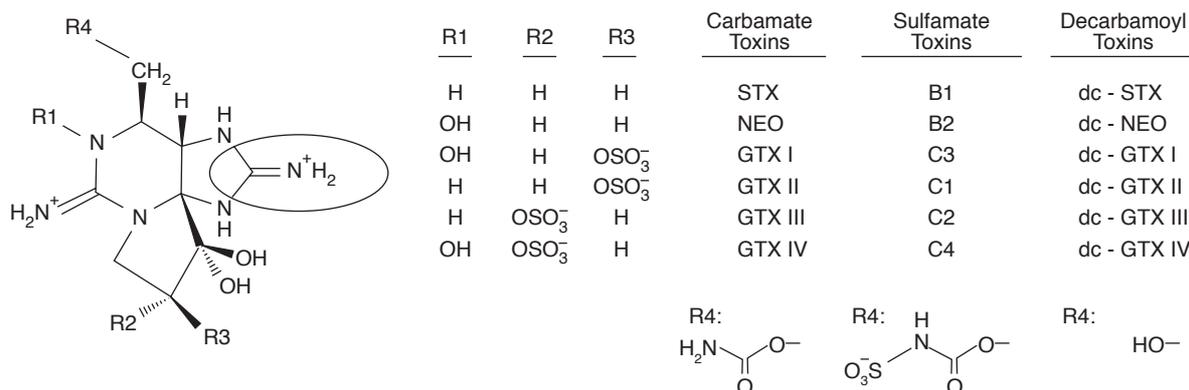


Fig. 1. - Struttura chimica delle saxitossine.

### Profilo tossicologico

Le tossine PSP agiscono sui canali del sodio, bloccando il trasporto di questi ioni attraverso la membrana. In questo modo possono bloccare la trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici, con conseguente paralisi respiratoria e morte [33]. La saxitossina è una tossina con elevatissima tossicità acuta per l'uomo, con una dose letale di 1-2 mg; i suoi effetti sono analoghi a quelli della tossina botulinica [34, 35, 30]. I primi sintomi compaiono entro 30 min dall'ingestione di molluschi contaminati e consistono in: parestesia delle labbra, lingua ed estremità delle dita, profonda astenia muscolare, incapacità a mantenere la stazione eretta, perdita dell'equilibrio [36]. Nei casi più gravi, l'evoluzione è molto rapida e la morte sopraggiunge per arresto respiratorio o cardiocircolatorio entro 2-12 ore, a seconda della quantità di tossina ingerita. La prognosi è favorevole nei casi di sopravvivenza nelle prime 12-24 ore. In circa il 50% dei pazienti che sopravvivono all'intossicazione permangono per circa tre settimane astenia e parziale perdita di memoria.

Poiché attualmente non sono disponibili antisieri efficaci contro tutte le tossine PSP, la terapia rimane essenzialmente sintomatica per combattere la paralisi respiratoria [36] e si basa sul lavaggio gastrico. Poiché la tossina è instabile in ambiente alcalino, è utile la somministrazione di bicarbonato di sodio. Nei casi più gravi, si fa ricorso all'intubazione e alla ventilazione meccanica.

### Epidemiologia

Il pericolo di intossicazione, nella maggior parte dei casi, è associato al consumo di molluschi bivalvi che filtrano acqua contenente cellule algali tossiche, accumulando tossine nei loro tessuti. Anche alcuni crostacei, come ad esempio le aragoste, possono accumulare tossine algali.

I bivalvi maggiormente responsabili di questa intossicazione nell'uomo sono *Mytilus edulis* e *Saxidomus giganteus*. Un ruolo più marginale viene svolto da specie appartenenti ai generi *Argopecten*, *Cardium*, *Mya*, *Pecten* e *Spisula*.

Le tossine PSP vengono trasferite anche a livelli più elevati della catena alimentare, ed in particolare nei pesci [37]. Il problema della intossicazione attraverso il consumo di prodotti ittici si pone se questi vengono consumati crudi e con le interiora [31]. Tuttavia, nel gennaio 2002 in Florida si sono registrate intossicazioni umane per il consumo di pesci tetrodonti contenenti soltanto tossine PSP (Poletti, comunicazione personale).

Una volta ingerite, le tossine PSP subiscono processi di trasformazione più o meno complessi che influiscono sulla loro tossicità. Ad esempio, le tossine del tipo sulfocarbammato, che rappresentano il gruppo con tossicità più bassa, vengono facilmente trasformate nelle più potenti carbammato tossine, con un aumento della tossicità fino a 40 volte. Questa trasformazione ha un risvolto clinico importante poiché molluschi con bassa tossicità possono causare intossicazioni sproporzionatamente gravi una volta ingeriti.

La maggior parte degli episodi di sindromi PSP riportati in questo secolo sono avvenuti lungo le coste orientali e occidentali del nord America e sono quasi tutti legati a "maree rosse", dovute a dinoflagellati. In Canada, dal 1973 sono stati documentati oltre 300 casi di sindromi PSP e 35 decessi [38].

Sulla costa atlantica di Portogallo, Spagna, Inghilterra, Norvegia e delle isole Faroer, sono stati riportati casi di PSP dal 1960. La presenza di tossine associate a sindrome PSP è stata rilevata ogni anno dal maggio 1968, quando 78 persone si intossicarono dopo aver consumato mitili provenienti dalla costa nordorientale dell'Inghilterra. Nel 1976 un'epidemia di PSP è stata riportata in Europa occidentale a seguito del consumo di mitili provenienti dalla costa atlantica della Spagna,

con intossicazioni in Spagna (63 casi), Francia (33), Italia (38) Svizzera (23) e Germania (19) [39].

La presenza di tossicità da PSP in mitili è stata rilevata successivamente anche lungo le coste spagnole del Mediterraneo [40, 41]. Nel 1994 una fioritura di *A. minutum* lungo le coste del Marocco provocò 64 casi di intossicazione, di cui 4 mortali [42].

Per quanto riguarda il sud America, l'intossicazione da PSP risultava rara prima del 1970. Successivamente sono state riportate diverse epidemie in Venezuela; nel 1987 fu registrata un'intossicazione in Guatemala, che richiese l'ospedalizzazione di almeno 186 persone, 26 delle quali morirono [43].

Tutti gli episodi menzionati si riferiscono al consumo di mitili. E' stato registrato tuttavia un caso di morte in Indonesia dovuto al consumo di pesci contaminati da tossine PSP, ingeriti con le interiora [31].

Durante gli ultimi due decenni, gli episodi di sindromi da tossine PSP sono aumentati in tutto il mondo, nelle zone temperate e in quelle tropicali. Non è chiaro se si tratti di un aumento reale o se sia piuttosto il risultato del miglioramento dei metodi di sorveglianza e di monitoraggio.

La mortalità varia notevolmente nei diversi continenti. Ad esempio negli episodi in America settentrionale e in Europa, che hanno coinvolto circa 200 persone, non sono stati riportati casi mortali; episodi analoghi in Asia e America meridionale hanno dato luogo invece ad un tasso di mortalità del 2-14%, probabilmente per una maggiore difficoltà di accesso alle strutture ospedaliere [44].

#### *Livelli di tolleranza e considerazioni di sicurezza per la saxitossina e suoi derivati*

La legislazione italiana ha recepito le indicazioni europee che prevedono un limite di tolleranza per le tossine PSP nei molluschi bivalvi di 800 µg/kg. Questo valore è basato sulle valutazioni della WHO [30], che si riferiscono in particolare all'episodio epidemico del 1976 in Europa, dovuto al consumo di mitili della costa atlantica della Spagna. In quell'occasione, in Italia, i più bassi livelli che diedero luogo ad intossicazioni furono di 566 µg di tossine PSP in 100 mg di tessuto edibile [45].

#### **Tossine DSP**

La sindrome diarroica da molluschi bivalvi (DSP) è una definizione proposta per una intossicazione nettamente diversa da quella PSP sia per sintomatologia che per eziologia [46]. Si manifesta dopo il consumo di molluschi che hanno accumulato tossine da diverse specie di dinoflagellati. Pur non essendo letale, rappresenta un importante problema sanitario.

La natura tossico-algale di questa sindrome è stata riconosciuta dopo numerosi casi diarroici a elevata morbosità che si sono verificati in Giappone alla fine degli anni settanta [47].

#### *Specie tossiche e loro distribuzione*

Le tossine che causano sindrome DSP sono prodotte da dinoflagellati marini appartenenti ai generi *Dinophysis* e *Prorocentrum*. *D. fortii* è stata identificata come alga produttrice di DSP in Giappone, mentre *P. lima* e varie altre specie di *Dinophysis* sono state associate ad intossicazioni lungo le coste atlantiche dell'Europa, in Olanda e Scandinavia.

Varie specie dei generi *Dinophysis* e *Prorocentrum* sono presenti anche nel Mediterraneo e nei mari italiani, dove non formano mai maree rosse. Alcune specie di *Dinophysis* fanno da sempre parte del fitoplancton dell'Adriatico [48], dove l'intossicazione da DSP avvenuta nel 1989 fu associata alla presenza di *D. fortii*, *D. tripos* e *D. caudata* [49]. Nel fitoplancton dell'Adriatico settentrionale e centrale sono state identificate anche *D. rotundata*, *D. acuta* e *D. diegensis* [49-51]. Complessivamente, in Adriatico sono state finora identificate 55 specie di *Dinophysis* [52]. La produzione di tossine DSP è stata tuttavia finora dimostrata soltanto per: *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. rotundata* e *D. tripos* [53] e *D. sacculus* [54].

Le *Dinophysis* sono responsabili della produzione di tossine del gruppo dell'acido okadaico [55] e la *D. fortii* anche di una pectenotossina (PTX2) [56].

#### *Chimica delle tossine DSP*

Le DSP sono polieterei ciclici, composti liposolubili, divisi nelle tre seguenti classi strutturali, completamente diverse per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e alterazioni biochimiche (Fig. 2):

- *tossine acide*: acido okadaico e suoi derivati (OAs);
- *tossine neutre*: pectenotossine (PTXs);
- *yessotossina* e suoi derivati (YTXs).

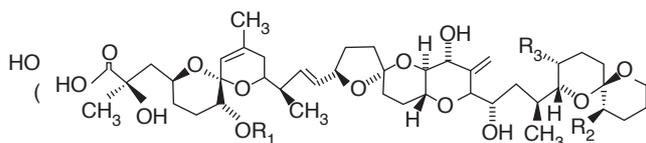
#### *Profilo tossicologico delle tossine DSP*

*Tossine acide*. - Sono state riportate le seguenti dosi (mg/kg) che provocano mortalità nei topi per i.p. [57]:

OA	0,20
DTX1	0,16
DTX2	0,20 (stimata)
DTX3	0,25
7-O-acylDTX2	0,25 (stimata)

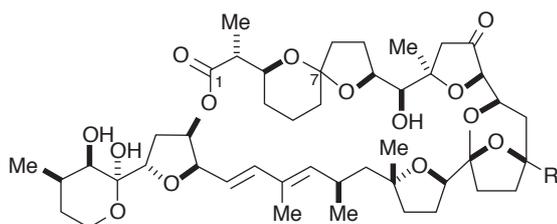
L'acido okadaico e i suoi derivati (OAs), essendo liposolubili, possono attraversare facilmente la membrana cellulare [58]. OA, DTX1 e DTX2 inibiscono

## Tossine acide (Acido okadaico e derivati)

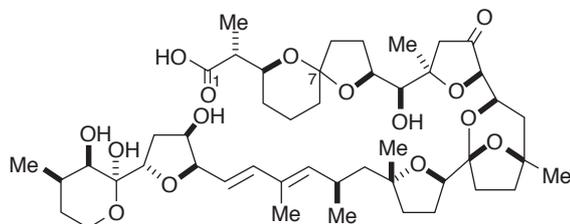


	R1	R2	R3
AO	H	H	CH <sub>3</sub>
DTX1	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
DTX2	H	H	CH <sub>3</sub>
DTX3	acyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
7-O-acylOA	acyl	CH <sub>3</sub>	H
7-O-acylDTX2	acyl	H	CH <sub>3</sub>

## Tossine neutre (Pectenotossine PTXs)



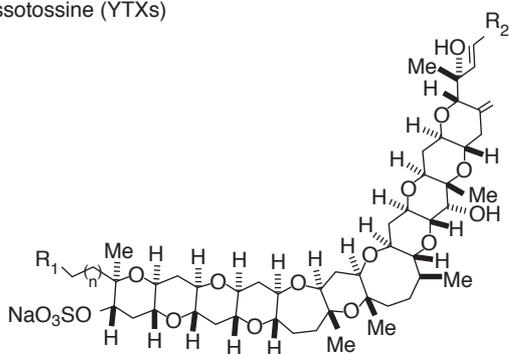
R	C-7	
PTX1: CH <sub>2</sub> OH	R	macrolide
PTX2(1): CH <sub>3</sub>	R	
PTX3: CHO	R	
PTX4: CH <sub>2</sub> OH	S	
PTX6: COOH	R	
PTX7: COOH	S	



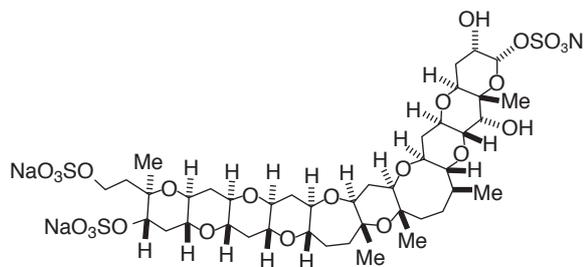
C-7	
PTX2SA (2): R	seco acid
7- <i>epi</i> -PTX2SA (3): S	

Non è la nota struttura chimica della PTX5

## Yessotossine (YTXs)



## Adriatoxin (ATX)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	n
yessotoxin (YTX)	OSO <sub>3</sub> Na		1
45-hydroxyyessotoxin (hydroxyYTX)	OSO <sub>3</sub> Na		1
45, 46, 47-trinoryessotoxin (norYTX)	OSO <sub>3</sub> Na		1
2-homoyessotoxin (homoYTX)	OSO <sub>3</sub> Na		2
2-homo-45-hydroxyessotoxin (hydroxy-homoYTX)	OSO <sub>3</sub> Na		2
44-carboxyessotoxin (carboxyYTX)	OSO <sub>3</sub> Na		1

Fig. 2. - Struttura chimica delle tossine DSP (diarrhetic shellfish poisoning).

no selettivamente le proteine fosfatasi con particolare riferimento alla PP2A [59], alterando i processi di fosforilazione-defosforilazione che sono fondamentali per la regolazione dell'attività cellulare. L'acido okadaico probabilmente provoca diarrea stimolando la fosforilazione che controlla la secrezione di sodio da parte delle cellule intestinali. Inoltre l'acido okadaico stimola direttamente la contrazione della muscolatura liscia, anche intestinale [60].

Nei topi è stata riportata una tossicità orale di 0,20-0,30 mg/kg per l'acido okadaico e di 0,10-0,30 per la DTX1 [61]. In uno studio nel quale l'acido okadaico è stato somministrato per via orale in topi adulti, è risultato che alla dose di 75 µg/kg OA veniva indotto un trascurabile accumulo di fluidi nell'intestino. Questo valore è stato individuato come LOAEL [62].

A seguito di iniezione intraperitoneale di DTX-1 a varie concentrazioni (50-500 µg/kg bw), sono state osservate nel topo alterazioni principalmente a livello dell'intestino tenue [63], con degenerazione dell'epitelio e distruzione dell'apparato del Golgi, cosa che suggerisce un possibile attacco diretto a questo organello.

L'effetto distruttivo sull'epitelio dell'intestino tenue è stato dimostrato anche per le altre tossine acide (OA e DTX-3) da [64].

Utilizzando dimetil-benzantracene come iniziatore tumorale, è stato dimostrato che l'acido okadaico e la DTX1 agiscono come promotori di tumori della pelle nel topo, inducendo per lo più papillomi e carcinomi [65, 66]. A seguito dell'osservazione che l'acido okadaico induce l'attività dell'ornitina decarbossilasi nello stomaco ghiandolare dei ratti, attività tipica di altri promotori tumorali, è stato suggerito che l'acido okadaico possa essere anche un promotore di tumori dello stomaco [65].

In studi successivi è stata evidenziata anche una possibile attività genotossica dell'acido okadaico, a seguito dell'osservazione di addotti al DNA su colture cellulari ed embrioni di pesce [67].

L'intossicazione da DSP nell'uomo è caratterizzata da disturbi gastrointestinali quali diarrea nel 92% dei casi, nausea nell'80%, vomito nel 79% e dolori addominali nel 53%. I sintomi compaiono dopo un periodo che va da mezz'ora a 12 ore dall'ingestione di molluschi contaminati e possono durare fino a tre giorni nei casi più gravi, senza tuttavia lasciare conseguenze. Non è stato mai riportato alcun caso letale.

*Tossine neutre.* - Le pectenotossine (PTXs) sono un gruppo di polieteri ciclici di origine marina strutturalmente divisi in due gruppi [68].

L'origine di queste tossine è attribuito alle Dinophysis. In *D. fortii* è stata dimostrata la presenza di una pectenotossina, la PTX2 [53]; anche in Adriatico *D. fortii* mostra la presenza di PTX2 oltre a quella dell'acido okadaico [56].

La PTX2 è ritenuta il precursore delle altre pectenotossine (PTXs) attraverso processi di biotrasformazione ad opera dei bivalvi.

Le pectenotossine sono state isolate dai bivalvi in differenti aree geografiche: Europa, Asia ed Oceania [56, 69]. Soltanto recentemente in Australia è stato segnalato un avvelenamento da molluschi bivalvi attribuito a PTX2SA [70].

Sono state riportate le seguenti tossicità delle PTXs espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg [57]:

PTX1	0,25
PTX2	0,23
PTX3	0,35
PTX4	0,77
PTX6	0,50
PTX7	> 5,0
PTX8	> 5,0
PTX9	> 5,0

I risultati delle prime ricerche sulle alterazioni istopatologiche causate dalle pectenotossine risalgono al 1986 [63]. Dopo un'ora dall'iniezione intraperitoneale di PTX1, nei topi furono osservati negli epatociti intorno alle regioni periportal dei lobuli epatici numerosi vacuoli non contenenti lipidi.

In cellule epatiche *in vitro*, la PTX1 induce una diminuzione del numero e una perdita dell'arrangiamento radiale dei microtubuli; il danno alle cellule epatiche è reversibile se le cellule sono trattate con concentrazioni inferiori a 0,5 µg/ml per meno di 4 ore. Dopo 24 ore dalla rimozione della tossina gli epatociti recuperano le condizioni di normalità [71].

In una recente ricerca è stato dimostrato *in vitro* che anche la PTX6 agisce selettivamente sul citoscheletro provocando cambiamenti nella polimerizzazione dell'actina [72].

La PTX2 induce diarrea in topi adulti dopo somministrazione orale alla dose di 1,0 mg/kg. Alla dose di 0,25 mg/kg non induce diarrea ma è possibile osservare che l'intestino crasso si gonfia e si riempie di fluidi. A concentrazioni da 0,25 a 2,0 mg/kg si notano anche lesioni al fegato, allo stomaco e all'intero intestino [73].

*Yessotossine.* - Sono state riportate le seguenti tossicità delle YTXs espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg [57]:

YTX	0,10
HydroxyYTX	0,50
DesulfoYTX	0,50
HomoYTX	0,10
Hydroxy-homoYTX	0,50
NorYTX	0,22
CarboxyYTX	0,50
ATX	>0,10

La yessotossina (YTX) è stata per la prima volta isolata dal bivalve *Patinopecten yessoensis* [74]. Ha una struttura chimica simile a quella della brevetossina isolata da *G. breve* e della ciguatossina isolata da *Gymnothorax javanicus*. Questa somiglianza ha fatto pensare che le YTXs potessero intervenire a livello dei canali del Na<sup>+</sup> facilitando l'entrata di questo ione. Tuttavia questo meccanismo non è stato dimostrato sperimentalmente [75]. Successivamente numerosi studi hanno dimostrato la presenza di diversi analoghi della yessotossina.

La prima dimostrazione della presenza di yessotossine in mitili dell'Adriatico risale al giugno del 1995 [21]. Successivamente, in mitili raccolti nella stessa area di mare nell'estate del 1996 e 1997, furono messi in evidenza analoghi delle yessotossine [76-78]: homo-yessotossina, 45-idrossihomo-yessotossina e 45-idrossi-yessotossina. Un nuovo analogo della yessotossina, l'adriatossina, con tre gruppi solforici (ATX), è stata identificata in mitili del Mare Adriatico [79]. Due specie di dinoflagellate sono considerate responsabili della produzione di yessotossine *Protoceratium reticulatum* e *Lingulodinium polyedrum* [76, 78].

Negli studi sugli effetti tossici della yessotossina come tale e della sua forma desolfatata, è risultato che la prima ha come organo bersaglio il miocardio mentre la seconda il fegato e il pancreas [80].

La causa di morte nel topo (alla dose di 0,10 mg/kg) è dovuta ad un'insufficienza cardiaca acuta per azione della yessotossina e ad un'alterazione del fegato e del pancreas per la yessotossina desolfatata.

La yessotossina risulta tossica in epatociti e in cellule di glioma di ratto [75]. A livello istologico si osserva un edema intracitoplasmatico nelle cellule del muscolo cardiaco 3 ore dopo l'iniezione i.p. di 300 mg/kg di YTX mentre non si osservano danni agli organi digestivi. La YTX desolfatata, alla stessa dose, causa invece una grave degenerazione grassa del fegato ed una necrosi intracellulare nello stesso organo e nel pancreas, senza agire sul cuore [80].

La scarsa conoscenza a livello biologico molecolare e farmacologico degli analoghi della yessotossina, alcuni dei quali sono stati ritrovati nei mitili delle coste adriatiche, dipende dalla non disponibilità in commercio dei principi attivi. Questi ultimi attualmente sono utilizzati solo dai ricercatori che le estraggono e purificano a partire dai mitili contaminati. Non si conoscono casi di intossicazione umana attribuibili alle YTXs.

### Epidemiologia

Le pectenotossine e le yessotossine sono state erroneamente ritenute responsabili di sindromi diarroiche (DSP), in quanto si ritrovano spesso in presenza simultanea con l'acido okadaico e i suoi derivati nei molluschi bivalvi.

Le sindromi DSP dovute all'acido okadaico sono associate all'ingestione di molluschi contaminati. In Giappone, questo tipo di intossicazione è stato osservato a seguito del consumo di mitili (*M. edulis* e *M. coruscum*), pettini (*Patinopecten yessoensis* e *Chlamis nipponensis*) e vongole (*Tapes japonica* e *Gomphina melaegis*). Sulle coste atlantiche dell'Europa, *Mytilus edulis* e *Ostrea* sp. sono stati associati a episodi di intossicazione DSP. Nei molluschi, queste tossine si accumulano principalmente nell'epatopancreas. Per questa ragione, anche se la cottura non altera significativamente la tossicità dei molluschi, l'intossicazione può essere considerevolmente ridotta evitando di consumare le ghiandole digestive dei molluschi.

L'entità dell'accumulo di tossine DSP è sensibilmente diversa nei molluschi bivalvi. Attività di monitoraggio nell'Adriatico settentrionale hanno permesso di stabilire che le concentrazioni più elevate di tossina vengono raggiunte nei mitili e, anche se in misura molto inferiore, nelle vongole [81].

La concentrazione di cellule nell'acqua di mare necessaria a contaminare i molluschi è molto variabile. È stato riportato che una concentrazione di 1000-2000 cellule/l di *Dinophysis* spp. provoca un accumulo significativo di cellule (20 000-30 000 per epatopancreas) e un elevato livello di tossicità nei mitili [82]. Le intossicazioni DSP sulla costa olandese sono state associate a concentrazioni di oltre 20 000 cellule/l [83].

D'altra parte, l'accumulo di tossine DSP nei molluschi sembra dipendere anche da altri fattori. In uno studio su *Dinophysis* nelle acque costiere del Portogallo, è stato ad esempio osservato che il tempo necessario ai molluschi per diventare tossici dipende dalla presenza non solo di alghe tossiche ma anche di altre specie non tossiche [84].

Fino agli anni '80, le aree dove sono state registrate intossicazioni da tossine DSP erano circoscritte all'Oceano Atlantico, al mare del Nord, alle coste degli Stati Uniti (dell'Atlantico e del Pacifico), del Cile, del Sud Africa, della Thailandia e del Giappone.

In quest'ultimo paese, dal 1976 al 1982 sono stati registrati oltre 1300 casi di intossicazione da tossine DSP [68]. In Francia, negli anni 1983 e 1984, sono state riportati più di 5000 casi di intossicazioni, e altri 21 000 casi sono stati descritti successivamente [85]. Intossicazioni di simile entità hanno interessato le coste olandesi [86]. In Scandinavia, nel 1984, 300-400 casi sono stati attribuiti a ingestione di tossine DSP [87]. In Spagna, nel settembre 1981, sono stati osservati circa 5000 casi di disturbi gastrointestinali causati dalla presenza di tossine DSP nei molluschi [85].

Per quanto riguarda il Mediterraneo, dai dati disponibili sembra che la contaminazione da DSP sia limitata ad alcune aree della parte settentrionale del bacino. I primi casi di contaminazione sono stati quelli, sopra citati, rilevati in Francia nel 1987. Contamina-

zioni da DSP si sono verificate anche lungo la costa orientale della Corsica [88].

Per quanto riguarda i mari italiani, il primo episodio noto di intossicazione da tossine DSP si è verificato in Adriatico nel giugno del 1989. In tale occasione, fu dimostrata la presenza di cellule di *D. fortii* nell'epatopancreas di mitili della fascia costiera dell'Emilia Romagna, che avevano causato disturbi diarroici in circa un centinaio di consumatori [49]. Questo fenomeno è stato successivamente osservato nel Golfo di Trieste e lungo la costa marchigiana [89, 50]. Contaminazioni di mitili da tossine DSP sono state segnalate anche lungo le coste della Croazia e della Slovenia [90].

La tossicità dei mitili dell'Adriatico settentrionale dovuta a tossine DSP si manifesta con una certa continuità, presentandosi piuttosto puntualmente nel periodo stagionale estivo-autunnale.

#### Azaspiracido, una nuova tossina marina isolata dai mitili

Recentemente è stata individuata una nuova tossina liposolubile, l'azaspiracido (Fig. 3 e Tab. 1).

Il primo episodio di intossicazione da azaspiracido (AZA) è avvenuto nel 1995, quando i mitili raccolti nella baia di Killary in Irlanda causarono forti disturbi gastrointestinali nei consumatori dei Paesi Bassi. La struttura della tossina responsabile dell'intossicazione fu successivamente individuata in Giappone e, sulla base della sua composizione chimica, fu definita come azaspiracido [91, 92]. Altri casi di intossicazione da tossina AZA causati da mitili provenienti dall'Irlanda sono stati segnalati nell'Irlanda stessa e in altri paesi dell'Europa, Italia compresa [81].

Sono stati isolati, oltre all'AZA quattro analoghi (AZA2-AZA5) [93]. Si ipotizza che AZA e i suoi analoghi siano prodotti da dinoflagellate.

Sono state riportate per la tossina AZA dosi letali per via orale nel topo di 250 e 500 µg/kg e di 200 µg/kg a seguito di iniezione intraperitoneale [94]. In questi studi è stata osservata una marcata variabilità nella sensibilità alla tossina, in relazione all'età.

In uno studio condotto con estratti di mitili parzialmente purificati sono stati messi in evidenza gravi danni al fegato, al pancreas, al timo, ai tessuti linfatici e al tratto digestivo [95]. In un secondo studio con la tossina purificata somministrata per via orale alle dosi di 500, 600 e 700 µg/kg, sono stati osservati effetti di gravità progressiva agli stessi organi entro 24 ore [94].

I dati disponibili riguardanti questi studi hanno permesso di individuare LOAEL di 23 e 86 µg di tossina, con un valore medio di 51,7 µg.

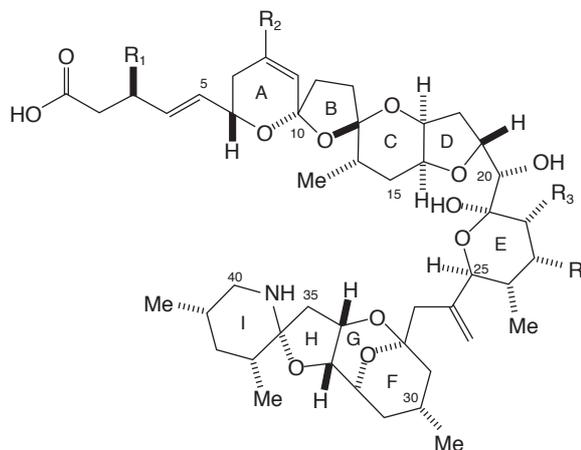


Fig. 3. - Struttura chimica degli azaspiracidi (AZAs).

Tab. 1. - Tossicità degli azaspiracidi (AZAs)

Tossina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	mg/kg*
Azaspiracido (AZA)	H	H	Me	H	0,20
Azaspiracido-2 (AZA2)	H	Me	Me	H	0,11
Azaspiracido-3 (AZA3)	H	H	H	H	0,14
Azaspiracido-4 (AZA4)	OH	H	H	H	0,47
Azaspiracido-5 (AZA5)	H	H	H	OH	1,00

(\*) Tossicità delle AZAs espressa come mortalità del topo per i.p. [57].

#### Livelli di tolleranza e considerazioni di sicurezza dell'acido ocadaico e delle altre tossine DSP

Per quanto riguarda l'OA e la DTX, i dati riguardanti le intossicazioni umane in Giappone e in Norvegia hanno permesso di ricavare un LOEL di 48-65 µg per una persona di 60 kg, corrispondente a circa 0,8 µg di acido ocadaico/kg di peso corporeo. Da questo valore è stata definita un'assunzione tollerabile di 0,27 µg/kg di peso corporeo, applicando un fattore di incertezza di 3.

Per la tossina PTX2 è stato individuato un LOEL per somministrazione orale di 0,25 mg/kg [73]. Applicando un fattore di sicurezza di 100 è stato ottenuto un limite tollerabile di 0,25 µg/kg per l'uomo. Questo valore corrisponde ad una dose di 15 µg in una persona adulta di 60 kg di peso e ad un livello tollerabile nei molluschi di 15 µg/100 g di parte edibile.

Per le yessotossine, sulla base del NOAEL sul topo, applicando un fattore di incertezza di 100, è stata definita un'assunzione tollerabile di 10 µg/kg di peso corporeo, che per un adulto di 60 kg di peso corrisponde ad una dose di 600 µg.

In considerazione dell'esiguità dei dati tossicologici ed epidemiologici, è stato suggerita una dose tollerabile di 100 µg. Di conseguenza, è stato proposto un livello massimo nei molluschi di 100 µg/100 g di parte edibile

Recentemente, con una decisione della Commissione Europea del 15 marzo 2002, che fissa norme specifiche per l'attuazione della Direttiva 91/492/CE del Consiglio, sono stati definiti i seguenti tenori massimi di alcune biotossine marine in molluschi bivalvi e in altri organismi:

- 160 µg di acido okadaico equivalente/kg parte edibile per acido okadaico, DTX e pectenossine;
- 1 mg equivalente di yessotossina/kg parte edibile;
- 160 µg equivalenti di azaspiracido/kg parte edibile.

### Tossine NSP

La NSP è una sindrome di tipo neurotossico legata alle fioriture del dinoflagellato *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*). Le fioriture di quest'alga si verificano per lo più in Florida, dove causano morie degli animali marini. Il rischio per l'uomo deriva dall'ingestione di molluschi contaminati e dall'inalazione di aerosol contenente cellule o loro frammenti, in prossimità di aree interessate dalle fioriture.

#### *Specie tossiche e loro distribuzione*

L'area geografica in cui si verifica maggiormente la presenza di questa alga è rappresentata dal golfo del Messico e dalle coste della Florida e del nord Carolina [96]. Sono state riportate fioriture di questa specie, non associate a morie di pesci o a intossicazioni nell'uomo, anche nella Spagna settentrionale, in Giappone e lungo la costa orientale del Mediterraneo [97, 98].

Lungo le coste dell'Adriatico settentrionale, nel 1976 e 1977 e successivamente nel 1984, sono state osservate fioriture attribuite a *Gymnodinium* sp [99, 9]. La specie responsabile delle fioriture non è stata tassonomicamente definita, è tuttavia diversa da *G. breve* e non produce tossine NSP [100].

Una fioritura di *Gymnodinium* spp. è stata riportata nel golfo di Olbia (Sardegna) nell'autunno del 1985, ma anche in questo caso non sono state rilevate tossine NSP [101].

#### *Chimica delle tossine NSP*

La neurotossina di *P. brevis*, denominata BTx-B, è stata descritta per la prima volta come un sistema di 11 anelli eterociclici contenenti ossigeno, terminante con un lattone insaturo a una estremità e con una aldeide insatura all'altra [102]. In seguito, sono state caratterizzate altre brevetossine [103].

### *Profilo tossicologico*

I primi casi di intossicazione causati da brevetossine risalgono all'800, ma solo nel 1952 è stata chiarita la relazione tra "maree rosse" dovute a *P. brevis* e sindrome neurotossica (NSP) [104]. Questa intossicazione avviene in seguito al consumo di bivalvi che hanno accumulato le brevetossine nei loro tessuti. Gli episodi finora osservati sono circoscritti lungo le coste del Golfo del Messico e sono stati associati al consumo di vongole. Non è stato riportato nessun caso letale.

La NSP è dunque una forma relativamente blanda di intossicazione da molluschi bivalvi. I principali sintomi sono: sensazione di paralisi alla bocca e alle dita, atassia, rallentamento del battito, sensazione di caldo e freddo, midriasi e lieve diarrea. La guarigione avviene in pochi giorni.

Mentre le saxitossine responsabili della PSP agiscono come agenti non-depolarizzanti nelle membrane delle cellule eccitabili, le brevetossine, liposolubili, agiscono come sostanze depolarizzanti, inducendo l'apertura dei canali di membrana permeabili al Na<sup>+</sup> e quindi favorendo il flusso di questo ione verso l'interno [105].

Durante le fioriture di *P. brevis* si possono verificare disturbi di tipo respiratorio, dovuti all'inalazione di aerosol di acqua marina contenente cellule e loro frammenti o brevetossine disciolte. Si possono determinare forti irritazioni della congiuntiva e delle mucose (soprattutto nasali) seguite da tosse secca e rinorrea [106]. Anche in questo caso, la tossina provoca l'apertura dei canali di membrana permeabili al Na<sup>+</sup>, rilasciando acetilcolina che a sua volta causa la contrazione della muscolatura liscia tracheale. Gli effetti sono solo temporanei. Le maree rosse causate da *P. brevis* e associate a questa sindrome respiratoria sono frequenti soprattutto in Florida, ma sono state descritte anche nel Golfo del Messico e nella Carolina del nord [96], nella Spagna settentrionale e in Giappone [97]. Anche nell'Adriatico sono stati riportati casi di irritazione respiratoria, probabilmente dovuti alla presenza di una specie di *Gymnodinium* non ancora definita tassonomicamente [100].

### Tossine ASP

Nel 1987 in Canada è stata riportata un'intossicazione attribuita al consumo di mitili che coinvolse 153 persone. Oltre a disturbi di tipo gastrointestinale, questa intossicazione provocò in alcuni casi confusione e perdita di memoria, da cui il termine *amnesic shellfish poisoning* (ASP) proposto per questa sindrome [107].

#### *Specie tossiche e loro distribuzione*

La tossina responsabile di questa sindrome risultò essere l'acido domoico, un amminoacido neurotossico

relativamente raro [107], e la specie algale produttrice fu identificata nella diatomea pennata *Nitzschia pungens* f. *multiseries*. Dopo l'episodio di intossicazione del 1987 sopra citata, nella Baia di Cardigan fu rilevata una concentrazione di *N. pungens* di 10 milioni di cellule/l, con livelli di acido domoico fino all'1% di peso secco.

Un'altra diatomea produttrice di acido domoico, *Pseudonitzschia australis*, è stata individuata lungo le coste della California [108]. In quest'area le tossine ASP sono state rilevate nei molluschi e in alcuni pesci, in particolare nelle acciughe. Il consumo di pesci contenenti queste tossine è stato ritenuto responsabile delle morie di uccelli marini osservate in questa zona nello stesso periodo.

Alcuni casi di intossicazione umana sono stati attribuiti al consumo di molluschi contenenti acido domoico anche nello Stato di Washington.

Attualmente, la biointossicazione da acido domoico è presente non solo in Canada e in California, ma anche lungo le coste dell'Australia e della Nuova Zelanda. In Europa, benché non sia stato mai registrato alcun episodio di intossicazione, la presenza di acido domoico è stata dimostrata in mitili coltivati lungo la costa della Galizia [109] e nella diatomea *P. pungens* f. *multiseries*, raccolta nelle coste olandesi [110].

In Italia, il problema del possibile rischio sanitario associato alle tossine ASP è stato sollevato quando, negli anni 1988/91, sono comparsi nell'alto e medio Adriatico aggregati mucilluginosi contenenti diatomee del genere *Nitzschia*. In realtà fu possibile escludere la presenza di acido domoico in questi aggregati [111].

Tuttavia questa tossina rappresenta attualmente anche per l'Italia un problema sanitario. Infatti l'assenza di acido domoico nei molluschi bivalvi dei mari italiani non esclude il rischio che molluschi contaminati provenienti da altri paesi provochino intossicazioni in Italia; inoltre le varie specie del genere *Pseudonitzschia* produttrici di acido domoico, e quindi potenzialmente tossiche, hanno una distribuzione piuttosto ampia.

#### *Meccanismi d'azione e tossicologia clinica*

Ricerche sul meccanismo d'azione dell'acido domoico hanno mostrato che questo aminoacido, analogo dell'acido glutammico e dell'acido kainico, agisce sui recettori dell'acido glutammico, uno dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale [112]. Questo meccanismo d'azione a livello delle sinapsi spiega in parte gli effetti neurotossici dell'acido domoico.

Il meccanismo d'azione dell'acido domoico è attualmente noto a livello dei recettori degli aminoacidi eccitatori e della trasmissione sinaptica. La sintomatologia da ASP non si limita al sistema nervoso ma riguarda anche l'apparato digerente.

In confronto alle tossine PSP, l'acido domoico è una neurotossina relativamente blanda. Nell'intossicazione avvenuta in Canada, vi furono 153 casi di disturbi gastroenterici con nausea, vomito e diarrea entro 24 ore, e disturbi neurologici (principalmente confusione e perdita di memoria) dopo 48 ore nei pazienti più anziani (oltre 60 anni), tre dei quali morirono [107].

#### *Livelli di tolleranza e considerazioni di sicurezza*

E' stato proposto un livello tollerabile di acido domoico di 20 µg/g di parte edibile di mollusco, derivato dopo aver osservato effetti tossici sui consumatori di molluschi ad una concentrazione di 200 µg/g [113].

### **Intossicazione da venerupina (VSP)**

L'intossicazione da venerupina è una sindrome non paralitica causata dall'ingestione di ostriche (*Crassostrea gigas*) e vongole (*Venerupis semidecussata*) che hanno accumulato dinoflagellate tossiche. La specie che si ritiene responsabile di questa intossicazione è *Prorocentrum minimum* var. *mariae-lebouriae* e var. *triangulatum* [114], che produce "acque colorate" soprattutto in Giappone, nel Mar Baltico e in Portogallo.

Nel Mediterraneo è stato osservato un progressivo aumento di *P. minimum* [115]. Nell'estate del 1983, costituì una parte considerevole della regolare fioritura estiva nella Baia di Sibenik (costa orientale adriatica); negli anni seguenti, la sua presenza è costantemente aumentata ed è stata riportata anche in altre zone costiere dell'Adriatico [116].

La maggior parte degli episodi dell'intossicazione da venerupina si sono verificati in Giappone, con numerosi casi letali [117]. Anche in Norvegia, nel 1979, sono stati descritti i sintomi di questa intossicazione in 70 persone che avevano consumato mitili raccolti in prossimità di una massiccia fioritura di *P. minimum* [118].

La natura della tossina responsabile dell'intossicazione da venerupina non è stata ancora definita. L'avvelenamento è caratterizzato da una lunga incubazione (24-48 ore) a cui fa seguito un inizio repentino dei sintomi: nausea, vomito, diarrea, cefalea e agitazione. Nei casi più gravi possono manifestarsi disfunzione epatica, delirio e coma epatico. La morte sopraggiunge in circa il 33% dei pazienti.

### **Intossicazioni associate al consumo di pesci "Ciguatera disease"**

La ciguatera è un'intossicazione tipica delle regioni costiere tropicali e subtropicali, particolarmente dei Caraibi e delle isole del Pacifico. E' causata dall'ingestione di una grande varietà di pesci delle barriere

coralline che contengono tossine accumulate lungo la catena alimentare. Il termine ciguatera deriva dal nome usato nel 18° secolo nelle Antille spagnole per una intossicazione alimentare causata dalla "cigua", un mollusco del genere *Cittarium*. Responsabile della produzione di ciguatossine è un dinoflagellato bentonico, *Gambierdiscus toxicus* [119], di cui si nutrono i pesci erbivori che a loro volta vengono ingeriti dai pesci carnivori. In questo modo i pesci più grandi e più vecchi accumulano una grande quantità di tossina, che si concentra in tutto l'organismo e soprattutto nelle interiora.

Sono almeno cinque le tossine responsabili di questa intossicazione, tra le quali un composto ammonico quaternario (ciguatossina) e una componente idrosolubile (maitotossina) [120]. La ciguatossina è una tossina molto potente, con una DL50 nel topo di 0,45 µg/kg i.p. La sua azione principale è quella di aumentare la permeabilità al sodio delle membrane eccitabili causandone la depolarizzazione [121]. La ciguatera si presenta come una sindrome acuta con vomito, diarrea, dolori addominali, disturbi neurologici e, in alcuni casi, bradicardia o tachicardia. Non trattata, la comune sindrome gastroenterica si risolve entro 24-48 ore, ma alcuni sintomi neurologici possono persistere per mesi [122].

### Il problema dell'importazione di alghe tossiche marine

La progressiva diffusione delle specie algali marine dannose è un problema che merita un'attenzione particolare. Le acque di zavorra delle navi da carico sono ritenute la causa principale di tale diffusione. Queste acque possono infatti contenere gli organismi presenti nelle aree portuali dalle quali vengono pompate (virus, batteri, fitoplancton, crostacei, molluschi, pesci), i quali possono sopravvivere durante il trasporto e così essere immessi nell'ambiente dove queste vengono scaricate. La loro sopravvivenza in questo nuovo ambiente è legata all'analogia con l'ambiente d'origine. In questo modo avviene la colonizzazione di aree geografiche da parte di nuove specie algali. Enormi volumi di acque di zavorra sono in continuo movimento in tutto il mondo ed è presumibile che aumentino in futuro con la globalizzazione dei commerci. E' stato stimato che ogni anno circolano in tutto il mondo circa 10 miliardi di tonnellate di acqua di zavorra.

Il problema dell'importazione di alghe tossiche marine, così come di altri organismi alieni, è stato ampiamente riconosciuto e documentato in vari paesi. In Tasmania sono state campionate acque e sedimenti accumulati nelle cisterne di zavorra di grandi navi da carico e sono state rilevati oltre 300 milioni di cisti di dinoflagellati in una sola nave [123, 124].

In Australia, è attivo dal 1991 un programma di ricerca per minimizzare il trasporto di organismi alieni.

Questo problema è stato oggetto di un workshop dell'International Council for the Exploration of the Sea (ICES), nel corso del quale è emerso che numerosi paesi si sono dati l'obiettivo di elaborare specifici sistemi di sorveglianza.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

### BIBLIOGRAFIA

1. Vollenweider RA, Rinaldi A, Montanari G. Eutrophication, structure and dynamics of a marine coastal system: results of ten-year monitoring along the Emilia-Romagna coast (Northwest Adriatic Sea). In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani G (Ed.). *Marine coastal eutrophication Proceedings of an International Conference*. Bologna 21-24 March 1990. Italy: 1992. p. 63-106.
2. Anderson DM. Le maree rosse. *Le Scienze* 1994;314(10):74-81.
3. Hallegraeff GM. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Ed.). *Manual on harmful marine microalgae*. Paris: UNESCO. 1995. p. 1-24.
4. Anderson DM. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (Ed.). *Red tides: biology, environmental science and technology*. New York: Elsevier Science Publishing Co.; 1989. p. 11-2.
5. Smayda TJ. Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: a linkage? In: Cosper EM, Carpenter EJ, Bricej VM (Ed.). *Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms*. Berlin: Springer Verlag; 1989. p. 449-83.
6. Hallegraeff GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 1993;32(2):77-99.
7. Boni L. Red tides of the coast of Emilia Romagna (North Western Adriatic Sea) from 1975 to 1982. *Inf Bot It* 1983;15(1): 18-24.
8. Viviani R. Relazione. In: *Fenomeni di eutrofizzazione lungo le coste dell'Emilia Romagna*. Regione Emilia Romagna: a cura del Dipartimento Sicurezza Sociale e Ambiente; 1976. p. 27-38.
9. Artegiani A, Azzolini R, Marzocchi M, Morbidoni M, Solazzi A, Cavolo F. Prime osservazioni su un "bloom" fitoplanctonico lungo la costa marchigiana nell'anno 1984. *Nova Thalassia* 1985;7(suppl. 3):137-42.
10. Fonda Umani S. Hydrology and "red tides" in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Oebalia* 1985;11:141-7.
11. Honsell G, Talarico L, Cabrini M. Interesting ultrastructural features of a green dinoflagellate. *G Bot It* 1988;122:76-8.
12. Hallegraeff GM, Bolch CJ. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores via ship's ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J Plankton Res* 1992; 14:1067-84.
13. Smayda T. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: Graneli E, Sundstrom

- B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier; 1990. p. 29-40.
14. Andersen P. Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. *IOC Techn Ser UNESCO* 1996;44:102
  15. Shumway SE, Barter J, Sherman-Caswell S. Auditing the impact of toxic algal blooms on oyster. *Environ Auditor* 1990;2: 41-56.
  16. Sommer H, Meyer KF. Paralytic shellfish poisoning. *Arch Pathol* 1937;24:560-98.
  17. Schantz EJ, Mold JD, Stanger DW, Shavel J, Riel FJ, Bowden JP, Lynch JM, Wylar RS, Riegel BR, Sommer H. Paralytic shellfish poisoning. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. *J Am Chem Soc* 1957;72:5230-35.
  18. Taylor FYR. Toxic dinoflagellates: taxonomic and biogeographic aspects with emphasis on seafood toxins. In: Ragelis EP (Ed.) *Seafood toxins ACS Symposium*. Washington DC: American Chemical Society 1984; Series 262: p. 77.
  19. Honsell G. First report of *Alexandrium minutum* in the northern Adriatic waters (Mediterranean Sea). In: Smayda TJ, Shimizu Y (Ed.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea 5th int conf. on toxic marine phytoplankton*. Newport, RI, USA, 28 October-1 November 1991. Elsevier Science Publishers, B.V 1993; p. 127-32.
  20. Cabrini M, Mozetic P, Chiurco R, Cok S, Predonzani S. *PSP toxicity and the distribution of Alexandrium spp in the gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea)*. *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae* (abstract and poster classification). Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 48.
  21. Ciminiello P, Fattorusso E, Magno S, Oshima Y, Poletti R, Viviani R, Yasumoto T. Determination of PSP toxins in mussels from the Adriatic sea. *Mar Pollut Bull* 1995;30:733-5.
  22. Marasovic I, Nincevic Z, Orhanovic S, Pavela-Vrancic M. *DSP and PSP toxicity in the coastal waters of the middle Adriatic (Kastela Bay)*. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (Ed.). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 132.
  23. Innamorati M, Lazzara L, Nuccio C, De Pol M, Mannucci M, Mori, G. *Popolamenti fitoplanctonici e condizioni idrologiche nell'arcipelago toscano. Resoconti dei rilevamenti in mare*. Firenze; 1989. n. 6. p. 1-115.
  24. Boni L, Pompei M, Reti M. Maree colorate e fioriture algali lungo le coste dell'Emilia Romagna dal 1982 al 1985 con particolare riguardo alla comparsa di *protogoniaulax tamarensis*. *Nova Thalassia* 1986;3:237-45.
  25. Montesor M, Marino D, Zingone A, Dafnis G. Three alexandrium species from coastal Tyrrhenian waters (Mediterranean Sea). In: Granéli E, Sundstroem B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier Science Publishing Co.; 1990. p. 82-7.
  26. Carrada GC, Casotti R, Modich M, Saggiomo V. Presence of *gymnodinium catenatum* (dinophyceae) in a coastal Mediterranean lagoon. *J Plankton Res* 1991;13:229-38.
  27. Honsell G, Boni L, Cabrini M, Pompei M. Toxic or potentially toxic dinoflagellates from the Northern Adriatic Sea. In: Vol-lenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). *Marine coastal eutrophication*. New York: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 107-14.
  28. Pagou K. Eutrophication problems in Greece. In: *Eutrophication-related phenomena in the Adriatic Sea and in other Mediterranean coastal zones*. Commission of the European Communities; 1990. (Water Pollution Research, Report 16). p. 97-114.
  29. Poletti R, Milandri A, Pompei M, Viviani R. Controllo delle biotossine ASP nei prodotti ittici. *Laguna* 1997;5:6-17.
  30. World Health Organization. *Aquatic (marine and freshwater) biotoxin*. Geneva: WHO; 1984. (Environmental Health Criteria, 37). p. 1.
  31. Viviani R. Eutrophication, marine biotoxins, human health. In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). *Marine coastal eutrophication*. Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990. *Sci Total Environ*;1992(suppl.):631-62.
  32. Schantz EJ, Mold JD, Howard WL, Bowden JP, Stanger DW, Lynch JM, Wintersteiner OP, Dutcher JD, Walters DR, Riegel B. Paralytic shellfish poisoning. VIII. Some chemical and physical properties of purified clam and mussel poisons. *Can J Chem* 1961;39:2117-23.
  33. Kao CY. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. *Fed Proc* 1972;31:1117-23.
  34. Steidinger KA, Baden DG. Toxic marine dinoflagellates. In: Spector DL (Ed.). *Dinoflagellates*. Orlando, Florida: Academic Press Inc.; 1984. p. 201-49.
  35. Viviani R. *The veterinarian in the control of aquatic biotoxins*. Bologna: Grasso; 1981. p. 1-151.
  36. Auerbach PS. Clinical therapy of marine envenomation and poisoning. In: Tu AT (Ed.). *Handbook of natural toxins-marine toxins and venoms*. New York and Basel: M Dekker Inc.; 1988. p. 493-565.
  37. Chang FH, Anderson DM, Kulis DM, Till DG. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty New Zealand. *Toxicon* 1997;35:393-409.
  38. White AW. Paralytic shellfish toxins and finfish. In: Ragelis EP (Ed.). *Seafood toxins ACS Symposium Series 269*. Washington DC: American Chemical Society; 1984. p. 171-80.
  39. Luthy J. Epidemic paralytic shellfish poisoning in western Europe, 1976. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic dinoflagellate blooms*. North Holland, New York: Elsevier; 1979. p. 15-22.
  40. Bravo I, Reguera B, Martinez A, Fraga S. First report of *gymnodinium catenatum* graham in the Mediterranean coast. In: Granéli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier Science Publisher Co; 1990. p. 449-52.
  41. Delgado M, Estrada M, Camp J, Fernandez JV, Santmarti M, Lleti C. Development of toxic *Alexandrium minutum* halim (Dinophyceae) bloom in the harbour of Sant Carles de la Rapita (Ebro Delta, northwestern Mediterranean). *Sci Mar* 1990;54:1-7.
  42. Tagmouti F, Chafak H, Fellat-Zarrouk R, Talbi M, Blaghen M, Mikou A, Guittet E. (1995) Detection of toxins in bivalves of Moroccan coasts. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.). *Harmful an toxic algal blooms*. Sendai: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 85-7.

43. Rosales-Loessener F, De Porras E, Dix MW. Toxic shellfish poisoning in Guatemala. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (Ed.). *Red tides: biology, environmental science and toxicology*. New York: Elsevier; 1989. p. 113-6.
44. Kao CY. Paralytic shellfish poisoning. In: Falconer IR (Ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press; 1993. p. 75-86.
45. Viviani R, Proja M, D'Alessandro F, Mancini L, Poletti R, Montanaro G. Primi casi in Italia di "paralytic shellfish poisoning" da mitili coltivati nei rias della Spagna. *Atti Soc It Vet* 1977;31:331.
46. Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1978;44:1249-55.
47. Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T, Fujita N. Identification of *dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1980;46:1405-11.
48. Relevante N, Williams WT, Gilmartin M. A numerical assessment of the temporal and spatial distribution of phytoplankton assemblages in the Northern Adriatic Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 1984;77:137-50.
49. Boni L, Mancini L, Milandri A, Poletti R, Pompei M, Viviani R. First cases of DSP in the Northern Adriatic Sea. In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). *Marine coastal eutrophication*. Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990. *Sci Total Environ* 1992(suppl.):419-26.
50. Ammazalorso P, Ercolessi M, Giorgi G, Trotta I, De Rosa F, Grassini P. Indagine sulla presenza di dinophysis e tossina liposolubile DSP in molluschi ed acque di mare adibite alla molluschicoltura in provincia di Pesaro, nell'estate 1990. *Ig Mod* 1991;96:142-72.
51. Della Loggia R, Cabrini M, Del Negro P, Honsell G, Tubaro A. Relationship between dinophysis spp. in seawater and DSP toxins in mussels in the Northern Adriatic Sea. In: Smayda TJ, Shimizu Y (Ed.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. 5<sup>o</sup> Int Conf. on toxic marine phytoplankton. Newport RI, USA, 28 October-1 November 1991. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, BV; 1993. p. 483-8.
52. Sidari L, Honsell G. Il genere *dinophysis ehrenberg* (pyrophyta) in Adriatico: revisione bibliografica. *Boll Soc Adr Sci* 1994; 75:413-22.
53. Lee JS, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J Appl Phycol* 1989;1:147-52.
54. Giacobbe MG, Penna A, Ceredi A, Milandri A, Poletti R, Yang X. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *dinophysis sacculus* (dinophyta). *Phycologia* 2000;39(3):177-82.
55. Fattorusso E, Ciminiello P, Costantino V, Magno S, Mangoni A, Milandri A, Poletti R, Pompei M, Viviani R. Okadaic acid in mussels of Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull* 1992;24:234-7.
56. Draisci R, Lucentini L, Giannetti L, Boria P, Poletti R. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 1996;34:923-35.
57. Working Group on Toxicology of DSP and AZP. *Report of the meeting of the Working Group on Toxicology of DSP and AZP*. Brussels, 21-23rd May 2001. p. 21.
58. Suganuma M, Suttajit M, Suguri H, Ojika M, Yamada K, Fujiki K. Specific binding of okadaic acid, a new tumor promoter, in mouse skin. *FEBS Lett* 1989;250:615-8.
59. Takai A, Murata M, Torigoe K, Isobe M, Mieskes G, Yasumoto T. Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. *Biochem J* 1992;284:539-44.
60. Shibata S, Ishida Y, Ditano H, Ohizumi Y, Habon J, Kikuchi H. Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 223:135-43.
61. Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T. Toxicological evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins* 1997;5:255-9.
62. Ito E, Yasumoto T, Takai A, Imanishi S, Harada K. Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon* 2002;40:159-65.
63. Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T. Histopathological studies on experimental marine-toxin poisoning. I: Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysis-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 1986; 24:1141-51.
64. Hamano Y, Kinoshita Y, Yasumoto T. Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *J Food Hyg Soc Jpn* 1986;27:375-9.
65. Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Djika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradeca-noato-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:1768-71.
66. Fujiki H, Suganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Takagi K, Uda N, Wakamatsu K, Yamada K, Murata M, Yasumoto T, Sugimura T. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1 is a potent promoter on mouse skin. *Gann* 1988;79:1089-93.
67. Fessard V, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A, Puisieux-Dao S. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat Res* 1996;361:133-41.
68. Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Matsumoto CK, Clardy J. Diarrhetic shellfish poisoning. In: Rageli EP (Ed.). *Seafood toxins*. Washington DC: American Chemical Society; 1984. (ACS Symposium Series, 262). p. 207-14.
69. James KJ, Bishop AG, Draisci R, Pallechi L, Marchiafava G, Ferretti E, Satake M, Yasumoto T. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J Chromatogr A* 1999;844:53-65.
70. Quilliam M, Eaglesham G, Hallegraef G, Quaine J, Richard D, Nunez P. *Detection and identification of toxins associated with a shellfish poisoning incident in New South Wales, Australia*. Abstract, International Conference on Harmful Algal Blooms, Tasmania, 7-11 Feb. 2000. p. 48.
71. Zhou J, Komiyama M, Terao K, Shimada Y. Effects of pectenotoxin-1 on liver cells *in vitro*. *Natural Toxins* 1994;2:132-5.

72. Leira F, Cabado AG, Vieytes MR, Roman Y, Alfonso A, Botana LM, Yasumoto T, Malaguti C, Rossini GP. Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 7235:1-10.
73. Ishige M, Satoh N, Yasumoto T. *Pathological studies on the mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2)*. Hokkaido Institute of Health; 1988. (Report, 38). p. 15-9.
74. Murata T, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett* 1987;28: 5369-872.
75. Aune T. Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes. In: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y (Ed.). *Mycotoxins and phycotoxins '88*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV; 1988. p. 461-8.
76. Satake M, Terasawa K, Kadowaki Y, Yasumoto T. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallop. *Tetrahedron Lett* 1996;37:5955-8.
77. Satake M, MacKenzie, Yasumoto T. Identification of *Protocera-tium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins* 1997;5:164-7.
78. Tubaro A, Sidari L, Della Loggia R, Yasumoto T. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (Ed.). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 470-2.
79. Ciminiello P, Fattorusso E, Forino M, Magno S, Poletti R, Viviani R. Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett* 1998;39: 8897-900.
80. Terao K, Ito E, Oarada M, Murata M, Yasumoto T. Histopathological studies on experimental marine toxins poisoning. 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from patinopecten yessoensis and of a desulfated derivative. *Toxicon* 1990;28:1095-104.
81. Poletti R. Monitoring activities on marine toxic algae in the Adriatic Sea. In: *Algal bloom detection, monitoring and prediction*. 3<sup>rd</sup> Workshop. "Public health". Rome, 21-22 April 1998. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1999. (Rapporti ISTISAN, 99/8). p. 62-73.
82. Séchet V, Safran P, Hovgaard P, Yasumoto T. Causative species of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway. *Mar Biol* 1990;105:269-74.
83. Kat M. *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. *Sarsia* 1983;68:81-4.
84. Sampayo MA, Alvito P, Franca S, Sousa I. *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. Amsterdam: Elsevier; 1990. p. 215-20.
85. Van Egmond H.P, Aune T, Lassus P, Speijers GJA, Waldock M. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J Nat Toxins* 1993;2:41-83.
86. Kat M. Diarrhetic mussel poisonings in The Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1983;49:417-27.
87. Underdal B, Yndestad M, Aune T. DSP intoxication in Norway and Sweden, autumn 1984-spring 1985. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (Ed.). *Toxic dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 489-94.
88. Belin C. Distribution of dinophysis spp. and alexandrium minutum along french coasts since 1984, and their DSP and PSP toxicity levels. In: Smayda TJ, Shimizu Y (Ed.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 469-74.
89. Tubaro A, Sosa S, Bussani D, Sidari L, Honsell G, Della Loggia R. Diarrhoeic toxicity induction in mussels of the Gulf of Trieste. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (Ed.). *Harmful marine algal blooms*. Paris: Lavoisier Science Publishers; 1995. p. 249-54.
90. Sedmak B, Fanuko N. Occurrence of dinophysis spp. and toxic shellfish in the Northern Adriatic. *J Appl Phycol* 1991;3:289-94.
91. Ofuji K, Satake M, McMahon T, Silke J, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T. Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat Toxins* 1999;7:99-102.
92. Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silk J, Yasumoto T. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from irish mussels. *J Am Chem Soc* 1998;120:9967-8.
93. Ofuji K, Satake M, McMahon T, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T. Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:740-2.
94. Ito E, Satake M, Ofuji K, Kurita N, McMahon T, James KJ. Multiple organ damage caused by new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 2000;38: 917-30.
95. Ito E, Terao K, McMahon T, Silke J, Yasumoto T. Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (Ed.). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 588-9.
96. Pierce RH. Cooperative scientific effort identifies red tide toxin. *Environ (The Marine Biomedical Center) Newsletters* 1987;10:7-12
97. Steidinger KA. A reevaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. *Prog Phycol Res* 1983;2:148-88.
98. Pagou K, Ignatiades L. The periodicity of *Gymnodinium breve* (Davis) in Saronicos Gulf, Aegean Sea. In: Granéli E, Sundstroe B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier; 1990. p. 206-8.
99. Viviani R, Boni L, Cattani O, Mancini L, Poletti R, Annibali A, Milandri A, Montanari G, Nizzoli C, Pirini M, Pompei M, Rinaldi A. Occurrence of various types of phytoplankton blooms in coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia-Romagna during 1978. *Atti dell'Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna, Classe di Scienze Fisiche*, 267. (Memorie Serie IV) 1985;10:1-81.

100. Viviani R. Le diverse fioriture di fitoplancton, dal 1978 al 1982, nell'area del mare Adriatico settentrionale prospiciente la costa dell'Emilia-Romagna. In: *Atti del Convegno Eutrofizzazione dell'Adriatico. Ricerche e linee di intervento*. Bologna, Italy, 18-20 maggio 1983. Regione Emilia-Romagna; 1983. p. 79-87.
101. Sechi N, Volterra L, Aulicino FA, Bonadonna L, Bagella G, D'Amaddio P, Moresu MC, Soggia G. Un caso di eutrofizzazione nel golfo di Olbia. *Ig Moderna* 1987;88:126-36.
102. Alam M, Trieff NM, Ray SM, Hudson JE. Isolation and partial characterization of toxins from the dinoflagellate *G. breve*. *J Pharmacol Sci* 1975;64:865-7.
103. Nakanishi K. The chemistry of brevetoxins: A review. *Toxicon* 1985;23:473-9.
104. McFarren EF, Tanabe H, Silva FJ, Wilson WB, Campbell JE, Lewis KH. The occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams and *gymnodinium breve* cultures. *Toxicon* 1965;3:111-23.
105. Risk M, Lin YY, MacFarlane RD, Sadagopa-Ramanujam VM, Smith LL, Tieff NM. Purification and chemical studies on a major toxin from *gymnodinium breve*. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic dinoflagellate blooms*. North Holland: Elsevier; 1979. p. 335-44.
106. Pierce RH. Red tide *ptychodiscus brevis* toxin aerosols: A review. *Toxicon* 1986;24:955-6.
107. Wright JLC, Boyd RK, De Freitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Loycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P, Pathak VP, Quilliam MA, Ragan MA, Sim PG, Hibault P, Walter JA, Gilgan M, Richard DGA, Dewar D. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can J Chem* 1989; 67:481-90.
108. Buck KR, Uttal-Cooke L, Pilskaln CH, Roelke DL, Villac MC, Fryxell GA, Cifuentes L, Chavez FP. Autecology of the diatom *Pseudonitzschia australis* Frenguelli, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. *Marine Ecol Progr Ser* 1992; 84:293-302.
109. Miguez A, Fernandez ML, Fraga S. First detection of domoic acid in Galicia (NW of Spain). In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.). *Harmful and toxic algal blooms. Proceedings of the VII International Conference on Toxic Phytoplankton*. Sendai, Japan, 12-16 July 1995. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 143-5.
110. Vrieling EG, Koeman RPT, Peperzak L, Veenhuis M, Scheerman P, Gieskes WWC. *Pseudo-nitzschia pungens* forma multiseriata and other *Pseudo-nitzschia* species in the Dutch Wadden Sea. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.). *Harmful and toxic algal blooms. Proceedings of the VII International Conference on Toxic Phytoplankton*. Sendai, Japan, 12-16 July 1995. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 139-42.
111. Viviani R, Boni L, Cattani O, Milandri A, Poletti R, Pompei M, Sansoni G. ASP, DSP, NSP and PSP monitoring in "mucilaginous aggregates" and in mussels in a coastal area of the Northern Adriatic sea facing Emilia Romagna in 1988, 1989 and 1991. In: Vollenweider RA, Rinald A (Ed.). *Proceedings of International Workshop. Cesenatico 10-12 Sept. 1992. Sci Total Environ* 1995;165:203-11.
112. Todd ECD. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning: a review. *J Food Prot* 1993;56:69-83.
113. Waldichuk M. Amnesic shellfish poisoning. *Mar Pollut Bull* 1989;20:359-60.
114. Okaichi T, Imatomi Y. Toxicity of *Prorocentrum minimum* var *mariae-lebouriae* assumed to be a causative agent of short-necked clam poisoning. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic dinoflagellate blooms*. New York: Elsevier/North Holland; 1979. p. 385-9.
115. Marasovic I, Pucher-Petkovic T. Effects of eutrophication on the coastal phytoplankton community. *Rapp Comm Int Mer Médit* 1985;29:137-9.
116. Marasovic I, Pucher-Petkovic T, Alegria-Hernandez V. Phytoplankton productivity of the Adriatic Sea in relation to pelagic fisheries. *Biljeske-Notes Inst Oceanogr Fish* 1988; 72:1-8.
117. Nakajima M. Studies on the sources of shellfish poison in Lake Hamana. IV. Identification and collection of the noxious dinoflagellates. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1968;34:130-1.
118. Tangen K. Brown water in the Oslo Fjord, Norway, in September 1979, caused by the toxic *Prorocentrum minimum* and other dinoflagellates. *Blyttia* 1980;38:145-58.
119. Yasumoto T, Nakajima I, Bagnis R, Adachi R. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of Ciguatera. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1977;43:1021-6.
120. Miyahara JT, Akau CK, Yasumoto T. Effects of ciguatoxin and maitotoxin on the isolated guinea pig atria. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;25:177-80.
121. Rayner MD. Mode of action of ciguatoxin. *Fed Proc* 1972;31: 1139-45.
122. Bagnis R. Ciguatera Fish Poisoning. In: Falconer IR (Ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press; 1993. p. 105-16.
123. Anderson DM, Keafer BA. Dinoflagellate cyst dynamics in coastal and estuarine waters. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (Ed.). *Toxic dinoflagellates*. New York: Elsevier; 1985. p. 219-24.
124. Hallegraef GM. Transport of toxic dinoflagellate via ship's ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar Ecol Prog Ser* 1998;168:297-309.

*Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorsa GUIDUCCI*

## Incidenti nelle aree di balneazione

Marco GIUSTINI (a), Paola ADE (b), Franco TAGGI (a) e Enzo FUNARI (b)

(a) *Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica*; (b) *Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - Molti paesi non raccolgono sistematicamente i dati statistici sugli incidenti nelle acque di balneazione associate ad attività ricreative. Tuttavia, gli annegamenti, i quasi annegamenti, i traumi cranici e le lesioni alla colonna vertebrale sono cause importanti di mortalità e morbilità in tutto il mondo. In Italia, i dati statistici disponibili, limitati agli annegamenti, mostrano che tra il 1969 e il 1997 la mortalità è scesa da circa 1200 a circa 500/anno e il tasso di mortalità da 21 a 7,5 morti per milione di residenti/anno. La mortalità per annegamento è più alta nei maschi che nelle femmine, ma nel periodo esaminato si è dimezzata in entrambi i sessi. Dal 1969 al 1997, i tassi di mortalità sono diminuiti considerevolmente in tutte le fasce di età, ma particolarmente in quella dei giovani. L'analisi di questi dati indica che alcuni fattori generali hanno svolto un importante ruolo, come una migliore educazione, informazione e abilità natatoria, una più attenta sorveglianza da parte dei genitori, una maggiore sicurezza nelle spiagge. Una strategia nazionale finalizzata alla prevenzione degli incidenti in aree di balneazione potrebbe fornire risultati ben più importanti di quelli già ottenuti senza alcuna pianificazione.

*Parole chiave:* incidenti, acque di balneazione, annegamenti, quasi annegamenti, lesioni craniche, lesioni alla colonna vertebrale.

**Summary** (*Accidents in recreational waters*). - Several countries fail to systematically collect statistical data on accidents in bathing waters of recreational areas. Yet, drowning, near-drowning, head trauma and spinal chord injuries are important causes of mortality and morbidity throughout the world. In Italy, the available statistical data are circumscribed to drowning, and show that between 1969 and 1997 the mortality dropped from some 1,200 to some 500 cases/year, and its rate from 21 to 7.5 deaths per million resident/year. The mortality for drowning is much higher in males than in females, but in the period examined it halved in both the sexes. From 1969 to 1997, the mortality rates considerably decreased in all the age subgroups, but particularly in that of young people. The analysis of these data indicates that some general factors have played an important role, like a better education and information, a greater surveillance by adults and a better organisation of summer resorts. A national strategy aimed at preventing recreational accidents would provide much better results than those obtained without any planning.

*Key words:* accidents, recreational waters, drowning, near-drowning, head trauma, spinal cord injury.

### Introduzione

E' opinione comune che i decessi e le lesioni gravi associate alle attività ricreative nelle aree di balneazione (annegamenti, quasi annegamenti, lesioni craniche e alla colonna vertebrale) siano in genere da considerare inevitabili fatalità. La riprova è rintracciabile nella normativa comunitaria e nazionale, che in sostanza, non affronta il problema della sicurezza delle spiagge, dell'addestramento del personale, della segnaletica obbligatoria e via dicendo.

Anche il modo di raccogliere i dati statistici rappresenta una cartina di tornasole dell'atteggiamento complessivo verso questo problema. In Italia, ad esempio, non sono disponibili i dati sui traumi cranici e sulle lesioni vertebrali associati alle attività ricreative nonché quelli sui quasi annegamenti.

Questo problema è attualmente all'attenzione della World Health Organization, che si è posta l'obiettivo di ridurre la portata suggerendo le possibili misure di prevenzione primaria e secondaria [1].

Questo lavoro definisce lo stato dell'arte di questa problematica con particolare riferimento alla situazione nazionale.

### Annegamenti e quasi annegamenti

#### *Dati statistici*

Circa due decenni or sono è stato stimato che ogni anno nel mondo morivano per annegamento circa 150 000 persone, con una incidenza diversa da un paese all'altro e massima nelle isole del Giappone ed

in Australia, dove la maggior parte della popolazione vive vicino al mare [2]. Alcuni autori hanno riportato un'incidenza di morti per annegamento (tutte le cause) intorno al 6 per 100 000 [3, 4]

I dati sugli annegamenti non vengono registrati sistematicamente in tutti i paesi. In Europa risulta che le morti per annegamento rappresentano circa il 10% delle 280 000 morti per incidenti [5]. Le statistiche sugli annegamenti, tuttavia, normalmente includono i suicidi, gli incidenti domestici e quelli dovuti a immersioni durante le attività occupazionali e ricreative (sia in acque naturali che in piscine).

In Danimarca, il 2% delle morti per incidenti è stato attribuito agli annegamenti. Secondo le statistiche sulla mortalità in questo paese, tra il 1984 e il 1993, ogni anno 30-60 persone sono annegate accidentalmente, e 100-140 hanno usato l'annegamento come mezzo di suicidio [6].

Nel Regno Unito, è risultato che gli annegamenti lungo la costa (entro 5 miglia dalla riva) rappresentano approssimativamente il 20% dei circa 500 casi di annegamento all'anno [7].

In Norvegia e in Islanda, sono stati riportati tassi di mortalità infantile per annegamento rispettivamente di 2,2 e 2,0/100 000 [8, 9].

In Australia, l'annegamento rappresenta la causa principale di morte accidentale nei bambini da 1 a 4 anni [10, 11].

Negli Stati Uniti, sono stati riportati tassi di mortalità annuale per annegamento nella fascia di età compresa tra 0 e 19 anni di 3-5/100 000 [12]; ogni anno viene registrato un numero di bambini che muoiono per annegamento superiore ai 2000 casi. Sulla base di questi dati, l'annegamento risulta al secondo posto tra le cause di morte per incidenti nella popolazione da 0 a 19 anni [13, 14]; in alcuni stati (Arizona, California e Florida) risulta invece al primo posto per i bambini di età compresa tra 0 e 5 anni [12, 15].

I dati statistici riguardanti i casi di quasi annegamento sono ancora più scarsi di quelli sugli annegamenti. E' inoltre probabile che quelli disponibili rappresentino una notevole sottostima della situazione reale.

Alcuni studi indicano che i quasi annegamenti e gli incidenti a seguito di immersione che richiedono ospedalizzazione o trattamenti di emergenza superano in modo significativo il numero dei casi di annegamento [16, 17].

Sulla base delle informazioni disponibili risulta che la possibilità di recupero dai quasi annegamenti è inferiore nei bambini rispetto ai ragazzi e agli adulti; una significativa percentuale degli individui che li ha subito soffre di encefalopatie anossiche, che possono dar luogo a deficit neurologici a lungo termine [4].

Gli studi clinici dei quasi annegamenti mostrano che la prognosi dipende più dall'efficacia del salvataggio e della rianimazione che dalla qualità della successiva cura ospedaliera [3].

#### *Fattori favorenti*

I dati disponibili mostrano che i maschi sono a maggior rischio di annegamento delle femmine [1]. Le ragioni principali di questa diversità sembra che risiedano in un contatto superiore con l'ambiente acquatico (sia per le attività occupazionali che ricreative) da parte dei maschi e in un maggiore consumo di alcol; quest'ultima abitudine comporta da un lato una diminuita capacità di affrontare le difficoltà e dall'altro un atteggiamento di sottovalutazione del pericolo [18-20]. In un'indagine nel Regno Unito, il 20-50% dei casi di annegamento esaminati è risultato associato al consumo di alcol [7].

La mancanza di sorveglianza da parte degli adulti è il principale fattore favorente degli incidenti di annegamento dei bambini [4].

L'annegamento e il quasi annegamento associati all'uso ricreativo dell'acqua possono anche avvenire a seguito di attività che non prevedono il contatto diretto con l'acqua, come per esempio la pesca da imbarcazioni, da scogli, ecc. In particolare, quando queste attività vengono svolte durante i mesi invernali, il freddo rappresenta un ulteriore fattore favorente. Uno studio condotto negli Stati Uniti ha mostrato che, degli 874 casi di annegamento esaminati, 299 (34%) sono avvenuti in acque classificate molto fredde [21].

La mancanza di giubbotto-salvagente è spesso citata come importante fattore favorente, a seguito di immersioni involontarie da imbarcazioni [3].

Gli stessi tentativi di salvataggio da parte di persone non addestrate rappresentano un notevole fattore favorente l'annegamento per chi li effettua [22].

La capacità di nuotare ha ovviamente una notevole importanza negli episodi di annegamento. E' stato infatti osservato che una notevole percentuale di annegamenti riguarda individui non capaci di nuotare [16]. Tuttavia, i nuotatori rappresentano la categoria di popolazione a maggiore contatto con l'acqua, quindi maggiormente esposta ai rischi di annegamento in caso di malesseri gravi nel corso delle attività di balneazione [16].

Altri documentati fattori favorenti sono la profondità e la torbidità dell'acqua, che rendono difficoltosi i tentativi di salvataggio [4].

La disponibilità di unità di rianimazione cardiopolmonari e la presenza di persone in grado di effettuare efficacemente le operazioni di salvataggio hanno una grandissima influenza sugli esiti degli annegamenti accidentali [22].

### Lesioni alla colonna vertebrale e trauma cranico

I casi di lesione alla colonna vertebrale e di trauma cranico a seguito di incidenti associati ad attività ricreative non vengono in genere registrati. Negli Stati Uniti è stata stimata una prevalenza totale di lesioni alla colonna vertebrale di circa 906 per milione con un tasso d'incidenza annuale intorno a 30 nuovi casi per milione di persone a rischio [23].

In uno studio è risultato che 212 dei 2587 casi di lesioni alla colonna vertebrale esaminati erano causati da attività sportive e incidenti associati a tuffi [24].

In altri due studi, gli incidenti associati ai tuffi sono risultati responsabili rispettivamente del 3,8-14% e del 2,3-21% delle lesioni traumatiche alla colonna vertebrale nei paesi considerati [25, 26].

Negli Stati Uniti, le attività ricreative e sportive sono risultate al quarto posto tra le cause di lesione alla colonna vertebrale [27], e i maschi di età compresa tra i 15 e i 40 anni sono risultati la fascia di popolazione a maggior rischio.

Negli incidenti associati ai tuffi, le lesioni sono quasi esclusivamente a carico delle vertebre cervicali e le conseguenze tipiche sono la quadriplegia o, meno comunemente, la paraplegia [26]. I soggetti principalmente colpiti sono i maschi di età inferiore ai 25 anni [26].

Questi incidenti rappresentano un grave problema di salute pubblica, anche in termini di costi sociali, perché pochissime delle persone che li hanno subito tornano ad un impiego [27].

#### *Fattori favorenti*

Lesioni alla colonna vertebrale e trauma cranico sono generalmente associati ai tuffi. I dati degli Stati Uniti suggeriscono che la causa comune delle lesioni alla colonna vertebrale è rappresentata dall'urto sul fondo a seguito dei tuffi in acque basse; soltanto il 10% di queste lesioni è causato da tuffi da piattaforme, alberi e altre strutture [26, 28].

La profondità è dunque uno dei principali fattori favorenti e la profondità minima per rendere sicuri i tuffi è molto superiore a quanto viene normalmente percepito.

Il rischio aumenta con la torbidità dell'acqua, che impedisce di valutarne la profondità e con il tipo di fondale [26].

Il consumo di alcol contribuisce significativamente al verificarsi di questi incidenti a causa della diminuita consapevolezza del pericolo e della capacità di elaborare le informazioni [26].

Anche il possesso di adeguate capacità tecniche svolge un ruolo importante in questo tipo di incidenti; persone non esperte rispetto a quelle con maggiore abilità hanno bisogno di acque più profonde per effettuare tuffi sicuri [26].

L'educazione finalizzata ad un'adeguata consapevolezza dei pericoli associati ai tuffi è molto importante e, in considerazione del fatto che gli incidenti di lesioni alla colonna vertebrale riguardano soprattutto la fascia dei giovani, è particolarmente importante che tale educazione venga impartita nei primi anni di scuola.

Nella maggior parte dei casi, questi incidenti possono essere prevenuti. Ad esempio in Ontario (Canada), dove nel 1989 gli incidenti in acqua risultavano essere la causa principale di traumi gravi, un'ampia campagna di prevenzione ed educazione ha permesso di ridurre l'incidenza in modo molto significativo [29].

### La situazione in Italia

In Italia, i dati disponibili riguardano soltanto le morti per annegamento, più precisamente quelle codificate per la causa esterna secondo la classificazione ICD-IX con il codice E910. Non vengono raccolti dati sui quasi annegamenti e sui traumi cranici e lesioni alla colonna vertebrale associati ad attività ricreative.

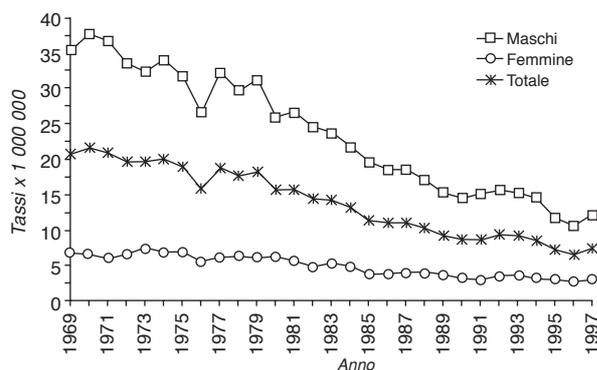
Vi sono poi ulteriori codici, compresi tra le cause E830-E838, che si riferiscono alla mortalità secondaria ad incidenti occorsi a mezzi di trasporto per acqua, nei quali è possibile individuare un ulteriore numero di decessi per annegamento. Tuttavia, questi casi non sono stati presi in considerazione in questo lavoro.

I dati sulla mortalità per annegamento non forniscono informazioni riguardanti la tipologia dei corpi idrici nei quali si sono verificati gli incidenti (acque controllate, acque libere, laghi, fiumi, acque marine, piscine, ecc). Tuttavia questi dati sono utilissimi per una serie di considerazioni.

Complessivamente, in Italia, dal 1969 al 1997 sono morte per questa causa 24 482 persone di cui 20 062 maschi e 4420 femmine.

Nel periodo considerato, gli annegamenti sono passati da 1200-1300 casi/anno nel 1969 a circa 500 casi/anno del 1997. Espresso in termini di tassi, ovvero in termini di numero di annegamenti rapportato alla popolazione che ha generato questi eventi, si è passati da circa 21 a circa 7,5 morti ogni milione di residenti/anno, con una diminuzione percentuale intorno al 65% (Fig. 1). Questo calo appare leggermente maggiore per i maschi rispetto alle femmine dal momento che nei primi si è passati da circa 35 a circa 12,5 decessi per milione di residenti/anno (-65,5%), mentre nelle femmine si è passati da circa 7 a quasi 3 decessi per milione di residenti/anno (-59,1%).

In termini percentuali, mentre nel 1969 1 decesso su 4 (25%) riguardava la fascia di età inferiore a 14 anni, nel 1997 tale percentuale scendeva a meno del 10%.



**Fig. 1.** - Mortalità per annegamento in Italia (periodo 1969-1997).

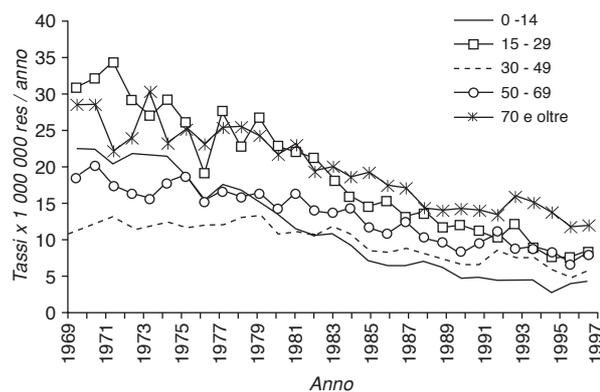
Come avremo modo di osservare in seguito percentualmente il contributo che ogni altra classe di età fornisce alla mortalità per annegamento tende ad aumentare, mentre in termini di tassi il fenomeno si presenta in forte calo in ogni classe di età (Fig. 2), con un trend che mette in evidenza come il calo sia progressivamente più marcato verso le classi di età più giovani (Fig. 3).

Sulla base dei dati disponibili in Italia sui decessi per annegamento, sembrano possibili i seguenti commenti.

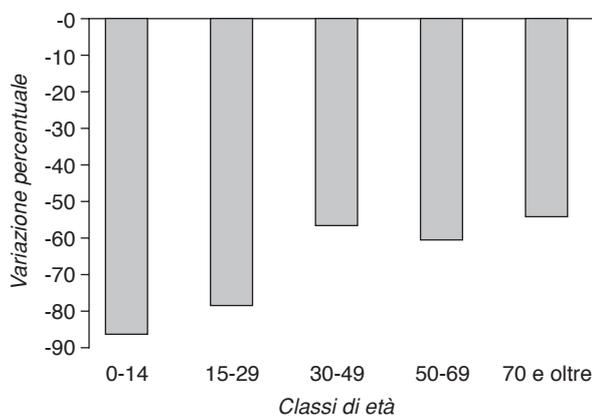
Come si può osservare dalla Fig. 1, le morti per annegamento nei maschi sono nettamente superiori a quelle delle femmine, con un rapporto mediano di mortalità tra maschi e femmine intorno a 4,5. Dal 1969 al 1997 le morti risultano più che dimezzate sia nei maschi che nelle femmine. Sembra dunque che agiscano in entrambi i casi fattori generali. Tra questi sembra di facile individuazione l'accresciuto ruolo dell'educazione da parte della scuola e della famiglia e dell'informazione da parte dei mezzi di comunicazione in riferimento ai rischi associati alla balneazione. Sono dunque cambiati in una parte importante della popolazione i comportamenti che favorivano questi incidenti, quali fare il bagno dopo i pasti, dopo lunghi periodi d'insolazione; allontanarsi troppo dalla riva, effettuare lunghe nuotate in condizioni di non adeguato benessere, ecc. Ovviamente, ha senz'altro influito la maggiore abilità natatoria da parte dei giovani, acquisita nei corsi di nuoto in piscina su vasta scala dalle ultime generazioni. Le ragioni dell'elevato rapporto di mortalità potrebbero essere ricercate tra quelle già citate: i maschi sono in generale più a contatto con l'ambiente acquatico (sia per attività occupazionali che ricreative) e consumano più alcol. Si potrebbe inoltre attribuire ai maschi un atteggiamento di spavalderia che determina una sottovalutazione del pericolo. Va tuttavia osservato come la riduzione relativa di mortalità per annegamento sia più pronunciata nei

maschi rispetto alle femmine. Questa differenza può essere ascritta a cambiamenti comportamentali di una percentuale significativa di giovani maschi, in parte mutuati da quelli tipicamente femminili ma più in generale dovuti ad un diverso modo di fruire delle condizioni offerte dalle spiagge (cambiamenti nell'organizzazione delle attività ricreative ad esempio nelle spiagge attrezzate). Può anche aver influito una maggiore esigenza di qualità estetica dei corpi idrici, che se non adeguata scoraggia le attività di balneazione.

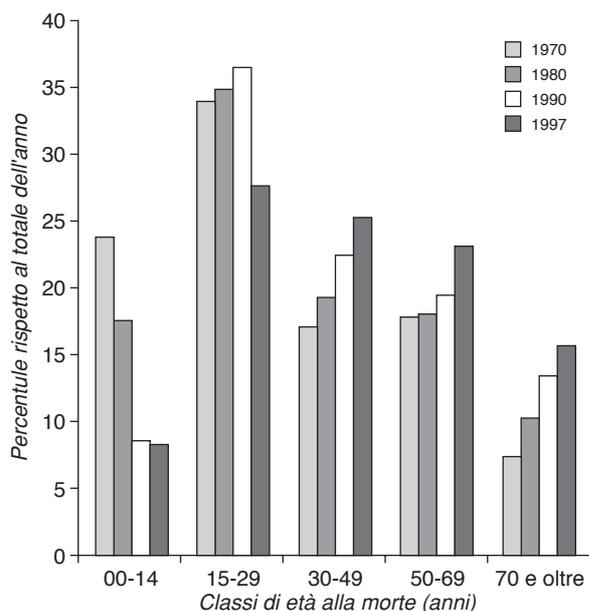
I dati di mortalità espressi come percentuali, mostrati nelle Fig. 4 e 5, permettono innanzitutto di osservare che la distribuzione per classi di età è molto diversa nei maschi rispetto alle femmine. In particolare, la fascia d'età di 15-29 anni dei maschi arriva a valori percentuali molto alti, sia rispetto alle altre fasce di età dei maschi, sia rispetto all'analoga classe di età delle femmine. Questa particolarità sembra possa essere ascritta in particolare al permanere in una certa misura di due fattori di rischio sopra citati per la popolazione maschile: una



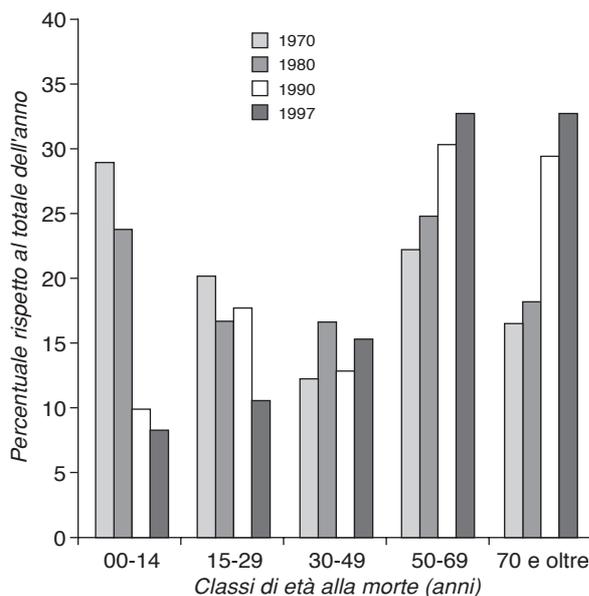
**Fig. 2.** - Mortalità per annegamento secondo le fasce d'età (tassi grezzi, Italia, 1969-1997).



**Fig. 3.** - Mortalità per annegamento: variazione relativa dei tassi di mortalità età specifici dal 1969 al 1997.



**Fig. 4.** - Distribuzione percentuale per età dei casi di annegamento registrati in Italia negli anni 1970,1980, 1990 e 1997 (maschi).



**Fig. 5.** - Distribuzione percentuale per età dei casi di annegamento registrati in Italia negli anni 1970,1980, 1990 e 1997 (femmine).

maggiore esposizione e una maggiore attitudine ad un comportamento più a rischio. Le percentuali attuali di annegamenti nelle donne oltre i cinquanta anni risultano aumentate in termini sostanziali.

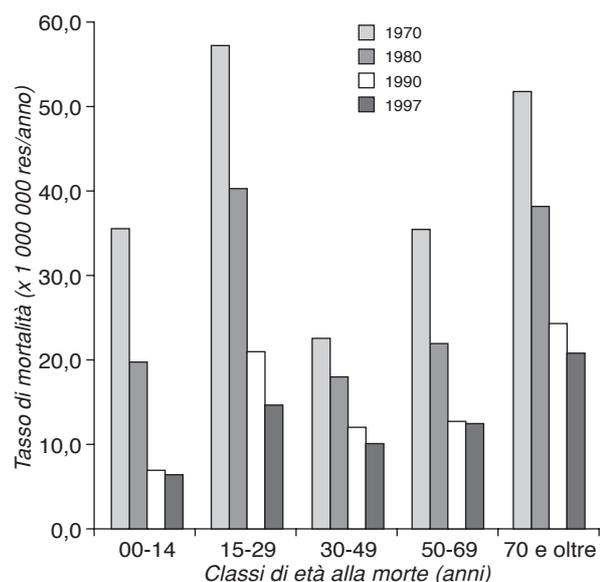
I dati delle Fig. 6 e 7 espressi come tassi di mortalità ci rassicurano rispetto a quanto appena osservato. Anche nelle donne più anziane si è verificata una diminuzione dei tassi di mortalità. La diminuzione più marcata riguarda la fascia di età di 0-14

anni, sia nei maschi che nelle femmine. Questo calo fa pensare in particolare ad una maggiore sorveglianza da parte dei genitori, nell'organizzazione delle spiagge, ad una scelta di luoghi più sicuri (ad esempio, le piscine), ad un'accresciuta abilità natatoria.

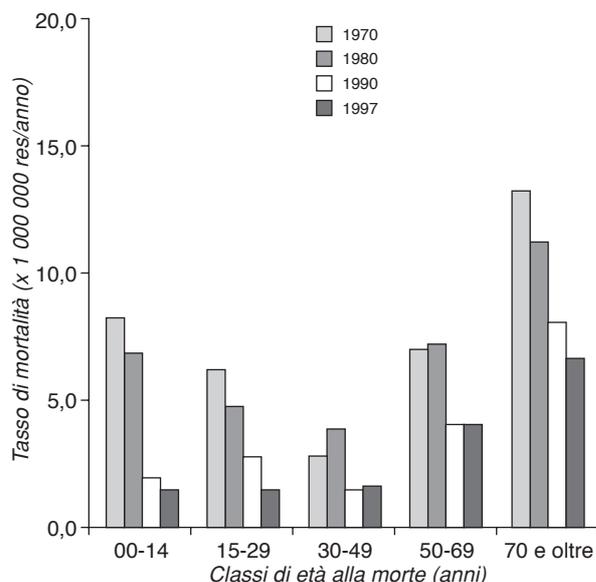
In termini di valori assoluti, attualmente in Italia la mortalità per annegamento appare un fenomeno distribuito piuttosto uniformemente in tutte le fasce di età: circa la metà delle morti per annegamento riguarda soggetti al di sopra dei 40 anni, mentre le morti sotto i 20 e sopra i 65 anni sono circa il 25% del totale.

Se paragonati ad altre cause di morte di eziologia chiaramente di matrice comportamentale, va rimarcato il fatto che i decessi per annegamento rappresentano un fenomeno che si manifesta assai precocemente anche al di sotto dei 14 anni di età.

L'analisi della mortalità per provincia di decesso indica che la presenza di uno sbocco al mare abbastanza sorprendentemente gioca un ruolo non di grande importanza nella genesi di questi decessi, in quanto se è vero che alcune zone a vocazione tipicamente marittima presentano un elevato numero di decessi per annegamento, è altrettanto vero che fra le province che hanno versato un elevato tributo in termini di morti ve ne sono molte che hanno sul proprio territorio unicamente laghi e fiumi. Ciò deve far riflettere sulla particolare pericolosità di questi corpi idrici nei quali, oltretutto, l'attuazione di misure di prevenzione risulta spesso logisticamente più difficile.



**Fig. 6.** - Mortalità per annegamento registrata nelle diverse classi d'età in Italia negli anni 1970, 1980, 1990 e 1997 (maschi).



**Fig. 7.** - Mortalità per annegamento registrata nelle diverse classi d'età in Italia negli anni 1970, 1980, 1990 e 1997 (femmine).

### Proposte operative per il contenimento del rischio di incidenti e delle sue conseguenze in aree di balneazione

#### *Sistema di raccolta dei dati*

*Annegamenti.* - Come sopra rilevato, si dovrebbero raccogliere informazioni riguardanti la tipologia del corpo idrico dove è avvenuto l'incidente (fiume, lago, mare, piscina, spiaggia controllata, ecc.), la causa (ambientale: correnti, acqua fredda, ecc.; soggettiva: malessere o patologia), l'attività ricreativa svolta (attività subacquea, nuoto in superficie, pesca da imbarcazioni, dalla spiaggia, da scogli, ecc).

*Quasi annegamenti, lesioni craniche e alla colonna vertebrale.* - Dovrebbero essere raccolti i dati riguardanti questi incidenti, le modalità degli stessi, le diagnosi, le prognosi.

#### *Educazione e informazione*

*Ruolo delle scuole.* - Le scuole devono svolgere un ruolo centrale nell'educazione dei giovani, anche nei confronti dei pericoli che si possono incontrare in aree di balneazione. Questa attività non può essere lasciata all'iniziativa più o meno isolata di docenti motivati. Bisognerebbe occuparsene in modo più organico e professionalmente adeguato. Si dovrebbero ad esempio, studiare i messaggi che possono essere efficientemente percepiti dai giovani nelle diverse età (i più piccoli vanno messi al corrente del pericolo al quale possono

andare incontro se si allontanano in acqua senza la sorveglianza dei genitori, i più grandi possono cominciare ad essere educati sui comportamenti) e attraverso quali mezzi (film, dibattiti, documentari, ecc.). L'educazione in età scolare risulta essere particolarmente efficace nella prevenzione degli incidenti dovuti ai tuffi, anche perché i bagnanti sembrano prestare scarsa attenzione ai segnali di avvertimento e ai regolamenti [30]. Come precedentemente menzionato, in alcuni paesi i programmi di prevenzione hanno ridotto notevolmente l'incidenza di lesioni alla colonna vertebrale dovute a tuffi.

*Ruolo dei mezzi d'informazione.* - Dovrebbero svolgere un ruolo molto importante nel fornire le informazioni necessarie per la prevenzione e per il primo soccorso (decalogo per la sicurezza dei cittadini, da preparare da parte di tecnici).

#### *Normativa*

La normativa dovrebbe definire:

- i comportamenti vietati nelle spiagge almeno ai minori (tuffi in aree pericolose, bagni in aree e condizioni avverse);

- l'organizzazione minima della sorveglianza nelle spiagge (inclusa la cartellonistica con le informazioni generali e dei pericoli specifici della spiaggia).

- l'organizzazione di un sistema di pronto intervento nel territorio (tratti di costa, di fiume, ecc.), che come sopra menzionato dovrebbe essere organizzato dalle regioni interessate. Ogni regione interessata dovrebbe istituire una struttura del SSN con il compito specifico di seguire questa problematica, sia in termini di rilevazione dei dati e delle informazioni sia della predisposizione di misure di prevenzione e di primo intervento.

In relazione alle attività di sorveglianza, è opportuno rilevare il ruolo particolarmente importante del personale della spiaggia, che dovrà essere qualificato ed addestrato. Per questo personale dovranno essere organizzati periodicamente corsi di aggiornamento.

Il personale sorvegliante dovrebbe avere a disposizione una torre di avvistamento, l'equipaggiamento per il salvataggio, una cassetta di primo soccorso, telefono o radio.

La delimitazione, nell'area di balneazione, di singole zone destinate ad usi diversi incompatibili tra loro può essere un modo per evitare alcuni dei più comuni incidenti; in genere le attività non natatorie, come la navigazione, il surf e lo sci acquatico, non devono essere svolte nelle zone frequentate dai bagnanti. A questo scopo dovrebbero essere usati cordoni galleggianti. Questi ultimi possono anche servire a delimitare zone particolarmente pericolose per i bagnanti (per la profondità del fondale, le correnti, ecc.).

### Conclusioni e raccomandazioni

Gli annegamenti, i quasi annegamenti e le lesioni alla colonna vertebrale rappresentano eventi molto gravi. Moltissimi casi riguardano la fascia di popolazione più giovane, con la più lunga attesa di vita. La perdita della vita di un giovane, le gravi menomazioni che sono conseguenza di molti quasi annegamenti e delle lesioni alla colonna vertebrale rappresentano motivo di gravi sofferenze e comportano elevati costi sociali.

La consapevolezza che molti dei fattori di rischio sono noti sollecita un loro controllo attraverso l'elaborazione e l'attuazione di programmi nazionali e locali di prevenzione.

I programmi di prevenzione potranno essere resi più efficaci man mano che aumentano le conoscenze su questi fenomeni, le cause e i fattori che li determinano. A questo scopo è necessario raccogliere in tutto il territorio nazionale i dati e le informazioni sugli annegamenti, sui quasi annegamenti e sui traumi associati ai tuffi.

I dati disponibili permettono di osservare una netta tendenza alla diminuzione della mortalità per annegamento. Ciò dimostra che è un luogo comune privo di fondamento quello secondo il quale questi incidenti sarebbero dovuti ad inevitabili fatalità. E' importante incidere sui fattori sopra individuati, che stanno agendo anche senza che sia stata definita un'adeguata strategia di intervento. Una normativa adeguata, mirata a pochi interventi, potrebbe permettere di ottenere risultati indubbiamente migliori.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

### BIBLIOGRAFIA

- World Health Organization. *Guidelines for safe recreational water environments: coastal and fresh-waters. Draft for consultation*. Geneva: WHO; 1988. 206 p.
- Miles S. How not to drown. *The Practitioner* 1979;222:511-3.
- Plueckhahn VD. Drowning: community aspects. *Med J Aust* 1979;2:226-8.
- Quan L, Gore EJ, Wentz K, Allen J, Novack AH. Ten year study of pediatric drownings and near drownings in King County, Washington: lessons in injury prevention. *Pediatrics* 1989;83:1035-40.
- World Health Organization. *World Health Statistics Annual 1995*. Geneva: WHO; 1996.
- Steensberg J. Epidemiology of accidental drowning in Denmark 1989-1993. *Accid Anal Prev* 1998;30:755-62.
- Rouse A. Recreational drowning deaths in the South West of England. *West Engl Med J* 1991;106:65-6.
- Skulberg A. *Drukning (dissertation) (mimeographed)*. Oslo: University of Oslo; 1987.
- Ludvigsson P, Storgaard H, Gudmundsdottir GB. Study on child drowning in Iceland 1984-1993. In: *Book of Abstracts, third international conference injury prevention and control*. Melbourne, Australia: febbraio 1996. 152 p.
- Smith GS. Drowning prevention in children: the need for new strategies. *Injury Prev* 1995;1:216-7.
- Pitt WR. The Australian experience with swimming pool fencing legislation. In: *Book of Abstracts, third international conference injury prevention and control*. Melbourne, Australia: febbraio 1996. 43 p.
- Division of Injury Control. Center for Environmental Health and Injury Control, Centers for Disease Control. Childhood injuries in the United States. *Am J Dis Child* 1990;144:627-46.
- Centers for Disease Control. Fatal injuries to children - United States, 1986. *MMWR* 1990;39:443-51.
- National Safety Council. *Accident facts*. Itasca, IL: National Safety Council; 1992.
- Wintemute GJ Childhood drowning and near-drowning in the United States. *Am J Dis Child* 1990; 144:663-9.
- Spyker DA. Submersion injury: epidemiology, prevention and management. *Ped Clin N Am* 1985;32:113-25.
- Liller KD, Kent EB, Arcari C, MacDermott RJ. Risk factors for drowning and near-drowning among children in Hillsborough County, Florida. *Public Health Rep* 1993;108:346-53.
- Plueckhahn VD. Alcohol and accidental drowning: a 25 year study. *Med J Aust* 1984; 141:22-5.
- Dietz PE, Baker SP. Drowning. Epidemiology and prevention. *Am J Public Health* 1994;64:303-12.
- Howland J, Hingson R, Mangione TW, Bell N, Bak S. Why are most drowning victims men? Sex differences in aquatic skills and behaviors. *Am J Public Health* 1996;86:93-6.
- Press E. An interstate drowning study. *Am J Public Health* 1969; 58:2275-89.
- Patetta MJ, Biddinger PW. Characteristics of drowning death in North Carolina. *Public Health Rep* 1988;103:406-11.
- Stover MD, Fine PR. The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia* 1987;25:225-8.
- Steinbruck K, Paeslack V. Analysis of 139 spinal cord injuries due to accidents in water sports. *Paraplegia* 1980;18:86-93.
- Minaire P, Castanier M, Girard R, Berard E, Dedier C, Bourret J. Epidemiology of spinal cord injury in the Rhone Alpes Region, France, 1970-1975. *Paraplegia* 1979;16:76-87.
- Blanksby BA, Wearne FK, Elliot BC, Blitvich JD. Aetiology of occurrence of diving injuries: a review of diving safety. *Sports Med* 1997;23:228-46.
- Stover SL, Fine PR (Ed.). *Spinal cord injuries: the facts and figures*. Birmingham, AL: The University of Alabama at Birmingham; 1986.
- Branche CM, Sniezek JE, Sattin RW. Water recreation-related spinal injuries: risk factors in natural bodies of water. *Accid Anal Prev* 1991;23(1):13-7.

29. Tabor CH, Edmonds VE, Lapeczak L. *Ontario catastrophic sports recreational injuries survey*. Rolling Meadows (IL) July 1 1991 - July 30 1992. Toronto: Thinkfirst Canada; 1993.
30. Hill V. History of diving accidents. In: *Proceedings of the New South Wales Symposium on Water Safety*. Sidney (New South Wales): Department of Sport and Recreation; 1984. p. 28-33.

*Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorsa GUIDUCCI*

## Le mucillagini nel Mar Adriatico: ruolo dei possibili agenti causali e dei fattori ambientali

Maura MANGANELLI (a) e Enzo FUNARI (b)

(a) Istituto Superiore di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro, Monteporzio Catone, Roma

(b) Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Il fenomeno delle mucillagini è rappresentato dalla comparsa sporadica di materiale gelatinoso sospeso nell'acqua marina o galleggiante in superficie. Nell'Adriatico centro-settentrionale, questo fenomeno si è verificato nell'ultimo ventennio con frequenza ed estensioni del tutto particolari, causando notevoli danni ecologici, con pesanti ripercussioni sull'economia. Dopo una sintesi aggiornata delle attuali conoscenze e la rassegna delle principali ipotesi, che considerano di volta in volta gli organismi produttori, le caratteristiche idrodinamiche del bacino Nord Adriatico, la concentrazione dei nutrienti, viene presentata la recente teoria proposta da Azam *et al.* che inquadra la formazione della mucillagine all'interno delle complesse interazioni fra gli organismi del *microbial loop* e il pool di sostanza organica. Da questa prospettiva, vengono indicate future linee di ricerca necessarie alla comprensione del fenomeno.

*Parole chiave:* mucillagini, essudati, microbial loop.

**Summary** (*Mucilage in Adriatic Sea: role of possible causal agents and environmental factors*). -The massive accumulation of gelatinous material at and below the seawater surface occurred in Northern Adriatic, at a frequency and with such an extension to cause serious environmental and economic damages. The present review describes the updated knowledge and considers the main hypotheses on mucilage formation. They focus, in turn, on organisms that produce mucilage, on the particular hydrodynamic of the North Adriatic basin, on the role of nutrients, but the trigger mechanism has not yet been really understood. Finally, the theoretical framework recently proposed by Azam *et al.* is presented. In the organic matter *continuum* view, organisms of the microbial loop just represent a part of the whole picture from which specific mechanisms of interactions are examined and few important pathways are outlined for future research.

*Key words:* mucilage, exudates, microbial loop.

### Introduzione

Il fenomeno delle mucillagini è rappresentato dalla comparsa di materiale gelatinoso sospeso nell'acqua marina o galleggiante in superficie. Questo materiale viene trasportato orizzontalmente dalle correnti ed è soggetto a movimenti verticali dovuti ai cambiamenti di temperatura dell'acqua.

La formazione di mucillagini è stata osservata nelle aree costiere greche, dalmate, del Tirreno e della Sicilia [1]. Nell'Adriatico centro-settentrionale, dove è noto fin dal 18° secolo [2], questo fenomeno assume tuttavia dimensioni del tutto particolari, ed è caratterizzato talvolta da quantità enormi di ammassi mucilluginosi. Ha raggiunto la massima intensità nelle estati del 1988, 1989 e 1991. Nel 1989 il materiale mucilluginoso interessò una superficie di mare di 9000 km<sup>2</sup>, raggiungendo anche le aree costiere [3].

Si è ripresentato nelle estati del 1997, del 2000 e, in misura ridotta, del 2001.

Il fenomeno della formazione massiva di mucillagini nell'Adriatico centro-settentrionale ha avuto notevoli ripercussioni sulle attività turistiche; inoltre ha avuto ripercussioni fortemente negative sulle attività di pesca ed ha causato anche seri danni ecologici, soprattutto nei confronti degli organismi bentonici, a causa delle estese condizioni di ipossia determinatesi a seguito della copertura del fondo o per il consumo di ossigeno durante la decomposizione del materiale mucilluginoso.

Numerosi sono i gruppi italiani e internazionali impegnati in attività di ricerca su questo fenomeno, che è stato anche oggetto di due workshop internazionali, a Cesenatico nel 1992 e a Trieste nel 1997 [4, 5]. Sfortunatamente le fasi operative di un importante programma di ricerca nazionale e ben tre

progetti europei si sono svolte nel periodo in cui il fenomeno non si è verificato, nei primi anni del 1990.

Attualmente diversi gruppi di ricerca sono impegnati in un progetto nazionale sulle mucillagini nel Mar Adriatico e nel Mar Tirreno (ICRAM, progetto MAT) e in un progetto internazionale (in ambito GOOS), attraverso una cooperazione con il National Science Foundation e i paesi europei che si affacciano sul mar adriatico (Croazia, Slovenia).

In questo articolo vengono presentate le attuali conoscenze sul fenomeno delle mucillagini e le principali ipotesi scientifiche formulate.

### Fenomeni di mucillagine in mari diversi

Fenomeni rilevanti di comparsa di aggregati gelatinosi macroscopici sono stati osservati nel Mare del Nord, in diverse parti del Mediterraneo, nel Canale della Manica.

Nel Mare del Nord, ogni primavera, in giorni particolarmente ventosi, compare, lungo le coste, un impressionante strato di schiuma marroncina e appiccicosa, prodotta da fioriture di *Phaeocystis* sp. Lancelot [6] descrive estesamente questi eventi e la particolare ecologia di queste alghe. La successione del bloom di *Phaeocystis* procede rapidamente da colonie piccole sferiche, a colonie molto più grandi, non più controllate dalla predazione del mesozooplankton. La matrice mucillaginosa che avvolge le cellule nella fase coloniale, che genera la schiuma che compare sulle spiagge, è formata dalla condensazione di catene polisaccaridiche carbossilate e sulfonate, promossa da ponti di calcio e magnesio. Il 90% di questi polisaccaridi poveri di nutrienti è costituito da polimeri di glucosio. La produzione di questa matrice mucillaginosa sembra importante sia come riserva energetica che per la possibilità di raccogliere e concentrare nutrienti presenti in concentrazioni molto basse ed elementi in traccia (manganese). Inoltre la matrice idratata ha una funzione importante per il galleggiamento, avendo una densità simile a quella del mezzo. Le fioriture di notevole entità sono favorite dall'aumento di nitrati, che *Phaeocystis*, contrariamente alle altre specie algali, può utilizzare come fonte di azoto. L'aumentata efficienza degli impianti di trattamento dei reflui sarebbe la causa di questo squilibrio nutritivo e, paradossalmente, la causa ultima delle mucillagini [6].

La concentrazione relativa dei monomeri che compongono i polisaccaridi, diversa da ceppo a ceppo, conferisce caratteristiche di degradabilità diversa al muco prodotto [7]. In generale, la degradabilità sembra alta ed è legata a fattori come la disponibilità di nutrienti, la presenza di agenti inibitori, e la composizione della comunità batterica [8].

Nel Canale della Manica, i fenomeni di mucillagine che si sono verificati sono stati ricondotti alle abbondanti fioriture di una diatomea introdotta (*Coscinodiscus wailesii*), che ha trovato delle condizioni ambientali particolarmente favorevoli. Le cellule rilasciano una sostanza mucillaginosa che, durante la precipitazione sul fondo, raccoglie e ingloba dall'acqua circostante scheletri insolubili di altri organismi planctonici e particelle minerali, aumentando il proprio volume e la propria densità. La copertura del fondo da parte di questo muco grigiastro ha causato importanti danni alla pesca, ostruendo o rompendo le reti da strascico [9]. Nel 1987 questa specie di diatomea era ancora presente nelle acque inglesi e rappresentava addirittura una delle specie maggiori della comunità invernale di fitoplancton [10].

Anche in diverse aree del Tirreno nel 1991 sono state avvistate grandi quantità di mucillagine. La descrizione del fenomeno e le possibili cause sono state descritte da Innamorati [11]. Nonostante la carenza di dati temporali sistematici, sembra che questo fenomeno, pur con estensioni molto ridotte rispetto al 1991, sia conosciuto da molto tempo nel Tirreno. Sono stati descritti due tipi di mucillagini, caratterizzati da dislocazione e comunità microbiche diverse. Il primo tipo, bentonico, sembra caratterizzato dalla presenza di alghe filamentose coloniali (*Tribonema marinum* e *Acinetospora crinita*), che non sono mai state trovate in Adriatico; il secondo tipo, pelagico, presenta una comunità microbica poco ricca, caratterizzata dalla presenza delle diatomee *Nitzschia* sp.

Vari elementi fanno pensare che il muco sia prodotto dagli organismi trovati al suo interno. La biocenosi all'interno dei fiocchi di mucillagine è diversa da quella dell'acqua circostante. Nel primo caso, è di tipo invernale-primaverile e non varia con il passare delle stagioni, mentre nella colonna d'acqua si osserva l'usuale successione di specie, molto differenti fra una stagione e l'altra. Il muco rappresenta un microhabitat particolare e ospita una concentrazione di cellule fino a tre ordini di grandezza superiore rispetto all'acqua circostante. Tramite autoradiografia, è stato osservato che le specie all'interno della matrice mucillaginosa producono il muco stesso che le avvolge. In coincidenza del fenomeno di mucillagine, è stato osservato un elevato rapporto N/P, che indica una ridotta concentrazione di fosforo, contrariamente ai valori che caratterizzano solitamente il mar Tirreno. Poiché all'aumentare di tale rapporto alcune specie di fitoplancton in coltura aumentano la produzione di essudati [12, 13], si ritiene che questa sia una condizione necessaria, anche se non sufficiente, perché si formino le mucillagini nel Tirreno [11]. La temperatura e la densità non risultano neanche indirettamente correlate con il fenomeno della mucillagine.

In varie zone della Grecia sono stati osservati fenomeni di “mare sporco” [14], ma i dati disponibili non sono sufficienti a trarre alcuna conclusione o a proporre alcun confronto con altri casi.

### Fenomeno di mucillagine in Adriatico

Nel Mar Adriatico, masse di mucillagini consistenti si sono sviluppate nel 1988, 1989, 1991, 1992, 1997, 1998, 2000 e 2001. La prima descrizione sistematica della successione di 5 stadi caratterizzati da “quantità” e “consistenza” diverse delle mucillagini, da piccoli a via via più grandi aggregati marini, fino alla formazione massiva di mucillagini, risale a Stachowitsch [15].

I 5 stadi, individuati durante i fenomeni del 1988 e 1989, sono i seguenti.

#### *Macroflocs*

Sono particelle genericamente definite come “neve marina” o, specificamente in Adriatico, “neve planctonica” [15]. Si tratta di aggregati subsferici, irregolari, biancastri, di diametro in genere inferiore ad 1 cm. Possono essere presenti in qualunque periodo dell'anno ma sono più abbondanti nella tarda primavera/inizio dell'estate. Le più alte densità vengono raggiunte nel periodo più caldo estivo e nei mesi autunnali.

I macroflocchi sono sempre presenti nel Mar Adriatico e non sono direttamente legati al successivo sviluppo di mucillagini. L'analisi degli organismi “inglobati” nei flocchi ha evidenziato, sia negli anni precedenti che in quelli della mucillagine ('88-'89), una comunità eterogenea, dominata in media da diatomee pelagiche, in particolare da *Nitzschia closterium*, *delicatissima* e *seriata*, anche se nel 1986-87 alcuni gruppi di dinoflagellati erano presenti in modo significativo. E' sempre presente una percentuale di flocchi priva di organismi vitali, costituita solo da detrito.

I macroflocchi possono essere trasportati orizzontalmente e verticalmente, accumulano al picnoclino e sedimentano sul fondale.

Passando dalla colonna d'acqua ai sedimenti possono cambiare colore, da quello iniziale biancastro a marrone e infine a grigio scuro. Durante questo processo di “invecchiamento” sembra che diminuiscano le cellule fitoplanctoniche e aumentino batteri e organismi eterotrofi.

#### *Stringers*

Sono aggregati sottili e allungati, che misurano circa 1-25 cm. E' possibile distinguere una forma tipica di comete con testa e coda, che le posiziona nella colonna d'acqua secondo un angolo, con la testa

rivolta verso il basso e la coda diretta verso l'alto nella direzione della corrente. A volte possono trovarsi anche dei filamenti privi della testa. Sono spesso presenti insieme ai macroflocchi e raggiungono le più alte densità in estate e in autunno.

#### *Clouds*

Comprendono un ampio intervallo di grandi aggregati, che nel passato è stato nominato in vari modi: “palle di muco simili a nuvole” e “scie di muco” [15]. Le dimensioni variano da 5-10 cm a 3 m. Possono essere separate o formare una rete continua, galleggiare e risalire. Possono sedimentare in grande quantità, depositandosi come ragnatele su tutte le strutture bentoniche sporgenti, come le foglie delle praterie di piante superiori, spugne, gorgonie, ecc. La sedimentazione di tali nubi, pur non provocando fenomeni di anossia totale sul fondo, ha provocato morie di organismi bentonici sessili o poco mobili, come molluschi, celenterati e crostacei, per soffocamento [16]. Il passaggio da neve marina a stringers e infine a nubi può essere graduale (può durare anche mesi) ma può anche essere molto rapido, come durante il 1991 [16]. Le condizioni meteorologiche e le condizioni del mare regolano la durata dei vari stadi.

#### *Creamy surface layer*

Una volta che la mucillagine ha raggiunto lo stadio di nuvole, può successivamente essere visibile in superficie, formando o una massa di consistenza cremosa, dispersa (*creamy surface layer*) o gelatinosa (*gelatinous surface layer*, vedi par. successivo) con uno spessore anche di 15 cm. Questo tipo di consistenza è in parte dovuto all'inclusione di bollicine gassose. E' chiara, biancastra quando è fresca. Durante l'evento del 1988, una notevole quantità di questo materiale è stato osservato lungo le coste continentali e delle isole, in Croazia e in Italia. Il materiale si accumulava giornalmente lungo le coste con lo stesso meccanismo: lungo la colonna d'acqua si poteva osservare la formazione di mucillagine, dalla tarda mattinata fino a circa mezzogiorno. Questo processo andava avanti finché nel primo pomeriggio si formava il tipico strato “cremoso”. Nel tardo pomeriggio questo strato si trovava lungo le coste, trasportato dai venti dal mare, lasciando pulita e chiara l'acqua sottostante. Queste bande strette, che si accumulavano lungo le coste di giorno, generalmente non erano poi presenti durante la notte [15].

#### *Gelatinous surface layer*

Differisce dalla fase precedente in quanto è costituito da uno strato fermo e gelatinoso. La densa inclusione di bollicine di gas gli conferisce una consistenza

spugnosa. Il materiale è giallastro o marrone piuttosto che biancastro. Può essere costituito di unità che mantengono la loro forma una volta rimosse dall'acqua. Si situa in superficie ma può anche galleggiare. Nel 1989, mucillagini di questo tipo si sono spinte fino ad Ancona, dove sono state infine disgregate dall'azione delle onde verso metà agosto [15].

Anche in questa forma si verifica una periodicità giornaliera di comparsa e scomparsa. Le bollicine incluse nella mucillagine funzionano da idrostatato in funzione della temperatura: le variazioni di temperatura nell'arco delle 24 ore aumentano e riducono il volume delle bollicine, portando al galleggiamento diurno e alla sedimentazione notturna delle nuvole. I gas provengono molto probabilmente dai processi di produzione fitoplanctonica (rilascio di ossigeno) e fermentazione all'interno dei fiocchi [16]. Tale periodicità sembra essere una caratteristica tipica della mucillagine, infatti, un comportamento simile è stato osservato anche durante l'evento del 1991 [16] e del 2001, lungo le coste croate.

Come già accennato precedentemente, nel Tirreno non si osservano questi fenomeni, probabilmente a causa delle differenze strutturali dei due mari. Infatti nelle acque poco profonde del Nord Adriatico, in estate si forma un termoclino molto netto, dovuto ad una stratificazione di acque a salinità e densità diverse, con un grado di miscibilità verticale molto ridotto. La mucillagine si concentra preferenzialmente lungo il termoclino, creando addirittura un falso bentos [15]. Dal termoclino, le bolle all'interno della mucillagine ne causerebbero la risalita come strati uniformi verso la superficie.

Durante la mucillagine del 1997 è stato utilizzato il sistema di rilevamento satellitare, per determinare la distribuzione della mucillagine lungo la colonna d'acqua. Dai dati raccolti, è risultato che la mucillagine si distribuisce lungo un gradiente di densità, quando questa varia di soli due o tre punti [17], come sostenuto in precedenza da Alldredge e Crocker [18]. Tuttavia, i dati disponibili sulle differenze rilevabili fra acqua non interessata dalla mucillagine e strati di mucillagini sono ancora pochi e la variabilità delle proprietà dell'acqua è ancora troppo alta per non nascondere presumibilmente dei dati che si riferiscono a mucillagine piuttosto che ad acqua [17].

#### **Caratterizzazione della mucillagine, organismi produttori di muco**

La struttura molecolare della mucillagine non è ancora stata determinata. D'altra parte, la sostanza organica particolata e disciolta, dalla quale, a seconda delle ipotesi, hanno origine le mucillagini, è stata caratterizzata a livello molecolare solo per circa un

quarto [19, 20]. È noto che circa il 97% della massa gelatinosa è composta di acqua; il resto è una miscela di carboidrati, proteine, acidi grassi, e composti non caratterizzati presenti in percentuali variabili, anche in funzione dell'età dei campioni analizzati.

Campioni di mucillagini del 1991, prelevati a varie profondità di fronte alla costa di Senigallia, presentavano un contenuto di C fra 40 e 10% (peso secco desalinizzato), di N fra 7,6 e 1,1% e P fra 0,50 e 0,12% [21]. Dai rapporti atomici dei vari elementi, normalizzati rispetto al fosforo (C:N:P:Si:S=242:28,2:1:17,9:4,1), la concentrazione di carbonio, silicio e zolfo risultava più elevata rispetto a quanto si osserva in organismi fito- e zooplanctonici [22]. Risultava inoltre un contributo minerale elevato. Il rapporto medio C/N (9,4) è consistente con quelli osservati in neve marina [23]. L'andamento dei rapporti C/N (variabile) e N/P (costante) nei vari campioni, indica che i campioni più vecchi, con un C/N più elevato, contengono più composti organici poveri di azoto e fosforo [21].

L'analisi qualitativa di campioni dello stesso anno (1991) provenienti dall'area est del golfo di Trieste, condotta tramite l'uso di Con-A FITC (lecitina specifica per residui di glucosio e mannosio), ha evidenziato un'elevata componente polisaccaridica, sia all'interno degli organismi inclusi nella matrice (sotto forma di granuli intracellulari: IPS) che nella matrice stessa, in forma di filamenti che si estendevano dalle cellule verso l'esterno (EPS) [24].

In campioni di mucillagine del 1989, prelevati di fronte a Cesenatico, il contenuto in carboidrati totali variava fra 1,0 e 6,9% (peso secco), in funzione della modalità di estrazione della frazione analizzata. La composizione in monosaccaridi (GC-MS dei rispettivi alditoli-acetati) indicava una elevata concentrazione di glucosio (9,7-48,0%), insieme a ramnosio, arabinosio, xilosio, mannosio e galattosio, in concentrazioni più basse [25].

La concentrazione di carboidrati in macroaggregati raccolti nel Golfo di Trieste, 1988-'89, era superiore rispetto ai campioni di Cesenatico, rappresentando il 12-34% della sostanza totale contro il 5% circa presente nella sostanza particolata sospesa [26]; erano composti nell'ordine da glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, fucosio, arabinosio, ribosio e xilosio [27]. L'elevata concentrazione di glucosio (circa il 60%) fa pensare che il grosso della mucillagine fosse composto da materiale di riserva delle diatomee, probabilmente glucano, che è un polimero del glucosio [26]. Concentrazioni simili di carboidrati totali sono state osservate in campioni di varie zone dell'Adriatico e del Tirreno nel 1997, (fra 20,5 e 30,2% in Adriatico e fra 15,5 e 35,5% nel Tirreno). La percentuale di zuccheri semplici neutri è compresa fra il 14,1 e 19,0 in Adriatico e il 7-20,4% in Tirreno [28].

Su alcuni campioni del 1988 è stato analizzato il contenuto in lipidi totali (1,1% peso secco) e in silicio (6,4%) ed è stato determinato il profilo di acidi grassi, utile come bioindicatore [29]. I dati sulla composizione degli acidi grassi, insieme all'osservazione diretta dei campioni, alla concentrazione di clorofilla a, b e c e alla concentrazione di silicio, hanno fatto ritenere che le diatomee planctoniche dominanti nelle fioriture primaverili dello stesso anno potessero essere le principali responsabili del muco analizzato [29].

Recentemente, con tecniche di rivelazione all'infrarosso (IR) e tramite risonanza magnetica nucleare (NMR) è stato analizzato il contenuto in gruppi funzionali di mucillagini provenienti dal Tirreno e dall'Adriatico [28, 30].

L'analisi degli spettri NMR di campioni di mucillagine del 1991 del Golfo di Trieste ha evidenziato la presenza di eteropolisaccaridi, lunghe catene polimetilate e gruppi carbossilici [30]. Diversi autori ritengono che queste catene rappresentino la rete di sostanza refrattaria, che si trova comunemente nei biopolimeri resistenti delle alghe [31, 32], che hanno origine, come i polisaccaridi strutturali, dalle pareti cellulari di alghe fitoplanctoniche. Anche se si tratta di polimeri molto resistenti, la degradazione fotochimica sembra rappresentare un'importante via di degradazione. In esperimenti di laboratorio, infatti, circa il 40% di macroaggregati si degradava in 30 ore di esposizione alla luce [30].

Lo stesso tipo di struttura macromolecolare costituita da carboidrati, acetati e lipidi è stato proposto per il DOM dell'acqua di mare superficiale proveniente da diverse parti del mondo [33], indicando una costanza di composizione e di refrattarietà alla decomposizione.

L'analisi all'infrarosso ha evidenziato una presenza significativa nella mucillagine di carboidrati, proteine, composti contenenti zolfo e composti aromatici [28]. Campioni provenienti dal Tirreno hanno mostrato una concentrazione maggiore di composti con zolfo, presenti probabilmente come zuccheri esteri solfati, come già osservato in altri campioni [34]. La presenza di composti aromatici spiegherebbe le caratteristiche di fluorescenza osservate in precedenza [35]. La somiglianza fra frazioni di proteine, polisaccaridi e fenoli delle mucillagini e sostanze umiche e fulviche del sedimento, e il fatto che la presenza di ioni  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  dà luogo a legami covalenti, suggeriscono che le mucillagini possono classificarsi come composti uminici (lo stadio finale e insolubile dei composti umici) [28].

Nelle mucillagini si trovano intrappolati numerosi organismi (vivi e morti), che costituiscono generalmente comunità diverse da quelle della colonna d'acqua; campioni di mucillagine provenienti da siti diversi, a loro volta, contengono popolamenti differenti. I campioni di mucillagine di Senigallia (1991) con-

tenevano una comunità dominata da *Cylindrotheca closterium*, mentre nella colonna d'acqua si aveva una dominanza di nanoflagellati (60-70%), con presenza di diatomee (10-30%) e dinoflagellate (7-20%) [21]. Nei campioni di Trieste (1991), oltre alla stessa specie dominante, erano presenti in modo significativo anche cianobatteri e batteri eterotrofi [24].

#### *Produzione di essudati da parte delle alghe*

Sono stati fatti molti studi sulla composizione degli essudati algali per confrontarne la composizione con i campioni di mucillagine e individuare le eventuali specie produttrici.

Hama e Yanagi [36], concordemente con Posedel e Faganeli [26], sostengono che gli essudati algali che contengono molto glucosio sono costituiti probabilmente da polisaccaridi e non da monosaccaridi e che il glucosio viene escreto come glucano. Il glucosio rappresenta sempre il principale zucchero dei carboidrati intra e extracellulari, ma normalmente è mantenuto quasi tutto all'interno delle cellule e solo una piccola parte è escreta nella forma disciolta [36]. Al contrario, i cosiddetti "eteropolisaccaridi" composti da ramnosio, fucosio, xilosio, mannosio e galattosio vengono più facilmente escreti come materiale extracellulare (EPS) e sono quelli che contribuiscono maggiormente ai polisaccaridi escreti con DOM, al contrario di glucosio, ribosio e arabinosio, che pure sono presenti in concentrazioni simili agli altri. Hanno un ruolo nella formazione di colonie, nella stabilizzazione dell'habitat e così via [37, 38]. Poiché gli eteropolisaccaridi sono più difficilmente degradati dall'attività batterica, la bioattività del DOM rilasciato durante un bloom fitoplanctonico è legata alla percentuale relativa di glucano e di eteropolisaccaridi rilasciata dalle alghe; quest'ultima è a sua volta condizionata da fattori come la biomassa fitoplanctonica e la concentrazione di nutrienti [36].

Numerosi studi hanno dimostrato che la composizione in zuccheri del DOM è comparabile con la composizione in zuccheri degli essudati algali [39-44]. D'altra parte, la composizione relativa in monosaccaridi degli eteropolisaccaridi rilasciati dalle alghe è strettamente dipendente dalla specie. Aluwihare e Repeta [44] hanno analizzato la struttura degli EPS rilasciati da tre specie algali, una diatomea *Thalassiosira weissflogii*, una coccolitoforide, *Emiliana huxleyi* e una primnesiofita, *Phaeocystis* sp. Gli zuccheri più importanti sono mannosio (34%), galattosio (30%) e xilosio (15%) nella diatomea; galattosio (30%) e arabinosio (27%) in *E. huxleyi*; glucosio (40%), mannosio (30%) e ramnosio (21%) nella terza specie. È interessante notare che la struttura del 20-30% degli essudati di *T. weissflogii* e di *E. huxleyi* sia simile ai polisaccaridi acilati, che rappresentano circa il 50% del carbonio

nella sostanza organica isolata dalle acque superficiali, indicando che il fitoplancton è una fonte importante di carbonio organico disciolto [44].

Myklestad [45] confrontando *Prasinococcus capsulatus* e *Chrysochromulina polylepis* ha dimostrato che non sono solo le diatomee che rilasciano EPS durante le varie fasi del proprio ciclo vitale; ha mostrato, inoltre, una composizione percentuale in zuccheri diversa, essendo galattosio e glucosio (circa il 70%) e l'acido galatturonico (8%) i monomeri più importanti nella prima e glucosio, mannosio, galattosio e xilosio quelli più importanti nella seconda.

Gli essudati di due specie di diatomee dominanti trovate all'interno delle mucillagini sono stati studiati da De Angelis *et al.* [25], per confrontarne la composizione in monomeri con quella del muco. Gli essudati di *Amphora coffeaeformis* contengono solo glucosio, mentre quelli di *Cylindrotheca fusiformis*, contengono, ramnosio, arabinosio, xilosio, mannosio e galattosio. La combinazione di questi due escreti presentava una concentrazione relativa dei vari monomeri simile a quella osservata nel muco [25].

In un lavoro molto recente su macroaggregati dell'estate del 1997, Kovac *et al.* [46] hanno confrontato la composizione macromolecolare della mucillagine e degli essudati di *Skeletonema costatum*, normalmente presente nel Golfo di Trieste. Secondo le analisi all'infrarosso e all'NMR, le due matrici presentano un rapporto fra composti alifatici e carboidrati molto simile; gli autori suggeriscono, quindi, che le mucillagini abbiano origine principalmente da essudati algali. Nelle mucillagini, il rapporto fra i due polimeri diminuisce con il tempo (campionamenti effettuati fra inizio luglio e settembre), indicando un ruolo dei composti alifatici nella persistenza dei macroaggregati. Un'elevata concentrazione di composti organo-minerali (principalmente organo-silicati) e la loro crescente importanza relativa nel tempo, suggeriscono infine un loro ruolo sia nei processi di aggregazione che nel mantenimento della struttura mucillaginosa.

Biersmith e Benner [47] hanno analizzato la composizione in carboidrati e aldosi della componente strutturale intracellulare, della componente intracellulare idrosolubile insieme agli EPS e della componente rilasciata nei terreni di coltura di peso molecolare >1000 Da (UDOM), su 4 diverse specie di fitoplancton (*Phaeocystis* sp. Prymnesiofite, *Emiliana huxleyi*, Cocolitoforidi, *Synechococcus bacillaris*, Cianobatteri, e *Skeletonema costatum* Diatomee). Anche in questo caso, i profili degli zuccheri della componente intracellulare e di quella rilasciata all'esterno sono differenti, e mostrano che la componente escreta è composta da eteropolisaccaridi. Anche questo studio ha evidenziato la somiglianza fra la sostanza organica disciolta che si trova nella superficie degli oceani di varie località e i profili degli essudati delle alghe studiate.

Sono stati ottenuti dati discordanti a proposito della percentuale di polimeri o monomeri che vengono rilasciati all'esterno dalle alghe. In alcuni studi su *Phaeocystis*, è stato rilevato che fra il 70 e l'80% degli essudati è rappresentato da polisaccaridi [12, 13, 48, 49], mentre in altri i principali prodotti essudati sono risultati essere a basso peso molecolare (< 700 Da) [50]. E' stato anche osservato che i prodotti a basso peso molecolare rappresentano il 69-100% prima e il 39-56% dopo una fioritura algale [51].

#### *Produzione di essudati da parte dei batteri*

E' noto che alcune specie batteriche producono polimeri polisaccaridici trasportati all'esterno della cellula, dove possono rimanere ancorati alla parete batterica e formare una capsula (CPS) oppure essere rilasciati e formare una matrice intorno alla cellula, destinata a disperdersi nel mezzo circostante (EPS) [52]. Questi polisaccaridi possono avere la funzione di migliorare l'adesione alle superfici, proteggere dalla predazione e dall'essiccamento; possono svolgere un ruolo nelle interazioni ioniche, come stabilizzatori degli enzimi localizzati sulla superficie cellulare, come concentratori, come materiali di riserva, o come emulsionanti per liberare i batteri dalle superfici già utilizzate [53, 54]. La possibilità di assolvere numerosi ruoli, è legata alla loro notevole eterogeneità strutturale specie-specifica. A partire dal semplice destrano (un polimero del glucosio non ramificato, con legami a 1,4) si passa a polimeri con catene eteropolisaccaridiche ramificate estremamente complesse, sostituite con diversi gruppi (piruvato, sulfato, acetato, ecc.), nelle quali due zuccheri identici possono legarsi per formare fino ad 11 disaccaridi diversi. Inoltre, gli EPS contengono spesso diversi monomeri (eteropolisaccaridi), e possono essere legati a gruppi non saccaridici, come proteine, acidi grassi, ecc. Molti EPS sono anionici e possono pertanto concentrare i cationi fino a 10000 volte, formando legami fra i gruppi carbossilici dei polisaccaridi acidi e i metalli (per una rassegna, vedi [55]). In alcuni ceppi, la produzione di muco dipende dalle condizioni ambientali [56-59] o dallo stadio vitale [60].

In un caso, ceppo *Hyphomonas* MHS-3, è stato dimostrato che la produzione di EPS per la formazione di una capsula adesiva per passare da uno stadio natante a uno stadio sessile è governato temporalmente da un ciclo vitale obbligato [61], mentre in generale questa produzione è regolata dai fattori nutritivi [57, 59] o ambientali [56]. La capsula di questi ceppi è stata osservata solo nelle fasi sessili [60] e ne sono state dimostrate le proprietà adesive [60-62]. Il principale polimero che la compone è stato purificato e parzialmente caratterizzato; uno dei suoi principali componenti è la galattosammina, che sembra essere acetilata [63].

I pochi studi sul destino degli essudati batterici nell'ambiente marino indicano che sono prodotti poco labili e pertanto poco utilizzati come fonte di carbonio [64]; alcune frazioni di questi composti possono persistere più di un anno [65]. Nel suolo e negli acquiferi la loro decomposizione è regolata da diversi fattori. È stato osservato che, di regola, i microrganismi non degradano i propri polimeri [58, 66]. Sono tuttavia capaci di degradare quelli di specie diverse, anche se a velocità inferiori rispetto ai monomeri o alle molecole più semplici [67]. La velocità di degradazione dipende da fattori come il microorganismo produttore e il microorganismo degradatore [68, 69], o la presenza o meno di metalli che si legano al polimero rallentandone il tasso di decomposizione [67].

### **Ipotesi sulla formazione delle mucillagini**

#### *Dinamica dell'Adriatico settentrionale*

L'Adriatico settentrionale, chiuso per tre lati da terraferma e poco profondo (ha una profondità massima di ca 50 m lungo il transetto fra Senigallia e le isole Susak, lungo le coste croate) presenta caratteristiche idrodinamiche particolari, che possono essere determinanti per la formazione delle mucillagini.

In Adriatico si possono individuare 3 zone caratterizzate da tre differenti livelli di trofia, determinate dalla particolare circolazione della zona. In generale, il bacino si può considerare oligotrofo, ma gli apporti fluviali notevoli rendono eutrofiche o addirittura distrofiche alcune zone. Il Po contribuisce per circa il 50% degli apporti di acqua dolce nel bacino nord adriatico [70] e scorrendo in una delle zone agricole più produttive del nord Italia, contribuisce anche per circa il 50% degli apporti di nutrienti [71, 72]. Gli scarichi annuali medi del fiume Po sono stati stimati, da dati recenti, in  $25,5 \times 10^4$ ,  $15,5 \times 10^4$  e  $5,8 \times 10^3$  t/anno per carbonio, azoto e fosforo organico totale e in  $11,6 \times 10^4$ ,  $13,6 \times 10^4$  e  $3,3 \times 10^3$  t/anno per i rispettivi composti in fase disciolta [72, 73]. L'acqua dolce in entrata, proveniente principalmente dal Po, scorre verso sud, lungo la costa occidentale, rendendo questa fascia altamente produttiva, in modo correlabile alla quantità di acqua dolce (zona distrofica,  $178 \text{ gC/m}^2/\text{anno}$ ); ad est, verso la parte centrale del bacino, si osservano una fascia eutrofica, con un minor apporto di acqua dolce e una produzione primaria conseguentemente inferiore ( $\sim 85 \text{ gC/m}^2/\text{anno}$ ) e una fascia ancora più interna, decisamente oligotrofica ( $\sim 56 \text{ gC/m}^2/\text{anno}$ ) [74].

Lo stato di trofia, determinato dalla concentrazione di nutrienti, è indirettamente legato, a sua volta, alla circolazione delle acque, che determina la proporzione di effluenti che viene esportata o trattenuta all'interno

del bacino. La circolazione dell'Adriatico settentrionale è determinata principalmente da due correnti termoaline (determinate dalla temperatura e dalla salinità), una positiva e una negativa, e in secondo luogo dal vento. La corrente termoalina positiva è caratterizzata dallo spostamento lungo la costa adriatica italiana dell'acqua dolce superficiale, introdotta dai numerosi influenti del bacino; questa corrente trascina con sé anche parte delle acque costiere, causando un'uscita d'acqua dal bacino maggiore dell'entrata. Queste acque vengono sostituite da un flusso proveniente dal bacino adriatico medio. La quantità media annuale di acqua sostituita è  $2500 \text{ km}^3/\text{anno}$ , che indica un tempo medio di rinnovo di circa 3,5 mesi. Le acque fredde dense che si formano in inverno scorrono sul fondo lungo le coste occidentali durante la primavera e l'estate secondo una circolazione termoalina negativa. La corrente che si determina (DWOC) varia stagionalmente, con un massimo in primavera, e nei diversi anni, in funzione della rigidità dell'inverno [75]. Fattori che determinano un ricambio ridotto nel bacino sono: a) un inverno mite (ridotta produzione di acque dense, ridotta circolazione termoalina negativa); b) poche precipitazioni (riduzione della circolazione termoalina positiva); c) temperature elevate che causano un'espansione termica delle acque superficiali riducendo l'entrata di acque dalla zona sud del bacino e allungando i tempi di ritenzione delle acque dolci superficiali. Nonostante questo pattern di circolazione, grazie al quale circa l'84% dell'acqua dolce viene esportato lungo le coste italiane, i nutrienti vengono esportati in misura molto minore. Uno studio sul bilancio dell'azoto, nell'anno 1994, ha dimostrato che solo il 16% dell'apporto totale viene esportato tal quale, mentre il 67% viene utilizzato nella zona distrofica e poi esportato nella forma organica nelle fasce più interne, evidenziando pertanto una notevole importanza dei processi biologici nel trasferimento dei nutrienti. Un'importante conseguenza di questa situazione è che in caso di fattori fisici che riducano fortemente il ricambio delle acque del bacino, si possono avere delle forti ripercussioni sulla componente biologica in tempi molto brevi (scala stagionale), oltre ad un rinnovo incompleto delle acque del bacino su una scala annuale [74].

#### *Condizioni meteorologiche*

Come è stato ricordato nel paragrafo precedente, le condizioni meteorologiche (riduzione della piovosità con conseguente riduzione di immissione di acqua dolce) possono condizionare il ricambio d'acqua del bacino settentrionale [74]. Questo è quanto è successo durante gli anni 1988/90, anni di inverni miti.

Nel 1991, anche se l'inverno è stato particolarmente duro e piovoso, si è avuto all'inizio dell'estate un

tempo molto calmo, senza vento, con una ridotta circolazione che ha portato all'affioramento delle mucillagini formatesi in precedenza sul fondo [16].

L'influenza delle attività solari è stata esclusa dalla mancanza di correlazioni significative fra queste e la frequenza delle mucillagini. Sono state però osservate covarianze fra variazioni della pressione atmosferica e la comparsa delle mucillagini: periodi di massime variazioni in pressione atmosferica corrispondono a eventi di mucillagini nei passati 100 anni (1872-1989). Casi di anossia dei fondali in aree molto estese si sono verificati in corrispondenza di periodi di pressione estremamente bassa (1977) ed estremamente alta (1989) [76]. Oltre alla pressione, anche i movimenti delle onde sono stati chiamati in causa come necessari, se non concause degli eventi di mucillagini [77]. Una corrispondenza è stata osservata fra periodi pluriennali di portate ridotte e superiori alla media del fiume Po. I fenomeni di mucillagini negli anni 1928, 1951, 1988, 1989, 1991, 1997 si sono verificati infatti approssimativamente alla fine dei periodi primaverili degli anni con portate eccezionali, succeduti ad anni con portate al di sotto della minima media [78].

#### *Neve marina*

Con il termine "neve marina" si definiscono genericamente le particelle di diametro pari a 0,5 mm o superiore, che si trovano dovunque negli oceani, ed hanno origine attraverso due processi principali (per una rassegna vedi Alldredge e Silver [23]). Nel primo caso, lo zooplancton produce direttamente aggregati, con l'escrezione di fecal pellets o attraverso il rilascio della frazione di cibo non ingerita durante la predazione, avvolta in una matrice mucosa. Nel secondo caso, la formazione di aggregati avviene in seguito alla collisione e conseguente adesione di particelle più piccole presenti nell'acqua, particolarmente quelle nel range da decine a centinaia di micron. La possibilità di formazione di neve dipende dalla concentrazione delle particelle, dalla probabilità di adesione in seguito alla collisione, dalla turbolenza e dalla velocità di sedimentazione [79]. In questo caso, la composizione della neve marina riflette la concentrazione e il tipo di particelle presenti nella colonna d'acqua. Se è presente un numero elevato di diatomee senescenti, gli aggregati saranno dominati da questi organismi.

La presenza nei campioni di mucillagini dell'Adriatico e del Tirreno di molte diatomee, suggerisce che il nucleo originale di formazione della mucillagine possa essere neve marina formata a partire da questi organismi. Tuttavia, un aspetto fondamentale perché la neve marina possa formare aggregati più grossi fino a formazioni mucillaginosi è che deve galleggiare per accumularsi nella colonna d'acqua, fenomeno che normalmente non avviene, in quanto gli aggregati sedimentano molto rapidamente [80].

Allredge e Crocker [18] hanno proposto un modello che può spiegare come questo fenomeno sia probabile in un sistema come il nord Adriatico. Il modello, basato sulla porosità, densità, percentuale in volume di muco contenuto e tasso di sedimentazione del particolato, predice degli accumuli di particolato significativi, lungo gradienti di densità verticali confrontabili con quelli osservati in Adriatico alla profondità di accumulo degli aggregati. In presenza di una leggera stratificazione, tanto più in presenza di un picnoclino netto, come accade in Adriatico, la formazione di aggregati di diatomee nella zona di acque miste, al di sopra del picnoclino, causa il trasporto di acqua superficiale, meno densa, verso il fondale. Quest'acqua viene trattenuta dagli essudati che costituiscono la matrice degli aggregati e non viene rilasciata durante la sedimentazione delle particelle attraverso un'acqua a maggiore densità; questa situazione comporterebbe pertanto un rallentamento se non addirittura un arresto della sedimentazione, favorendo i processi di aggregazione. Le caratteristiche chimiche e l'abbondanza degli essudati rappresentano fattori importanti per la formazione degli aggregati [18].

In Adriatico, quando particolari condizioni ambientali favoriscono un'abbondante crescita di specie come *Cylindrotheca closterium* e altri taxa, come *Chaetoceros* e *Nitzschia*, vengono prodotte grandi quantità di essudati, conosciuti anche come TEP (*transparent exopolymer particles* [81]), che si aggregano insieme alle cellule produttrici e sedimentano fino al picnoclino, dove galleggiano. Poiché gli essudati sono particolarmente resistenti alla decomposizione, possono accumulare per molte settimane; inoltre, in condizioni di tempo calmo e assoluto, che portano ad una forte stratificazione, i processi di aggregazione sono ulteriormente facilitati e favoriti. Infine, le mucillagini così formate salgono in superficie per la formazione di bolle in seguito al metabolismo degli organismi che si trovano al loro interno [82].

#### *Concentrazione dei nutrienti*

La situazione relativa alla distribuzione e concentrazione dei nutrienti negli ultimi 20 anni è piuttosto complessa. Alla fine degli anni ottanta, in seguito alla riduzione dei fosfati nei detersivi in Italia, la concentrazione degli ortofosfati nel Po è diminuita, mentre la concentrazione di nitrati è rimasta la stessa. Conseguentemente, la stessa situazione si è verificata nelle zone costiere dell'Adriatico dove la biomassa di fitoplancton (concentrazione di clorofilla a) ha iniziato a diminuire in modo marcato dal 1988. Tuttavia, negli anni ottanta e novanta la produzione e la concentrazione di clorofilla sono state più alte rispetto ai primi settanta, nonostante la riduzione di fosfati [83] probabilmente grazie a condizioni meteorologiche partico-

larmente favorevoli [76]. In quegli anni, la temperatura superficiale è stata più alta della media, particolarmente in primavera ed estate. Queste variazioni nelle portate del Po e conseguentemente nella concentrazione dei nutrienti rispetto alle medie pluriennali, possono aver causato le variazioni osservate nella composizione della comunità fitoplanctonica. In particolare, fioriture ricorrenti di due specie di diatomee *Nitzschia delicatissima* e *Chaetoceros socialis*, prima quasi assenti dall'Adriatico, hanno rappresentato la maggiore variazione nella composizione delle fioriture primaverili [78, 84]. Queste specie hanno sostituito alcune specie di diatomee e dinoflagellate che prima rappresentavano le popolazioni dominanti delle fioriture primaverili negli anni sessanta e settanta, sotto l'influenza del Po, lasciando invariata la biomassa totale (come clorofilla a).

Oltre a modificare la composizione in specie, la concentrazione dei nutrienti determina anche variazioni nella produzione e rilascio di essudati da parte di alcune specie algali. Specie come *N. delicatissima*, *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros* sp. in laboratorio producono e rilasciano notevoli quantità di carboidrati ad alto peso molecolare nella fase di crescita esponenziale e stazionaria se in condizioni di fosforo limitante; i polisaccaridi escreti sembrerebbero anche ridurre l'appetibilità delle alghe per i predatori [85]. E' sulla base di queste osservazioni che è stata avanzata l'ipotesi che la formazione di mucillagini sarebbe dovuta ad un'iperproduzione di essudati da parte di microalghe, soprattutto diatomee, in condizioni di limitazione di fosforo [4, 86].

La carenza di nutrienti può inoltre ridurre l'attività batterica eterotrofica, responsabile dell'utilizzazione del DOM, favorendo l'accumulo di grandi quantità di sostanza organica. In un esperimento in laboratorio con acqua dal golfo di Trieste, l'attività glucosidasi batterica veniva fortemente inibita in carenza di fosforo, causando un accumulo di DOC, costituito al 90% circa di carboidrati [87]. Poiché i carboidrati svolgono un ruolo molto importante nell'aggregazione delle cellule e nei processi di coagulazione delle macromolecole, in condizioni di mare stabile, la mancata degradazione del carbonio prodotto durante il bloom può favorire la formazione di aggregati mucilluginosi.

E' stato, inoltre, osservato che condizioni di limitazione di fosforo, oltre ad incrementare il rilascio di essudati, favorirebbero la produzione di essudati meno degradabili, in grado dunque di accumulare nella colonna d'acqua [88].

Thornton *et al.* [89] riassumono quelle che sembrano essere concause dello sviluppo di aggregati mucilluginosi, portando l'attenzione sui processi di condensazione che avvengono in presenza di  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$ . Secondo gli autori, sono tre le condizioni neces-

sarie perché si verificano episodi di mucillagine: 1) la presenza di una grossa biomassa algale che produca grosse quantità di polisaccaridi extracellulari; 2) un flusso ridotto del Po e una conseguente riduzione dell'apporto di nutrienti, che induca la produzione di grosse quantità di essudati nel fitoplancton; 3) un fronte del delta del Po non netto, in modo che il fitoplancton cresciuto in acque limitate da nutrienti con un basso contenuto di calcio, si mescoli con acqua di mare a concentrazioni di calcio più elevate. L'elevata produzione di EPS in condizioni di limitazione di nutrienti, insieme ad un'elevata concentrazione di calcio, darebbe origine alle mucillagini.

#### *Produzione di muco da parte di Cyanobacteria*

I cianobatteri possono contribuire in modo significativo alla produzione costiera in acque temperate, particolarmente in condizioni di stratificazione estiva, quando la loro produzione supera quella eucariota. Inoltre, i tassi di produzione dei cianobatteri aumentano quando le cellule sono immerse in matrici gelatinose, contribuendo a loro volta, alla produzione del muco. Poiché in Adriatico si verificano spesso condizioni di stratificazione termica estiva e ridotta turbolenza, Kaltenbock e Herndl [90] hanno indicato la possibilità che i cianobatteri siano fra gli organismi significativamente implicati nella produzione di mucillagine.

#### *Zeoliti*

In seguito all'accertamento di condizioni di grave eutrofizzazione del Nord Adriatico negli anni '80, come sopra menzionato, il contenuto in fosforo dei detergenti è passato dall'iniziale 7-8% all'1%. In sostituzione del fosforo è stata utilizzata la zeolite A sintetica, insieme ad una più elevata concentrazione di acidi policarbossilici (PCA) (fino al 4-5% del formulato). Pettine *et al.* [91] suggeriscono che la comparsa di mucillagini con frequenze ed estensioni molto superiori rispetto al passato, in concomitanza con un'accresciuta concentrazione di zeolite A possa non essere casuale. Il complesso zeolite-PCA ha un comportamento simile al complesso argille-acidi umici/fulvici e può funzionare come nucleo di aggregazione per colloidali sospesi. Oltre ad aumentare la concentrazione di particellato fine (maggior numero di nuclei di aggregazione), il complesso zeoliti-PCA può dar luogo alla formazione di aggregati meno densi, che possono pertanto distribuirsi lungo la colonna d'acqua e galleggiare, per due motivi legati alla loro struttura cristallina, tuttora da verificarsi sperimentalmente: a) una minore densità della zeolite A rispetto alle argille; b) la possibilità di originare flocculi caratterizzati da una maggiore porosità e pertanto meno densi [91]. I risultati di uno studio speri-

mentale condotto sugli essudati della diatomea *Cylindrotheca closterium*, una delle specie più abbondanti nel muco raccolto nel golfo di Trieste e capace di produrre elevate concentrazioni di aggregati mucosi in condizioni di stress da nutrienti non hanno confermato tuttavia questa ipotesi [92].

#### *Ruolo dello zooplancton*

Lo zooplancton sembra contribuire direttamente ed indirettamente alla produzione e all'accumulo di sostanza organica.

La predazione di protisti sulle popolazioni batteriche del microbial loop rappresenta un'importante fonte diretta di produzione di tensioattivi [93] sostanze molto importanti, implicate in diversi processi degli strati superficiali degli oceani, come processi di adesione cellulare, coagulazione di piccoli colloidali e scambi gassosi all'interfaccia acqua-aria. Possono essere proteine, lipidi, carboidrati, ma in maggioranza sono composti polisaccaridici [94, 95]. In un esperimento con tre differenti protozoi, un ciliato e due flagellati, nutriti con lo stesso ceppo batterico, Kujavinski *et al.* [93] hanno osservato una produzione di tensioattivi significativamente superiore rispetto al controllo con i soli batteri, comparabile con i tassi di produzione osservati per il fitoplancton in condizioni di bloom.

Lo zooplancton esercita generalmente un controllo sulla densità algale. E' probabile che durante le fioriture algali primaverili, le popolazioni di copepodi non crescano abbastanza velocemente per controllare l'improvviso aumento di biomassa e mantenere, quindi, bassa la concentrazione del fitoplancton. La pressione predatoria potrebbe essere ulteriormente ridotta a causa dell'elevata produzione di essudati durante le fasi di crescita esponenziale e stazionaria delle alghe, che aumentano la viscosità del mezzo e rendono più difficile il movimento degli organismi predatori, limitando le probabilità di incontro. Inoltre, alcune delle sostanze rilasciate dalle alghe sembrano tossiche o repellenti nei confronti dello zooplancton. In questo modo la popolazione algale può continuare a crescere e a rilasciare essudati [85]. Le specie di copepodi del Nord Adriatico non sembrano in grado di predare il fitoplancton associato alla neve marina [96], come è stato confermato dall'analisi degli acidi grassi dello zooplancton durante un fenomeno di mucillagine nel 1991, che indicava una condizione di forte denutrizione, con conseguente consumo delle proprie riserve di grassi [97].

Un altro effetto indiretto dello zooplancton è legato al controllo dell'abbondanza batterica. Uno studio sulla mucillagine del 1997 ha mostrato che l'abbondanza batterica sui fiocchi di mucillagine era significativamente inferiore rispetto all'abbondanza

dei batteri liberi (nella colonna d'acqua circostante), mentre il metabolismo (produzione, respirazione, attività ectoenzimatica) era significativamente superiore, grazie alla ricchezza in sostanza organica e nutrienti dei fiocchi [98]. Poiché il rapporto virus/batteri delle popolazioni dei fiocchi e di quelle libere non era diverso, è stato ipotizzato che fosse la predazione da parte di organismi eterotrofi a mantenere bassa l'abbondanza batterica sui fiocchi di mucillagine, riducendo pertanto l'utilizzazione e la degradazione della mucillagine [98].

Un ulteriore aspetto da considerare è la predazione selettiva dei flagellati sulle specie batteriche. In uno studio in mesocosmi sulla dinamica della struttura della comunità batterica durante una fioritura algale, è stata osservata una significativa variazione delle specie presenti sul particolato, corrispondente a variazioni nel metabolismo batterico (produzione, attività enzimatica) [99]. Gli autori di questo studio suggeriscono che, oltre ad un processo di successione in specie di batteri che colonizzano il particolato e alle conseguenti variazioni nelle caratteristiche del substrato, la predazione di eterotrofi flagellati possa avere un impatto significativo sulla composizione in specie della comunità, influenzando quindi i tassi di ciclizzazione di sostanza organica mediati dai batteri.

#### *Attacchi virali*

In uno studio è stato messo in evidenza il ruolo di attacchi virali al fitoplancton che libererebbe i polisaccaridi di riserva interni alle cellule [100]. Sfortunatamente l'importanza di questo processo non è facile da valutare per problemi riguardanti la conservazione dei campioni di mucillagini esaminati. Inoltre, le analisi effettuate tramite sonde molecolari non hanno fornito indicazioni univoche, anche a causa dell'elevata impurità dei campioni e della presenza abbondante di polisaccaridi che rende difficile l'estrazione del DNA [100]. Studi condotti con la microscopia confocale e con lecitine marcate con FITC che si legano a residui polisaccaridici specifici hanno evidenziato la presenza di cellule lisate all'interno del muco [24]. L'importanza della lisi fitoplanctonica, tuttavia, contribuirebbe alla concentrazione di polisaccaridi con elevate percentuali di glucano (molecola di riserva del fitoplancton) che risulta più degradabile degli eteropolisaccaridi attivamente rilasciati all'esterno della cellula [36].

#### *Interazioni fra comunità planctonica e caratteristiche fisiche degli aggregati*

Casi di formazione di mucillagine in Adriatico sono stati preceduti dall'abbondante presenza di aggregati fluidi con attività tensioattiva lungo tutta la colonna

d'acqua al di sopra del termoclino. Sulla base di misurazioni elettrochimiche a lungo termine dell'attività tensioattiva in superficie durante varie stagioni, dell'abbondanza degli aggregati fluidi con attività tensioattiva e la caratterizzazione degli aggregati giganti delle estati 1991 e 1997 è stato proposto un possibile scenario, che comprende le interazioni fra proprietà chimico-fisiche e l'attività batterica [101].

L'abbondante produzione algale legata all'eutrofizzazione del Nord Adriatico porta all'accumulo di quantità di macromolecole essudate (principalmente polisaccaridi) come sospensioni colloidali nello strato eufotico, al di sopra del picnoclino. I batteri possono intervenire direttamente nella produzione di polimeri ma più significativamente controllano l'estensione e la durata delle fioriture, regolando la disponibilità dei nutrienti e limitando i fenomeni di aggregazione del fitoplancton. Con lunghi tempi di residenza, le sospensioni colloidali si aggregano in particelle di dimensioni di 1-100  $\mu\text{m}$  e alla concentrazione critica stimata in circa  $5 \times 10^7$  particelle per litro, formano un gel, con un'attività tensioattiva fino a 50 volte superiore rispetto all'acqua circostante.

Questi aggregati contengono meno di 1 ppm di carbonio organico (principalmente polisaccaridi) e sono sede di un'intensa attività batterica. La transizione fase gel-sol è quasi istantanea ed è determinata dall'idrodinamica locale (turbolenza e attrito), dalla vicinanza alla superficie e dalla densità della colonna d'acqua. Il galleggiamento degli aggregati dipende dall'attività batterica sugli aggregati stessi. La persistenza e la stabilità degli aggregati dipende da: 1) transizione da gel a sol, che provoca la sedimentazione delle particelle; 2) processi fisici su larga scala, come forti venti e correnti, che causano la disaggregazione fisica e il trasporto all'esterno del bacino.

### Una nuova ipotesi sulla formazione della mucillagine

Una nuova teoria è stata proposta recentemente da Azam *et al.* [102]. Il controllo della produzione dei polisaccaridi, del loro accumulo e della loro flocculazione, secondo questa teoria, sarebbe dovuto ad una serie complessa di interazioni che coinvolge gli organismi del *microbial loop*, compreso il fitoplancton, e il pool di sostanza organica ed inorganica.

Nonostante sia ormai accettata una nuova visione della natura fisica del pool di sostanza organica [101, 103-106] e sia riconosciuto il ruolo dei batteri sul controllo del ciclo del carbonio [107, 108], i modelli finora proposti non avevano tenuto conto di questi nuovi concetti.

### Continuum organico negli oceani

L'idea del *continuum* di materia organica, secondo la quale il mare è un gel costituito da colloidali e polimeri organici *cross-linked*, è stata suggerita da studi di ecologia microbica [105].

Non è più appropriato distinguere fra particolato e disciolto, ma si deve considerare una distribuzione del particellato lungo uno spettro dimensionale continuo, entro il quale un'importante frazione è rappresentata dai "colloidali" (dimensioni, almeno lungo una direzione, comprese fra 1 nm e 1  $\mu\text{m}$ ). Questa frazione è estremamente dinamica ed eterogenea, essendo costituita da organismi, detriti, macromolecole organiche, minerali, argille e ossidi ed è continuamente generata, rimossa e trasformata da numerosi processi chimico-fisici e biologici [109].

Un decisivo contributo a questa visione è stato fornito negli ultimi 10 anni, grazie all'applicazione di metodologie diverse dalle usuali routine oceanografiche [81, 110-112]. L'uso di contatori di particelle elettronici ed elettrochimici, della microscopia elettronica e di tecniche istologiche di colorazione dei tessuti ha infatti mostrato l'esistenza di una frazione di particolato, fluida e flessibile, nel range dimensionale che va da pochi nanometri a centinaia di micrometri. La loro area di interfaccia nella colonna d'acqua sorpassa di alcuni ordini di grandezza l'area della superficie del mare [112]. La struttura dell'interfaccia, la funzione e la chimica di queste particelle marine si rivelano ad una risoluzione vicina a 0,001  $\mu\text{m}$  [101]. In Tab. 1 è riportata una loro definizione operativa, in funzione del metodo di indagine.

Tramite un elettrodo a mercurio in immersione, sono state individuate particelle tensioattive in campioni non filtrati di acque estuarine [119] e di mare [120]. La maggiore abbondanza di queste particelle, di dimensioni fra 1 e 100  $\mu\text{m}$ , è stata trovata nella zona di mescolanza di estuari e alla superficie del mare [119]. Le macromolecole che danno origine a questi aggregati (polisaccaridi, proteine, lipidi) possono essere il prodotto dell'escrezione e/o della decomposizione di fitoplancton [95, 101]; tuttavia anche molti batteri contribuiscono in modo significativo alla produzione di tensioattivi, che possono essere escreti all'esterno della cellula o rimanere parzialmente attaccati [121]. Queste macromolecole inoltre possono essere prodotte dall'attività predatoria dello zooplancton sui batteri [93]. È stato osservato che specie diverse producono essudati diversi [95].

Koike *et al.* [110] hanno individuato una categoria di particelle organiche submicrometriche nel range 0,38-1,0  $\mu\text{m}$ , che comprende virus, batteri, cianobatteri e piccoli eucarioti. Queste particelle, che arrivano a concentrazioni di  $10^{10}$  per litro, sono per il 95% non viventi, sono molto fragili e scompaiono con la sonicazione.

**Tabella 1.** - Le maggiori classi di particelle non viventi presenti nello strato superficiale del mare (zona eufotica)\*

Tipo	Dimensioni	Provenienza	Metodo d'analisi	Concentrazione (n/l)
Piccoli colloidali [111, 113, 114]	5-200 nm	Bacino di Santa Monica Nord Atlantico Pacifico nord-occidentale	TEM	10 <sup>7</sup> -11 <sup>12</sup> max al termocline
Particelle submicrometriche [110,115]	0,38-1 μm	Pacifico del nord (Giappone) Atlantico nord-occidentale	Conta particelle Coulter	5x10 <sup>10</sup> - 8x10 <sup>10</sup> nei primi 40 m, < 10 <sup>9</sup> sotto i 200 m
Aggregati fluidi tensioattivi [116, 119, 120]	1-100 μm	Mediterraneo	Adesività all' elettrodo al Hg	10 <sup>5</sup> -5x10 <sup>7</sup> max all'alocline
Particelle esopolimeriche trasparenti (TEP) [81, 117]	3-100 μm	Costa della California	Microscopia dopo colorazione Alcian blue	3x10 <sup>4</sup> -5x10 <sup>6</sup>
Particelle contenenti proteine (colorate con Comassie), CSP [112]	2-500 μm	Costa della California	Microscopia dopo colorazione Comassie blue	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>
Aggregati giganti (mucillagini) [15, 34, 118]	>1 m	Episodici, Adriatico settentrionale	Prelievo con sommozzatori	0-10 in 100 m <sup>3</sup> sopra il termocline (circa 20 m)

\* Definite sperimentalmente secondo le tecniche di misurazione utilizzate.

La scoperta di una grande popolazione di particelle organiche più piccole di 120 nm, raccolte per ultracentrifugazione direttamente sulle griglie per l'osservazione al microscopio elettronico [111], ha dimostrato l'esistenza di un continuum di particelle colloidali, da pochi nanometri a particelle più larghe, che alla fine rimuove la sostanza organica dalla colonna d'acqua per sedimentazione. Questi colloidali raggiungono una densità di 10<sup>12</sup> per litro, con una superficie totale dell'ordine di 10 m<sup>2</sup> per metro cubo [101]. La composizione di queste particelle non è dissimile da quella della sostanza disciolta e particellata, si può pertanto pensare ad una origine comune.

Chin *et al.* [106] hanno dimostrato sperimentalmente che i polimeri, carboidrati, proteine e lipidi, presenti nell'acqua di mare possono aggregarsi spontaneamente e formare un gel polimerico, con dimensioni fra 2 e 200 nm. L'equilibrio delle dimensioni del gel così assemblato dipende dalla concentrazione di polimeri liberi. Nell'oceano, con una possibilità virtualmente infinita di fonti di polimeri, i gel possono raggiungere potenzialmente dimensioni molto grandi. Il meccanismo principale di formazione dei gel sembra essere la formazione di ponti calcio e magnesio. Un'altra caratteristica importante è che rimuovendo il gel appena formato si forma nuovo gel, con l'implicazione biogeochimica che la formazione di colloidali nell'oceano sarebbe influenzata dal tasso di rimozione del particolato.

Infine, l'applicazione di tecniche di colorazione istologiche ha consentito di evidenziare la presenza delle TEP (*transparent exopolymer particles*), particelle larghe, discrete e trasparenti (vedi paragrafo precedente [81]) e delle CSP (*Comassie staining particles*) [112]. Con la colorazione con Alcian blu che rivela una significativa componente di polisaccaridi, lungo le coste della California sono state trovate TEP in concentrazioni fra 28 e 5000 particelle per ml di acqua di mare, con dimensioni variabili fra 3 e 100 μm. Le TEP possono anche essere componenti significative di aggregati di dimensioni maggiori e contenere o meno inclusioni visibili. Hanno origine da essudati disciolti polisaccaridici rilasciati da fitoplancton o batteri.

Utilizzando Comassie blu brillante, tipico per la colorazione di proteine, Long e Azam [112] hanno mostrato la presenza di molte particelle proteinacee, chiamate CSP, secondo la tecnica utilizzata. Le TEP possono contenere CSP, ma la maggior parte di queste ultime non contiene carboidrati e sono da 3 a 13 volte più numerose delle TEP. La loro area, in acque costiere, varia da 10<sup>2</sup> a 10<sup>4</sup> mm<sup>2</sup> l<sup>-1</sup>. Inoltre, molte di queste particelle sono colonizzate da batteri [112].

Gli organismi, dunque, vivono, "lavorano" e fanno parte di questa matrice tutt'altro che omogenea. I polimeri finora descritti sono prodotti e degradati principalmente dai microrganismi. Il ruolo dei batteri e dei protozoi nel controllo dei flussi di carbonio negli oceani, anticipato da Pomeroy [122] è stato formaliz-

zato nella teoria del *microbial loop* negli anni '80 da Azam *et al.* [107]. I batteri che utilizzano il DOM sono predati dai protozoi, a loro volta utilizzati dai ciliati. Il sistema è stato definito un circuito semi-chiuso (*loop*) perché durante la predazione, parte del carbonio viene perso come perdita predatoria (*sloppy feeding*) o viene escreto, ed è prontamente riutilizzato dai batteri stessi. Si capisce l'importanza del *microbial loop* se si considera che il flusso di carbonio attraverso questa strada può rappresentare da 0 a 100% della produzione primaria locale [123]. La matrice di gel crea un ambiente fisico-chimico strutturato ed eterogeneo entro il quale, e con il quale, avvengono le interazioni microbiche che controllano il ciclo del carbonio [108]. Batteri, Archea, fitoplancton, protozoi e virus sono visti totalmente immersi in questo gel, organizzati come comunità e consorzi ad una microscala spaziale e temporale [105]. Le interazioni microbiche all'interno del gel possono alterare la natura e la densità del gel stesso, formando la mucillagine o inibendone la formazione [102]. Questa eterogeneità origina degli "hot-spots" di produzione primaria, di concentrazione e trasformazione di sostanza organica, così come di cicli di nutrienti, cambiando in modo fondamentale e intensificando e diversificando in modo significativo la biogeochimica del carbonio a livello di microscala.

In questo scenario si possono esplorare le basi meccanicistiche della formazione della mucillagine. Nell'ottica del *continuum*, le superfici cellulari rappresentano regioni di polisaccaridi altamente concentrate (gel più denso) che si mescolano con il gel meno denso nell'acqua circostante e attraverso esso interagiscono con le superfici cellulari di altri microbi. La consistenza di gel dell'acqua di mare è mantenuta in qualche modo da batteri e fitoplancton che rappresentano minuscole frazioni di volume d'acqua ( $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  rispettivamente). Se i polimeri del gel sono molto resistenti e persistono a lungo, è sufficiente rilasciare poche macromolecole nuove per il mantenimento della struttura. Il condensamento e l'aggregazione in mucillagine richiedono l'accumulo di una sostanziosa quantità di materiale organico resistente.

L'ipotesi formulata si articola nei seguenti punti fondamentali di seguito descritti:

1) Uno degli argomenti centrali è come e da chi venga prodotta la sostanza biorefrattaria: la materia organica che costituisce la mucillagine dell'Adriatico si forma dalla condensazione di polisaccaridi colloidali e polimerici prodotti dall'azione del metabolismo batterico sulla sostanza organica, attraverso un'idrolisi incompleta dei polisaccaridi complessi; dall'interazione dei batteri con gli altri organismi del *microbial loop*; dall'interazione dei batteri con il detrito. Inoltre, è direttamente prodotta dai batteri che utilizzano parte della produzione primaria per la formazione dei polisaccaridi della propria capsula. Come risultato si ha un

accumulo "invisibile" di carbonio organico disciolto (DOC) e carbonio organico colloidale (COC), continuamente trasformati dall'attività microbica.

*Interazioni con il fitoplancton.* - I batteri, che possiedono enzimi idrolitici sulla propria superficie esterna (fra i quali i più importanti sono le proteasi, le glucosidasi e le fosfatasi) tramite i quali interagiscono con cellule algali e detrito, tendono a clusterizzare nelle vicinanze di alghe o in presenza di gradienti di nutrienti [124, 125]. Con i loro enzimi idrolitici, i batteri sono capaci di attaccare e trasformare la superficie esterna di alghe vive, con numerose conseguenze sull'attività algale. È stato suggerito che la produzione di muco da parte del fitoplancton sia una strategia di difesa nei confronti degli attacchi batterici e virali [126]. È stato inoltre suggerito che l'azione enzimatica batterica medi e controlli il rilascio di fibrille di muco dalla superficie algale [127]. Questo implica che il rilascio di essudati da parte delle alghe, oltre ad essere un processo attivo, ha anche bisogno della mediazione batterica. Un'altra conseguenza di questa interazione è evidente durante le fioriture algali, quando l'idrolisi batterica dei polisaccaridi sulla superficie algale riduce la probabilità di aggregazione delle numerose cellule e quindi ritarda il fenomeno della sedimentazione [127] favorendo un'elevata produzione di sostanza organica che può in seguito accumulare nel sedimento.

*Interazioni con il detrito.* - I processi di morte non predatoria, che riguardano circa la metà della produzione primaria (autolisi, morte cellulare programmata e attacchi virali) [24, 128] trasferiscono una frazione significativa di produzione primaria nella fase di detrito. Una volta che le alghe sono morte, i batteri possono attaccare e solubilizzare anche i polisaccaridi intracellulari. Le alghe rappresentano quindi una fonte importante di polisaccaridi (indiretta e mediata dal metabolismo batterico) anche senza rilasciare attivamente essudati. L'elevata concentrazione di glucosio trovata in campioni di mucillagini è stata attribuita alla presenza di glucano, sostanza di riserva delle diatomee [26]. Inoltre, le concentrazioni dei polisaccaridi intracellulari sono indipendenti dalla concentrazione di fosforo inorganico nel mezzo acquoso (Pi) [129] che invece influenza la velocità di rilascio di essudati. Ciò implica che per una diffusione elevata di polisaccaridi algali non è necessaria la presenza di specie produttrici di essudati o condizioni di P limitante, ma è sufficiente una mortalità di massa, seguita dall'idrolisi batterica [102]. I tassi di attività delle idrolasi batteriche non sono tutti uguali [130] e questo è stato osservato anche su popolazioni batteriche di fiocchi di mucillagine del 1997 [98]. Le glucosidasi, pur essendo molto attive sugli aggregati, risultano inferiori di 2 o 3 ordini di grandezza rispetto alle proteasi e alle fosfatasi. Pertanto, non appena le cellule muoiono e vengono colonizzate, inizia una solubilizzazione selettiva, che

porta alla formazione di aggregati sempre più poveri di proteine e fosforo organico e più ricchi in carboidrati, che poi precipitano sul fondo [131].

*Produzione diretta di muco.* - Dati qualitativi [132] e quantitativi [133] confortano l'ipotesi che la produzione dei polisaccaridi batterici di superficie possa rappresentare un'importante fonte di materiale mucillaginoso. Infatti, più del 45% del glucosio utilizzato da batteri pelagici è convertito in materiale polisaccaridico e rilasciato nell'acqua [64]. Questo processo è tanto più importante durante le fioriture primaverili, quando le numerose cellule sfuggite alla predazione rappresentano un importante input di sostanza organica fresca, che può essere rapidamente trasformata dall'attività batterica [102].

Una simulazione descritta da Kiorboe e Jackson [134] dimostra che l'intensa attività batterica su particelle di neve marina che sedimentano crea una scia di sostanza organica parzialmente idrolizzata che è a sua volta velocemente utilizzata dai batteri liberi che si spostano in questa scia. Immersi in questo microhabitat ricco di nutrienti e detrito i batteri hanno un'efficienza di utilizzazione molto più elevata di quelli lontani dalla scia. Quindi una grossa parte di produzione primaria può essere subito trasformata in muco batterico durante la sedimentazione da parte dei molti colonizzatori ( $10^8/10^9$  ml<sup>-1</sup>, [98]) e dai batteri che raggiungono e seguono la scia; la frazione sedimentata è ulteriormente utilizzata dai batteri bentonici, presenti in elevate densità, circa  $10^9$  cell g<sup>-1</sup> sedimento [135]. È importante notare che il muco rilasciato dai batteri è resistente alla degradazione [64, 136].

L'identificazione di componenti cellulari specifiche dei batteri nel DOM [137, 138] indica che i batteri sono importanti produttori di DOM, anche se meno del 25% di questa materia è stato finora identificato e caratterizzato a livello biochimico [19, 20].

2) I precursori della mucillagine nel pool di DOC persistono ("immagazzinamento" di DOC) perché la loro complessità strutturale li rende essenzialmente inaccessibili agli enzimi idrolitici batterici. McCarthy *et al.* [139] hanno trovato che la maggior parte dell'azoto organico ad alto peso molecolare (> 1000 Da) negli oceani esiste nella forma di ammidi. Poiché è improbabile che queste sostanze si formino spontaneamente da altri composti, si suppone che rappresentino la frazione resistente alla degradazione di biomolecole complesse. Queste ultime potrebbero essere amminozuccheri acetilati, che rappresentano il secondo costituente delle biomolecole contenenti ammidi, che si trova frequentemente nei polimeri strutturali delle piante, animali e batteri (per esempio chitina e componenti della parete cellulare batterica, come mureine e lipolisaccaridi). I peptidoglicani in particolare contengono molte strutture inusuali che servono probabilmente a limitare l'idrolisi enzimatica. Alghe e batteri producono un numero notevole di polisaccaridi, adatti

a funzioni specifiche diverse. Azam *et al.* [104] hanno ipotizzato che la diversità strutturale di polisaccaridi complessi è tale che, da un punto di vista evolutivo, i batteri abbiano smesso di cercare di evolvere idrolasi che possano idrolizzarli tutti. Quindi i polisaccaridi tendono a persistere e potrebbero essere i precursori della mucillagine.

3) Nonostante una concentrazione di fosfati estremamente bassa, la produzione primaria in Adriatico è mantenuta ad alti livelli dall'efficiente remineralizzazione sostenuta sugli aggregati dall'elevata attività della fosfatasi alcalina e dalle 5'-nucleotidasi batteriche. Come risultato viene mantenuto ad alti livelli il rifornimento di carbonio fotosinteticamente fissato soggetto al metabolismo batterico nei precursori della mucillagine. L'interazione fra alghe e batteri può produrre microhabitat in cui avviene un'elevata rigenerazione di fosforo inorganico da parte di una fosfatasi batterica che non viene repressa neanche ad alte concentrazioni di fosforo (0,1 mM) [140]. In questo caso, il fosforo utilizzato dal fitoplancton è prontamente rigenerato e non diventa immediatamente limitante; questo implica anche che conoscere la concentrazione di fosforo inorganico non è sufficiente per prevedere il tasso di produzione primaria; inoltre, la rigenerazione di fosforo può essere ulteriormente accentuata in caso di aggregazione algale, a causa di un'intensificata interazione alghe-batteri.

4) I legami incrociati (*cross-linking*) dei polisaccaridi con i ponti Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> producono gel e aggregati che formano la mucillagine. La struttura delle comunità batteriche potrebbe rappresentare il "grilletto" per questa formazione poiché i batteri producono polisaccaridi di capacità gelificanti molto diverse.

La capacità gelificante di un polisaccaride prodotto da un organismo dominante e accumulato in gran quantità può essere molto importante. Un polisaccaride con elevate proprietà gelificanti può essere prodotto direttamente o attraverso la modificazione enzimatica di substrati preesistenti. In entrambi i casi, per quanto spiegato nei paragrafi precedenti sulla diversità delle attività enzimatiche e sulla diversità dei polisaccaridi prodotti da diverse specie batteriche, è molto importante la struttura della comunità.

5) L'attività batterica nella matrice gelatinosa produce gas (per esempio CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>) che fanno galleggiare la mucillagine in superficie.

## Conclusioni

Dopo la presentazione di diverse ipotesi sulla formazione della mucillagine, è stata descritta l'ipotesi formulata da Azam *et al.* [102], che per prima delinea una cornice teorica entro la quale il fenomeno della mucillagine è il risultato dei processi di interazione e

trasformazione degli organismi e della sostanza organica e inorganica, lungo uno spettro dimensionale continuo. In questo contesto, è centrale il ruolo dei batteri, che attraverso le loro attività sono in grado di controllare o quanto meno influenzare l'andamento di numerosi processi. La comprensione dei meccanismi alla base di questi processi permetterà in futuro di svolgere la necessaria attività di controllo e previsionale sui fenomeni della mucillagine.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia Raffaele Scenati per il suo contributo nell'elaborazione del manoscritto.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

#### BIBLIOGRAFIA

- De Gobbis D, Malej A, Fonda Umani S. The mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. A critical review of the present scientific hypothesis. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3): 373-82.
- Fonda Umani S, Ghirardelli E, Specchi M. *Gli episodi di "mare sporco" nell'Adriatico dal 1729 ai giorni nostri*. Trieste, Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia: Direzione Regionale dell'Ambiente; 1989. 178 p.
- Marchetti R. The problems of the Emilia Romagna coastal waters: facts and interpretations. In: Vollenweider R, Marchetti R, Viviani R (Ed.) *Proceedings of the international conference on Marine Coastal Eutrophication*. Bologna 21-24 March, 1990. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 21-3.
- Vollenweider RA, Rinaldi A. (Ed.). Marine mucilages, with special reference to mucilage events in the northern Adriatic Sea, the Tyrrhenian Sea and the North Sea. *Sci Tot Environ* 1995;165:1-230.
- Funari E, Azam F, Fonda Umani S, Pagnotta R (Ed.). State of the art and new scientific hypotheses on the phenomenon of mucilages in the Adriatic Sea. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3).
- Lancelot C. The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of North Sea. *Sci Tot Environ* 1995;165:83-102.
- van Rijssel M, Janse I, Noordkamp DJB, Gieskes WWC. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. *J Sea Res* 2000;43:297-306.
- Janse I, van Rijssel M, Ottema A, Gottschal JC. Microbial breakdown of *Phaeocystis mucopolysaccharides*. *Limnol Oceanogr* 1999;44(6):1447-57.
- Boalch GT, Harbour DS. Unusual diatom off the coast of south-west England and its effect on fishing. *Nature* 1977;269:687-8.
- Boalch GT. Changes in the phytoplankton of the western English Channel in recent years. *Br Phycol J* 1987;22:225-35.
- Innamorati M. Hyperproduction of mucilages by micro and macro algae in the Tyrrhenian Sea. *Sci Tot Environ* 1995;165: 65-81.
- Myklestad S. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J Exp Mar Biol Ecol* 1977;29:161-79.
- Myklestad S, Holm-Hansen O, Varum KM, Volcani BE. Rates of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *J Plankton Res* 1989; 11:763-73.
- Gotsis-Skretas O. Mucilage appearances in Greek waters during 1982-1994. *Sci Tot Environ* 1995;165:229-30.
- Stachowitsch M, Fanuko N, Richter M. Mucus aggregates in the Adriatic Sea: an overview of stages and occurrences. *PSZNI Mar Ecol* 1990; 11(4):327-50.
- Rinaldi A, Vollenweider RA, Montanari G, Ferrari CR, Ghetti A. Mucilages in Italian Seas: the Adriatic and Tyrrhenian Seas, 1988-1991. *Sci Tot Environ* 1995;165:165-83.
- Berthon J-F, Zibordi G, Hooker SB. Marine optical measurements of a mucilage event in the Northern Adriatic Sea. *Limnol Oceanogr* 2000; 45(2):322-7.
- Allredge AL, Crocker KM. Why do sinking mucilage aggregates accumulate in the water column? *Sci Tot Environ* 1995; 64:15-22.
- Wakeham SG, Lee C, Hedges JI, Hernes PJ, Peterson ML. Fate of major biochemicals in water column particles and sediments of the central Equatorial Pacific Ocean. *Geochim Cosm Acta* 1997;61:5363-69.
- Benner R. Cycling of dissolved organic matter in the ocean. In: Hessen DO, Tranvik LJ (Ed.). *Aquatic humic substances: ecology and biogeochemistry*. New York: Springer; 1998, 317-31.
- Pettine M, Puddu A, Totti C, Zoppini A, Artegiani A, Pagnotta R. Caratterizzazione chimica e biologica di mucillagini. *Biol Mar Suppl Notiz SIBM* 1993;1:39-42.
- Faganeli J, Gacic M, Malej A, Smoljaka N. Pelagic organic matter in the Adriatic Sea in relation to winter hydrographic conditions. *J Plankton Res* 1989;11:1129-41.
- Allredge AL, Silver MW. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progr Oceanogr* 1988; 20:41-82.
- Baldi F, Minacci A, Saliot A, Mejanelle L, Mozetic P, Turk V, Malej A. Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Mar Ecol Progr Ser* 1997;153:45-57.
- De Angelis F, Barbarulo MV, Bruno M, Volterra L, Nicoletti R. Chemical composition and biological origin of "dirty sea" mucilages. *Phytochem* 1993; 34(2):393-5.
- Posedel N, Faganeli J. Nature and sedimentation of suspended particulate matter during density stratification in shallow coastal waters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic). *Mar Ecol Progr Ser* 1991;77:135-45.
- Faganeli J, Kovac N, Leskovsek H, Pezdic J. Sources and fluxes of particulate organic matter in shallow waters characterized by summer macroaggregate formation. *Biogeochem* 1995;29:71-88.

28. Mecozzi M, Acquistucci R, Di Noto V, Pietrantonio E, Amici M, Cardarilli D. Characterization of mucilage aggregates in Adriatic and Tyrrhenian Sea: structure similarities between mucilage samples and the insoluble fractions of marine humic substance. *Chemosphere* 2001; 44:709-20.
29. Viviani R, Boni L, Cattani O, Milandri A, Pirini M, Poletti R, Pompei M. Fatty acids, chlorophylls and total silicon in mucilaginous aggregates collected in a coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia-Romagna in August 1988. *Sci Tot Environ* 1995;165:193-201.
30. Kovac N, Faganeli J, Sket B, Bajt O. Characterization of macroaggregates and photodegradation of their water soluble fraction. *Org Geochem* 1998; 29(5-7):1623-34.
31. Zelibor JL Jr, Romankiw L, Hatcher PG, Cowell RR. Comparative analysis of the chemical composition of mixed and pure cultures of green algae and their decomposed residues by <sup>13</sup>C nuclear resonance spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 1988;56:1051-60.
32. Derenne S, Le Berre F, Largeau C, Hatcher PG, Connan J, Raynaud JF. Formation of ultralaminae in marine kerogens via selective preservation of thin resistant outer walls of microalgae. *Org Geochem* 1992;19:345-50.
33. Aluwihare LI, Repeta DJ, Chen RF. A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface seawater. *Nature* 1997;387:166-9.
34. Leppard GG. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *Sci Tot Environ* 1995;165:103-31.
35. Mingazzini M, Colombo S, Ferrari GM. Application of spectrofluorimetric techniques to the study of marine mucilages in the Adriatic Sea: preliminary results. *Sci Tot Environ* 1995; 165:133-44.
36. Hama T, Yanagi K. Production and neutral aldose composition of dissolved carbohydrates excreted by natural marine phytoplankton populations. *Limnol Oceanogr* 2001;46(8): 1945-55.
37. Decho AW. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 1990;28:73-153.
38. Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. *J Phicol* 1993;29:537-66.
39. McCarthy M, Hedges J, Benner R. Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. *Mar Chem* 1996;55:281-97.
40. Rich JH, Ducklow HW, Kirchman DL. Concentrations and uptake of neutral monosaccharides along 140W in the equatorial Pacific: Contribution of glucose to heterotrophic bacterial activity and the DOM flux. *Limnol Oceanogr* 1996;41:595-604.
41. Sigleo AC. Biochemical components in suspended particles and colloids: carbohydrates in the Potomac and Patuxent estuaries. *Org Geochem* 1996;24:83-93.
42. Borch NH, Kirchman DL. Concentration and composition of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in seawater determined by HPLC-PAD. *Mar Chem* 1997;57:85-95.
43. Skoog A, Benner R. Aldoses in various size fractions of marine organic matter: implications for carbon cycling. *Limnol Oceanogr* 1997;42:1803-13.
44. Aluwihare LI, Repeta DJ. A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produced by marine algae. *Mar Ecol Progr Ser* 1999;186:105-17.
45. Mykkestad SM. Phytoplankton extracellular production and leakage with considerations on the polysaccharide accumulation. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):401-4.
46. Kovac N, Bajt O, Faganeli J, Sket B, Orel B. Study of macroaggregate composition using FT-IR and H-NMR spectroscopy. *Mar Chem* 2002;78: 205-15.
47. Biersmith A, Benner R. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter. *Mar Chem* 1998; 63:131-44.
48. Ittekkot V, Brockmann U, Michaelis W, Degens ET. Dissolved free and combined carbohydrates during a phytoplankton bloom in the northern North Sea. *Mar Ecol Progr Ser* 1981; 4:299-305.
49. Lancelot C. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the Southern bight of the North Sea. *Estuar Coast Shelf Sci* 1984; 18:65-77.
50. Sondeergard M, Schierup HH. Release of extracellular organic carbon during a diatom bloom in Lake Mosso: molecular weight fractionation. *Freshwater Biol* 1982;12:313-20.
51. Moller Jensen L. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition and bacterial assimilation. *Mar Ecol Progr Ser* 1983;11:39-48.
52. Roberts IS. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50:285-315.
53. Dudman WF. The role of surface polysaccharides in natural environments. In: Sutherland I (Ed.). *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. London: Academic Press; 1977. p. 357-414.
54. Weiner RM, Langille S, Quintero EJ. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J Ind Microbiol* 1995;15:339-46.
55. Weiner RM. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol* 1997;15(10):390-4.
56. Berry A, DeVault JD, Chakrabarty AM. High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Bacteriol* 1989;171(5):2312-7.
57. Zhan H, Lee CC, Leigh JA. Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J Bacteriol* 1991;173(22): 7391-4.
58. Mian FA, Jarman TR, Righelato RC. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1978; 134(2):418-22.
59. Jarman TR, Deavin L, Slocombe S, Righelato RC. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 1978;107:59-64.

60. Quintero EJ, Weiner RM. Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas* Strain MHS-3 in its attachment to surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1897-903.
61. Quintero EJ, Busch K, Weiner RM. Spatial and temporal deposition of adhesive extracellular polysaccharide capsule and fimbriae by *Hyphomonas* Strain MHS-3. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(4):1246-55.
62. Suci PA, Frolund B, Quintero EJ, Weiner RM, Geesey GG. Adhesive extracellular polymers of *Hyphomonas* MHS-3: interaction of polysaccharides and proteins. *Biofouling* 1995;9:95-114.
63. Quintero EJ, Weiner RM. Physical and chemical characterization of the polysaccharide capsule of the marine bacterium, *Hyphomonas* Strain MHS-3. *J Ind Microbiol* 1995;15:347-51.
64. Stoderegger K, Herndl GJ. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 1998;43(5):877-84.
65. Ogawa H, Amgai Y, Koike I, Kaiser K, Benner R. Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science* 2001;292:917-20.
66. Williams AG, Wimpenny JWT. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *J Gen Microbiol* 1977;102:13-21.
67. Czajka DR, Lion LW, Shuler ML, Ghiorse WC. Evaluation of the utility of bacterial extracellular polymers for treatment of metal-contaminated soils: polymer persistence, mobility, and the influence of lead. *Wat Res* 1997;31(11):2827-39.
68. Martin JP, Richards SJ. Decomposition and binding action of a polysaccharide from *Chromobacterium violaceum* in soil. *J Bacteriol* 1963;85:1288-94.
69. Martens DA, Frankenberger WT Jr. Decomposition of bacterial polymers in soil and their influence on soil structure. *Biol Fertility Soils* 1992;13(2):65-73.
70. UNESCO. *Proceedings of the meeting of the National Committee for the International Hydrobiological Programme of Mediterranean Countries*. Rome, 9-12 October 1978. Parigi: UNESCO; 1978. (IMP/MED/1).
71. De Gobbis D, Gilmartin M, Revelante N. An annotated nitrogen budget calculation for the Northern Adriatic Sea. *Mar Chem* 1986;20:159-77.
72. Pettine M, Patrolocco L, Camusso M, Crescenzo S. Transport of carbon and nitrogen to the Northern Adriatic Sea by the Po River. *Estuar Coast Shelf Sci* 1998;46:127-42.
73. Tartari G, Milan C, Elli M. Hydrochemistry of the nutrients. In: Atti del Convegno "Quality of the Po River waters during the 1990's". Ferrara 18-20 April. *Quad Ist Ric Acque* 1991;92:6.1-6.29.
74. Hopkins TS. Physical control of the eutrophic response in the northern Adriatic Sea, illustrated by a nitrogen budget from ELNA data. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):355-63.
75. Gacic M, Artegiani A, Paschini E, Russo A, Scarazzato P. Long term changes of oceanographic conditions in the northern Adriatic. In: Hopkins TS, Artegiani A, Cauwet G, De Gobbis D, Malej A (Ed.). *The Adriatic Sea*. Brussels: European Commission. (Ecosystem Research Report, 32 EUR 18834). 1999.
76. Crisciani F, Ferraro S, Raicich F. Evidence of recent climatic anomalies at Trieste (Italy). *Clim Change* 1994;28:365-74.
77. Marchetti R. Algal blooms and gel production in the Adriatic Sea. In: Bart H, Fegan L (Ed.). *Eutrophication-related phenomena in the Adriatic Sea and in other Mediterranean coastal zones*. Brussels: CEC. *Water Poll Res Rep* 1990;16:21-42.
78. De Gobbis D, Fonda Umani S, Franco P, Malej A, Precali R, Smodlaka N. Changes in the northern Adriatic ecosystem and the hypertrophic appearance of gelatinous aggregates. *Sci Tot Environ* 1995; 165:43-58.
79. Stumm W, Morgan J. *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. New York: Wiley Interscience; 1981 (2nd ed).
80. Alldredge AL, Gotschalk CC. Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities and formation of diatom aggregates. *Deep-Sea Res* 1989;36:159-71.
81. Alldredge AL, Passow U, Logan BE. The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res I* 1993;40:1131.
82. Alldredge AL. The potential role of particulate diatom exudates in forming nuisance mucilaginous scums. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):397-400.
83. De Gobbis D, Precali R, Ivancic I, Smodlaka N, Fucks D, Kveder S. Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *Int J Environ Poll* 2000;13(1-6):495-533.
84. Fonda Umani S, Franco P, Ghirardelli E, Malej A. Outline of oceanography and the plankton of the Adriatic Sea. In: Colombo G, Ferrari I, Ceccherelli VU, Rossi R (Ed.). *Marine eutrophication and population dynamics*. Fredensborg: Olsen & Olsen; 1992. p. 347-65.
85. Malej A, Harris RP. Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? *Mar Ecol Progr Ser* 1993;96:33-42.
86. Malej A. Gelatinous aggregates in the Northern Adriatic Sea. *Bull Inst Oceanogr* 1995;15:149-57.
87. Fajon C, Cauwet G, Lebaron P, Terzic S, Ahel M, Malej A, Mozetic P, Turk V. The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment. *FEMS Microbiol Ecol* 1999;29:351-63.
88. Obernosterer I, Herndl GJ. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Mar Ecol Progr Ser* 1995; 116:247-57.
89. Thornton DCO, Santilli D, Thake B. Prediction of sporadic mucilaginous algal blooms in the Northern Adriatic Sea. *Mar Poll Bull* 1999; 38(10):891-8.
90. Kaltenbock E, Herndl GJ. Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the northern Adriatic Sea. IV. Dissolved nutrients and the autotrophic community associated with marine snow. *Mar Ecol Progr Ser* 1992; 87:147-59.
91. Pettine M, Passino R, Chiaudani G. Le mucillagini nei mari italiani. Dobbiamo ripensare la strategia anti-eutrofizzazione? *Inquinamento* 1992;9:54-64.

92. Monti M, Welker C, Fonda-Umani S. Effects of synthetic zeolite "A" and polycarboxylates on quality and quantity of diatom mucous exudates. *Chemosphere* 1996;32(9):1741-54.
93. Kujawinski EB, Farrington JW, Moffett JW. Evidence for grazing-mediated production of dissolved surface-active material by marine protists. *Mar Chem* 2002;77:133-42.
94. Passow U, Alldredge AL, Logan BE. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep-Sea Res* 1994;41:335-7.
95. Vojvodic V, Cosovic B. Fractionation of surface active substances on the XAD-8 resin: Adriatic Sea samples and phytoplankton culture media. *Mar Chem* 1996;54:119-33.
96. Bochdansky A, Herndl GJ. Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the Northern Adriatic Sea. V. role of fecal pellets in marine snow. *Mar Ecol Progr Ser* 1992;89:297-303.
97. Najdek M. Unusual changes of zooplankton fatty acid composition in the Northern Adriatic during the 1991 mucilage event. *Mar Ecol Progr Ser* 1997;159:143-50.
98. Long RA, Fandino LB, Steward GF, Del Negro P, Ramani P, Cataletto B, Welker C, Puddu A, Fonda Umani S, Funari E, Azam F. Microbial response to mucilage in the Gulf of Trieste. *EOS, Transact Am Geophys Union* 1998;99(1):63-4.
99. Riemann L, Steward GF, Azam F. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl Environm Microbiol* 2000;66(2):578-87.
100. Baldi F, Malej A, Minacci A, Milanesi C, Vignani R. Is diatom lysis in extensive mucilage of Adriatic Sea due to a viral infection? Abstract from *Algal virus workshop*, Bergen Norway, 14-15 June 1998. <http://www.fou.uib.no/fd/1998/f/414001>.
101. Zutic V, Svetlicic V. Interfacial processes. In: Wangersky P. (Ed.). *The Handbook of Environmental Chemistry* 2000; vol. 5 chap. 6 p.149-65.
102. Azam F, Fonda-Umani S, Funari E. Significance of bacteria in the mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):411-9.
103. Azam F, Smith DC, Carlucci AF. Bacterial transformation and transport of organic matter in the southern California bight. *Progr Oceanogr* 1992;30:151-66.
104. Azam F, Smith DC, Steward GF, Hagstrom A. Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycle. *Microb Ecol* 1993; 28:167-79.
105. Azam F, Smith DC, Long RA, Steward GF. Bacteria in oceanic carbon cycling as a molecular problem. In: Joint I (Ed.). *Molecular ecology of aquatic microbes*. Berlin: Springer Verlag; 1995. (NATO ASI Series) G38. p. 39-54.
106. Chin W-C, Orellana MW, Verdugo P. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 1998;391:568-72.
107. Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Progr Ser* 1983;10:257-63.
108. Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickness. *Science* 1998;280:694-6.
109. Stumm W, Morgan JS. *Aquatic chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1995 (third ed.).
110. Koike I, Hara S, Terauchi K, Kogure K. Role of sub-micrometre particles in the ocean. *Nature* 1990;345:242-4.
111. Wells ML, Goldberg ED. Occurrence of small colloids in sea water. *Nature* 1991;353: 342-4.
112. Long RA, Azam F. Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat Microb Ecol* 1996; 10:213-21.
113. Wells ML, Goldberg ED. Colloids aggregation in seawater. *Mar Chem* 1993;41:353-8.
114. Wells ML, Goldberg ED. The distribution of colloids in the north Atlantic and Southern Ocean. *Limnol Oceanogr* 1994; 39(2):286-302.
115. Longhurst AR, Koike I, Li WKW, Rodriguez J, Dickie P, Kepkay P, Partensky F, Bautista B, Ruiz J, Wells ML, Bird DF. *Deep-Sea Res* 1992;39:1-7.
116. Zutic V, Plese T, Tomaic J, Legovic T. Electrochemical characterization of fluid vesicles in natural waters. *Mol Cryst Liq Cryst* 1984;113:131-45.
117. Logan BE, Passow U, Alldredge AL, Grossart HP, Simon M. Rapid formation and sedimentation of large aggregates is predictable from coagulation rates (half-lives) of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Res II* 1995;42(1):203-14.
118. Ivošević N, Svetlicic V, Kovac S, Kraus R, Zutic V, Furic K. Bacterial and biophysical aspects of macroaggregation phenomena in the Northern Adriatic Sea. *Abstract from AGU Ocean Sciences Meeting*. San Diego February 9-13; 1998. <http://www.agu.org/meetings/waisos98.html>.
119. Zutic V, Legovic T. A film of organic matter at the fresh-water/sea-water interface of an estuary. *Nature* 1987;328:612-4.
120. Marty J-C, Zutic V, Precali R, Saliot A, Cosovic B, Smoldlaka N, Cauwet G. Organic matter characterization in the Northern Adriatic Sea with special references to the sea-surface microlayer. *Mar Chem* 1988;25(3):243-64.
121. Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61(1):47-64.
122. Pomeroy LR. The ocean's food web, a changing paradigm. *Biosci* 1974;24:499-504.
123. Pomeroy LR, Wiebe WJ, Deibel D, Thompson RJ, Rowe GY, Pakulski JD. Bacterial responses to temperature and substrate concentration during the Newfoundland spring bloom. *Mar Ecol Progr Ser* 1991;75:143-59.
124. Blackburn N, Fenchel T, Mitchell J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria. *Science* 1998;282:2254-6.
125. Bidle KD, Azam F. Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages. *Nature* 1999;397:508-12.
126. Azam F, Smith DC. Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state. A mechanistic view. In: Demers S (Ed.). *Particle analysis in oceanography*. Berlin: Springer Verlag; 1991. (NATO ASI Series, G27). p. 231-6.
127. Smith DC, Steward GF, Long RA, Azam F. Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res II* 1995;42(1):75-97.

128. Brussaard CPD, Riegman R, Noordeloos AAM, Cadee GC, Witte H, Kop AJ, Nieuwland G, Van D'Uyl FC, Bak RPM. Effects of grazing, sedimentation and phytoplankton cell lysis on the structure of a coastal pelagic food web. *Mar Ecol Progr Ser* 1995;123:259-71.
129. Graneli E, Carlsson P, Turner JT, Tester PA, Bechemin C, Dawson R, Funari E. Effects of N:P:Si-ratios and zooplankton grazing on phytoplankton communities in the northern Adriatic Sea. I. Nutrient, phytoplankton biomass, and polysaccharide production. *Aquat Microb Ecol* 1999;18:37-54.
130. Martinez J, Smith DC, Steward GF, Azam F. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat Microb Ecol* 1996;10:223-30.
131. Smith DC, Simon M, Alldredge AL, Azam F. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 1992;359:139-42.
132. Cole JJ, Findlay S, Pace ML. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar Ecol Progr Ser* 1988;43:1-10.
133. Heissenberger A, Leppard GG, Herndl GJ. Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(12):4521-8.
134. Kiorboe T, Jackson GA. Marine snow, organic solute plumes and optimal chemosensory behaviour of bacteria. *Limnol Oceanogr* 2001;46(6):1309-18.
135. Herndl GJ, Faganeli J, Fanuko N, Peduzzi P, Turk V. Role of bacteria in the carbon and nitrogen flow between water-column and sediment in a shallow marine bay (Bay of Piran, northern Adriatic Sea). *PSZNI Mar Ecol* 1987; 8(3):221-36.
136. Manganelli M, Funari E, Scenati R, Azam F. DOC release and utilization by natural bacterial assemblages from Northern Adriatic Sea (Italy). *Abstract from 7th European Marine Microbiology Symposium*. Nordwijkerhout, The Netherlands, 17-22 September 2000. <http://www.nioz.nl/emms/abstracts.pdf>pg140.
137. Tanoue E, Nishiyama S, Kamo M, Tsugita A. Bacterial membranes-possible source of a major dissolved protein in seawater. *Geochim Cosmochim Acta* 1995;59(12):2643-8.
138. McCarthy MD, Hedges JI, Benner R. Major Bacterial Contribution to Marine Dissolved Organic Nitrogen. *Science* 1998; 281:231-4.
139. McCarthy M, Pratum T, Hedges J, Benner R. Chemical composition of dissolved organic nitrogen in the ocean. *Nature* 1997; 390:150-4.
140. Ammerman JW, Azam F. Bacterial 5'-Nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science* 1985;227:1338-40.

## Il ruolo degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali nel controllo del rischio microbiologico e tossicologico associato ai prodotti della pesca

Maura FERRARI, Marina Nadia LOSIO, Barbara BERTASI, Chiara PINONI,  
Elena COSCIANI, Paolo BONI, Enrico PAVONI e Silva RUBINI

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna,  
Brescia e Ferrara, Italia*

**Riassunto.** - Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali rappresentano una cospicua rete di controllo nell'intero territorio nazionale la cui attività si estrinseca in ambito sanitario ed agro-alimentare. Come conseguenza del recente sviluppo dell'acquacoltura, la salubrità dei prodotti ittici sta assumendo importanza sempre più rilevante. A tal fine, scopo della ricerca svolta è stato l'allestimento di metodi diagnostici in grado di rilevare eventuali contaminazioni virali, nonché il possibile impiego di metodi *in vitro* atti a rilevare differenti tossine. I risultati conseguiti hanno consentito di standardizzare metodi di biologia molecolare in associazione all'isolamento in colture cellulari per l'accertamento di contaminazioni/infezioni da parte del virus dell'epatite A e dei più comuni enterovirus. Sono inoltre stati selezionati specifici tipi di colture cellulari in grado di differenziare varie classi di tossine. I metodi allestiti potranno consentire il controllo sistematico e preventivo dei prodotti ittici.

**Parole chiave:** Istituti Zooprofilattici, attività diagnostica, molluschi eduli lamellibranchi, indagini virologiche, tossicologia *in vitro*.

**Summary** (*Role of the Istituti Zooprofilattici Sperimentali in controlling the microbiological and toxicologic risks related to seafood*) - The "Istituti Zooprofilattici" are an important network whose main function is the monitoring of animal health as well as food. As a result of the recent improvements in aquaculture technology interest in the safety of seafood is increasing. Therefore, the purpose of this study was to set up diagnostic methods for the detection of virus contamination, as well as the use of *in vitro* techniques able to identify the different toxins. The results have allowed the development of molecular biology assays which, together with the isolation in cell cultures, can detect contaminations/infections by the hepatitis A virus and the most common enteroviruses. Moreover, specific selected cell lines have led to the detection of different toxins. These laboratory methods will be used in order to control seafood safety.

**Key words:** Istituti Zooprofilattici, diagnosis activities, shellfish quality, virologic analyses, *in vitro* toxicology.

### Introduzione

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), enti sanitari di diritto pubblico, costituiscono, sulla base del DL.vo no. 270/93, aziende con competenza regionale o inter-regionale, organizzate in una sede centrale, alla quale fanno capo le strutture amministrative e i laboratori specializzati, e in sezioni periferiche che di norma sono ubicate sul territorio di ciascuna provincia italiana.

Gli IZS operano sulla base della programmazione regionale e nazionale, effettuando ricerche e fornendo prestazioni di laboratorio e produzioni in termini di reagenti e presidi immunizzanti utili e necessari alle azioni di sanità pubblica veterinaria. Il controllo e la

profilassi delle malattie parassitarie, infettive e diffuse del patrimonio zootecnico, il perfezionamento delle condizioni di allevamento e il perseguimento del benessere animale, il controllo e il miglioramento delle produzioni zootecniche, l'accertamento delle caratteristiche di sanità, salubrità e qualità degli alimenti, il supporto tecnico scientifico agli operatori del Servizio Sanitario Nazionale (SSN), la consulenza ad allevatori ed operatori del comparto agro-alimentare costituiscono solo una parte dei compiti che gli IZS sono chiamati a svolgere.

L'organizzazione è regionalmente differenziata per far fronte alle diverse caratteristiche e vocazioni zootecniche, alimentari e socio-economiche presenti sul territorio; gli IZS tuttavia operano a livello nazionale

fornendo prestazioni comuni e uniformi su tutto il Paese sulla base del coordinamento operato dal Ministero della Salute e dell'Istituto Superiore di Sanità. Nel loro insieme le strutture centrali degli IZS e le 88 sezioni sparse sul territorio costituiscono di fatto la più formidabile rete di controllo oggi esistente a livello comunitario.

Rappresentano ulteriori elementi di forza e di valorizzazione della rete degli IZS l'esistenza al loro interno di oltre 20 centri di referenza nazionali o internazionali (FAO e OIE), che fungono da strutture di riferimento per l'intera rete e di raccordo internazionale. E' comunque da sottolineare come tutti e 10 gli Istituti operino in strutture che forniscono esami e prestazioni riconosciute internazionalmente sulla base delle norme UNI-EN CEI 17025 verificate da organismi terzi secondo norme UNI EN-45003.

In considerazione degli oltre 2000 chilometri di sviluppo delle coste marine italiane, ancor più per l'importanza dell'economia legata al mare di intere regioni, che in talune realtà provinciali contemplan una economia totalmente dipendente dalle risorse marine, non possono non rientrare tra gli interessi di tutti e 10 gli IZS i problemi di sanità pubblica collegati alla idrobiologia marina, pesca e allevamento delle specie ittiche, controllo dei prodotti della pesca e perseguimento di garanzie di sanità, salubrità e qualità dei prodotti. Tali interessi, preminenti per non poche sezioni diagnostiche provinciali, si concretizzano nelle prestazioni di laboratorio, nella consulenza a operatori del SSN ed economici, nella pianificazione di ricerche tese ad estendere la gamma dei controlli finalizzati alle garanzie di sicurezza alimentare da fornire al consumatore relativamente ai prodotti di origine nazionale e a quelli di importazione.

In tale ambito, per quanto riguarda l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, lo sviluppo delle coste di quest'ultima regione e l'importanza della pesca e dei prodotti derivati per le popolazioni e l'economia emiliano-romagnole hanno indotto a volgere particolare attenzione a tali problematiche, accentrando parte delle ricerche e delle prestazioni svolte presso la sede di Brescia, e la maggior parte dell'attività riguardante le tematiche del mare e della pesca, da parte di intere sezioni quali Ferrara e Rimini.

Su questa base, anche nell'ambito di laboratori della Sede prevalentemente rivolti ad attività di ricerca, è sorta l'esigenza di indirizzare l'interesse a tali settori, con particolare riferimento alla messa a punto di metodi di controllo in ambito virologico e studio di metodi alternativi nel settore tossicologico.

E' noto infatti come, mentre siano consolidati i metodi diagnostici nei confronti di microrganismi di natura batterica, ancora a tutt'oggi non sia contemplata la ricerca di eventuali contaminanti virali responsabili,

secondo quanto riportato in letteratura, di episodi clinici non solo sporadici, ma anche epidemici [1]. Inoltre, in considerazione della richiesta legislativa, supportata da ragioni etico-scientifiche, di sostituire gli animali da laboratorio nella sperimentazione tossicologica, l'interesse è stato volto alla messa a punto di metodi alternativi sia per la evidenziazione di tossine comunemente presenti nei nostri mari e caratterizzate da elevata variabilità (DSP) che di tossine riscontrabili nel nostro Paese come conseguenza dell'intensificazione degli scambi commerciali (tetrodotossine e ciguatossine). Obiettivi pertanto della ricerca svolta sono stati la messa a punto di metodi diagnostici rapidi ed attendibili da applicarsi in indagini virologiche oltre che la selezione di colture cellulari in grado di evidenziare, tramite sistemi biologici *in vitro*, tossine di differente natura.

## Materiali e metodi

### *Controllo di virus enterici nei molluschi bivalvi*

**Campioni.** - I campioni, rappresentati da molluschi bivalvi (*Mitylus Galloprovincialis*), provenienti da pescherie locali sono stati utilizzati direttamente o allevati in acquari della capacità di 50 litri e contenenti sale marino di grado scientifico (*Coralife®*) dissolto in acqua deionizzata. In ciascun acquario venivano immessi 30 molluschi mantenuti nelle migliori condizioni di filtrazione (temperatura di 13-18 °C, salinità 1,020 kg/l [2], contaminati sperimentalmente con gli agenti virali di seguito riportati.

**Virus.** - L'indagine ha riguardato virus appartenenti alla famiglia Picornaviridae e Caliciviridae. In particolare, per quanto concerne il gruppo degli enterovirus sono stati considerati poliovirus tipo 1, 2, 3, coxsackievirus B5, echovirus tipo 30. Ciascuno di essi è stato propagato in linee cellulari rappresentate rispettivamente da Intestine 407 (*embryonic human intestine*), BGM (*buffalo green monkey*), LLCMK2 (*rhesus monkey kidney*), MRC5 (*embryonic human lung*).

Il virus dell'epatite A, ceppo citopatogeno HM175, è stato coltivato sulla linea cellulare di primate FrhK-4 (*fetal rhesus monkey kidney*) [3].

Per ogni virus è stato allestito uno stock di riferimento ed il titolo infettante accertato previa diluizione seriale ed inoculazione delle diverse diluizioni, nel substrato cellulare sensibile. Il titolo è stato calcolato secondo la formula di Reed e Muench [4].

**Prove sperimentali.** - Sono state condotte con due differenti metodi:

a) aggiungendo diluizioni seriali (da  $10^{1.50}$  a  $10^{7.50}$  dosi citopatiche<sub>50</sub>-DCP<sub>50</sub>/ml) della sospensione virale a 10 g di omogenato di mollusco (contaminazione per assorbimento);

b) contaminando, con le medesime diluizioni virali menzionate, i molluschi allevati negli acquari [1]. La de-terminazione dell'avvenuta contaminazione è stata eseguita su campioni di molluschi raccolti dopo 24 ore [5].

L'esito della infezione è stato determinato mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) previa trascrizione dell'RNA virale in cDNA oltre che mediante accertamento dell'infettività del virus dimostrata dalla replicazione in colture cellulari [6].

Allo scopo di determinare non solo la sensibilità della reazione, ma anche la specificità, 25 g di mollusco sono stati contaminati con miscele di virus dell'epatite A e poliovirus tipo 1 alla concentrazione di  $10^{3.50} \text{DCP}_{50}/\text{ml}$  per entrambi i virus. Sui campioni di omogenato e sui molluschi contaminati artificialmente sono state eseguite reazioni di RT-PCR specifiche per i due tipi di virus impiegati.

*Estrazione virale.* - È stata condotta omogenizzando 25 g di mollusco diluito in 20 ml di tampone glicina (0,05 M, pH 9,2). Dopo centrifugazione del campione a  $5500 \times g$  per 30 min il supernatante, in volume di circa 30 ml, è stato ricentrifugato alla stessa velocità e per lo stesso periodo di tempo ed il supernatante ottenuto (volume di 12 ml) è stato addizionato a polietilene glicole 8000 (PEG) in rapporto 1:4 e lasciato a contatto per 12 ore a  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Il campione è stato quindi sottoposto ad una ulteriore centrifugazione alle medesime condizioni indicate ed il sedimento risospeso in 2 ml di PBS (phosphate buffered saline) e ricentrifugato alla stessa velocità per 30 min [7].

*Estrazione dell'RNA.* - L'RNA totale è estratto dalla matrice ottenuta utilizzando un kit commerciale Nucleospin®RNAII kit (Macherey-Nagel) basato su:

a) lisi della membrana cellulare e del capsido virale con reagenti contenenti guanidina isotiocianato;

b) legame selettivo tra l'acido nucleico e la membrana di silice attivata all'interno di un'apposita colonna;

c) eluizione dell'RNA tramite acqua priva di RNase e DNase [8].

*Primers ed RT-PCR.* - Per rilevare la presenza dell'RNA del virus dell'epatite A sono stati selezionati *primers* specifici della zona VP1-VP3 del capsido virale [9], mentre per evidenziare una contaminazione da enterovirus sono stati utilizzati *primers* della regione 5' non codificante comune ad oltre 47 sierotipi di enterovirus [10]. È stata esclusa una reattività crociata con altri virus enterici utilizzando il programma BLAST (NCBI).

L'RNA virale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando un kit commerciale (Gene Amp RNA PCR kit; Applied Biosystem) [11]. Per il virus dell'epatite A

è stata adottata una reazione di RT-seminested-PCR, mentre per gli enterovirus una RT-nested-PCR. La reazione di retrotrascrizione è stata ottimizzata in una miscela di 20  $\mu\text{l}$  contenente 3  $\mu\text{l}$  di acido nucleico estratto e 17  $\mu\text{l}$  di miscela di reazione (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM di ogni deossinucleotide trifosfato, 2,5 mM esameri random, 20U inibitore dell'RNasi e 50U di trascrittasi inversa (MuLV Moloney murine leukemia virus).

Per la ricerca di virus enterici è stata messa a punto una prima amplificazione utilizzando 10  $\mu\text{l}$  di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione e 40  $\mu\text{l}$  della miscela di reazione (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM deossinucleotidi trifosfato, 0,5  $\mu\text{M}$  AV1 o ent 1, 0,5  $\mu\text{M}$  di AV2 o ent 2, 1,25U Taq DNA polimerasi e acqua DNase/RNase free). Per la ricerca del virus dell'epatite A la miscela è stata incubata a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  per 5', sono stati impostati 40 cicli (35'' a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1' a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1'15'' a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ ), l'estensione finale è avvenuta per 7' a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Per la ricerca di enterovirus è stato impostato un primo ciclo a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  per 2',  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $72^\circ\text{C}$  per 1'45'' seguito da 29 cicli a  $92 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1'45'' per terminare con un ultimo ciclo  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1',  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  per 1'  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  e l'estensione a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  per 5'. Dieci  $\mu\text{l}$  del prodotto ottenuto dall'amplificazione sono stati addizionati a 40  $\mu\text{l}$  della miscela alle medesime concentrazioni dei reagenti utilizzati nella prima reazione e *primers* interni ai due precedentemente selezionati, AV2-AV3 e ne-ent1- ne-ent2 (Tab. 1).

La seconda amplificazione per il virus dell'epatite A (*seminested*) è stata impostata con una denaturazione di 5' a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguita da 30 cicli ( $94 \text{ }^\circ\text{C}$  per 30'',  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  per 30'',  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  per 30''). L'estensione finale è stata di 7' a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . I cicli impostati per la seconda amplificazione per gli enterovirus (*nested*) sono stati uguali a quelli utilizzati nella prima amplificazione [7]. I *primers* utilizzati sono riportati nella Tab. 1.

*Inoculazione nelle colture cellulari.* - I campioni in cui è stata evidenziata la presenza di RNA del virus dell'epatite A tramite la reazione di biologia molecolare sono stati inoculati nella linea cellulare FrhK-4. A tal fine, l'omogenato di mollusco, diluito 1:10 in PBS (*phosphate saline buffer*) e addizionato della soluzione di antibiotici all'1% (penicillina 1000 UI/ml, streptomina 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e amphotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) è stato inoculato nella linea cellulare menzionata allestita in piastre a 24 pozzetti in ragione di 100  $\mu\text{l}$  per pozzetto. Dopo assorbimento a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , protratto per 30' per gli enterovirus, sino a 60'-120' per la ricerca del virus dell'epatite A, la coltura cellulare è stata addizionata del terreno colturale in presenza di una percentuale ridotta di siero fetale bovino (3% v/v). L'incubazione è stata quindi protratta per un periodo di circa 7 giorni (enterovirus) e 3 settimane (epatite A) a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  valutando

**Tabella 1.** - Primers selezionati per la ricerca del virus dell'epatite A e di enterovirus nei molluschi bivalvi

Virus	Oligonucleotidi	Sequenza (5'-3')	Posizione	Lunghezza amplificato
HAV	AV1	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG	2390-2414	247
	AV2	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	2167-2192	
	AV3	CGGTACCTTTGTACGCCTGT	2358-2377	
CV B4*	Ent1	CGGTACCTTTGTACGCCTGT	64-83	540
POLIO1	Ent2	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	578-597	
POLIO1	Ne-ent1	TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTA	430-450	
CV B4*	Ne-ent2	GAAACACGGACACCCAAAGTA	547567	

\* sequenza riferita al coxsackievirus B4.

quotidianamente la eventuale comparsa di effetto citopatico (ECP) [3]. La coltura è stata quindi congelata e scongelata per due volte. Il criolisato è stato raccolto e centrifugato (2000 x g per 15') ed il supernatante analizzato in RT-PCR per confermare la presenza del virus [6]. L'identificazione degli enterovirus eventualmente isolati è stata invece effettuata mediante reazione di siero-neutralizzazione condotta con sieri immuni specifici allestiti nel nostro laboratorio.

*Analisi di campioni provenienti dal campo.* - Complessivamente nel periodo 2000-2002 sono stati analizzati 800 campioni di molluschi provenienti principalmente da aree del mare Adriatico. L'indagine relativa all'accertamento della contaminazione da enterovirus ha avuto inizio dall'anno 2001 e 435 sono stati i campioni esaminati.

#### Messa a punto di metodi diagnostici basati sull'impiego di colture cellulari per la evidenziazione di tossine algali nei molluschi bivalvi

##### *Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)*

*Campioni.* - L'analisi è stata condotta su campioni di molluschi pervenuti nel periodo 1999-2000 e analizzati secondo la metodologia classica che prevede l'impiego di animali da laboratorio (topi) e l'accertamento della mortalità dell'animale entro 4-24 ore dall'inoculo. L'attenzione è stata principalmente volta alle tossine del gruppo DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*) in quanto maggiormente diffuse nei mari italiani. Tale indagine viene eseguita routinariamente presso la Sezione diagnostica di Ferrara del nostro Istituto Zooprofilattico.

*Prova biologica.* - La prova biologica ufficiale è stata eseguita inoculando per via intraperitoneale (i.p.) 3 topi con 1 ml di omogenato di mollusco ottenuto secondo la metodica di Yasumoto (DM 31/07/1995;

*GU serie generale* n. 279 del 29/11/1995). La verifica della morte del topo è stata effettuata, inizialmente, entro i limiti delle 5 ore di tempo previste dal decreto legislativo (analisi eseguite presso la Sezione di Ferrara); tale periodo di osservazione è stato successivamente prolungato sino a 24 ore. La morte di almeno due topi entro i limiti di tempo previsti inizialmente (5 ore) è indice della presenza di tossine nel campione in esame.

*Linee cellulari.* - In relazione ai differenti meccanismi di azione e dei diversi organi bersaglio delle sostanze in esame e consistenti nella inibizione delle fosfatasi (acido ocaidaico) e nel tropismo per la sede cardiaca (yessotossina), sono stati selezionati diversi tipi di linee cellulari, allo scopo di verificarne la differente sensibilità nei confronti dei due gruppi di sostanze ad attività tossica [19, 20]. In particolare, per l'indagine relativa alla ricerca delle tossine del gruppo DSP sono state utilizzate la linea cellulare KB (*human epidermoid carcinoma*), nota in letteratura poiché altamente sensibile all'azione dell'acido ocaidaico e la linea di cellule H9C2 (*rat heart mioblast*) di origine cardiaca.

*Preparazione dei campioni.* - L'estratto ottenuto omogenando 25 g di ciascun campione di mollusco (5 g) è stato addizionato a 250 µl di dimetilsolfossido (DMSO), in grado di solubilizzare le tossine (liposolubili). Il campione è stato quindi diluito 1:100 in terreno di coltura MEM (*minimum essential medium*).

*Inoculazione nelle colture cellulari.* - Entrambe le linee cellulari selezionate sono state inoculate in piastre a 96 pozzetti incubate a 37 °C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 48 ore di incubazione le colture cellulari, previo allontanamento del terreno colturale, sono state inoculate con i campioni in esame in ragione di 100 µl per ciascun pozzetto. Le stesse sono quindi state reincubate a 37 °C per 3 ore. La verifica della vitalità cellulare è stata eseguita mediante il test MTT [21].

*Analisi dei risultati.* - L'analisi statistica, al fine di una futura ed auspicabile validazione, è stata eseguita su 96 campioni ed i risultati conseguiti sono stati analizzati mediante il test di correlazione lineare di Pearson per verificare l'effettiva corrispondenza degli esiti conseguiti nelle prove *in vivo/in vitro*.

*Tetrodotossina (TTX)*

L'espansione dei mercati internazionali ha favorito l'introduzione ed il commercio di specie ittiche esotiche potenzialmente pericolose; in particolare i pesci palla (Diodontidi e Tetrodontidi) possono fungere da serbatoio della tetrodotossina, prodotta da microrganismi acquatici, in grado di bloccare i canali del sodio a livello della membrana cellulare. Obiettivo del lavoro svolto è stato quello di valutare la sensibilità di alcune linee cellulari nei confronti della TTX.

*Linee cellulari.* - Sono state utilizzate due linee cellulari originate da neuroblastoma, Neuro 2A ed Na C 1300, rispettivamente di origine umana e murina. La loro scelta è stata motivata dal fatto che le cellule neuronali e muscolari presentano, secondo dati di letteratura [21-23], una maggiore espressione dei canali del sodio.

*Prodotti in esame.* - Per lo studio è stata impiegata la TTX come sostanza pura (Sigma Aldrich s.r.l.) e, quali antagonisti dell'azione della TTX, si è fatto ricorso alla veratridina ed oubaina (Sigma Aldrich s.r.l), rispettivamente allo 0,02 mM e 0,5 mM per le quali l'azione antagonista è attribuibile all'aumento della permeabilità cellulare al sodio e al blocco della pompa sodio/potassio [21, 22].

*Trattamento delle cellule.* - Le colture cellulari, allestite in piastre a 96 pozzetti ed incubate, come in precedenza, a 37 °C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 48 ore sono state trattate con soluzioni miste contenenti TTX a differenti concentrazioni (da 100 a 0,001 ng/pozzetto) ed in presenza della veratridina ed oubaina alle due concentrazioni sopra indicate. La vitalità cellulare è stata valutata a distanza di 24 ore dal trattamento mediante il test MTT.

**Risultati**

*Controllo nei confronti dei virus enterici nei molluschi bivalvi*

Le prove sperimentali svolte hanno consentito di evidenziare come la reazione di RT-PCR con *primers* specifici sia risultata in grado di poter evidenziare la presenza di acido nucleico virale nei molluschi conta-

minati sperimentalmente. Essa ha inoltre permesso di rilevare tale contaminazione sino alla concentrazione di 10 DCP<sub>50</sub> evidenziando quindi un'elevata sensibilità della metodica.

I *primers* utilizzati hanno consentito di poter differenziare in maniera specifica le sequenze genomiche del virus dell'epatite A da quelle degli enterovirus suggerendo la possibilità di poter rilevare contaminazioni congiunte da parte di differenti agenti virali.

In tutte le prove condotte contaminando sperimentalmente è stata inoltre dimostrata una perfetta correlazione fra presenza di acido nucleico virale e virus infettante.

*Analisi dei campioni provenienti dal campo.* - L'indagine relativa alla ricerca del virus dell'epatite A ha evidenziato come 38 campioni, degli 800 esaminati, siano risultati contaminati da parte di questo virus (4,75%) (Tab. 2) e come soltanto in 4 (10,5% di 38) fosse presente virus completamente attivo, come dimostrato dalla replicazione virale in coltura cellulare.

Per quanto concerne gli enterovirus soltanto 5 campioni sono risultati positivi (1,14%); di questi due (40% di 5) sono risultati infettanti rispettivamente sulle linee cellulari MRC-5 e Intestine 407. E' in corso la tipizzazione mediante reazione di siero-neutralizzazione.

*Messa a punto di metodi diagnostici basati sull'impiego di colture cellulari per l'evidenziazione di tossine algali nei molluschi bivalvi*

*Diarrhetic shellfish poisoning (DSP).* - Gli esiti delle indagini svolte hanno evidenziato un progressivo incremento della sensibilità della linea cellulare H9C2 rispetto al substrato KB e l'analisi in HPLC ha suggerito come tale comportamento potesse essere attribuibile ad una maggiore presenza di yessotossina rispetto all'acido ocaidaico. Fra i substrati cellulari impiegati la linea KB è risultata inizialmente provvista di elevata sensibilità in quanto la percentuale di corrispondenza con la prova biologica è risultata del 62% nei campioni esaminati (n. 65) nel 1999.

**Tabella 2.** - Risultati del controllo sui virus enterici in molluschi (mediante RT-PCR)

Anno	Campioni n.	HAV		Enterovirus	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
2000	365	32	333	ne	ne
2001	342	2	340	4	170
2002	93	4	89	1	92
<b>Tot.</b>	<b>800</b>	<b>38</b>	<b>762</b>	<b>5</b>	<b>252</b>

ne = non eseguito.

Viceversa, l'analisi condotta nell'anno 2000 ha posto in rilievo una maggiore percentuale di corrispondenza con la prova *in vivo* condotta con la linea H9C2 e risultata pari all'85%. Tale comportamento suggerisce una possibile variazione del tipo di tossina presente che è rilevata principalmente da questo secondo tipo cellulare. Si sottolinea inoltre come la percentuale di correlazione calcolata debba essere ritenuta sottostimata in quanto campioni risultati negativi alla prova biologica e contenenti tossine, come invece accertato in HPLC, sono risultati positivi nella prova *in vitro*.

Il coefficiente di correlazione ( $r$ ), calcolato su 96 campioni esaminati nella linea cellulare H9C2, è risultato altamente significativo e pari a 0,888, ( $p = 0,001$ ) con un indicatore di linearità ( $R^2$ ) superiore alla soglia minima richiesta del 75% (89%). Tali valori hanno permesso di calcolare il valore massimo di percentuale di vitalità cellulare oltre il quale si osserva la morte del topo che è risultato del 50,2%.

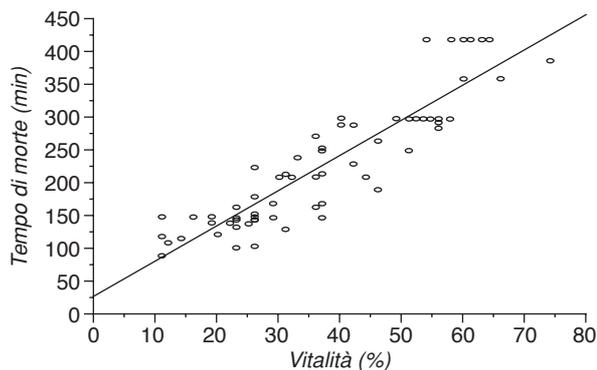
In una seconda analisi statistica sono stati considerati 78 campioni dei 96 originali essendo stati esclusi quelli che presentavano un tempo di sopravvivenza dell'animale inoculato di 500 min. Il coefficiente  $r$  è risultato pari a 0,914 e l' $R^2$  all'84% e la percentuale corrispondente alla morte del 50% degli animali e corrispondente al 50,4% di vitalità cellulare (Fig. 1).

*Tetrodotossina (TTX)*. - La linea cellulare Neuro 2A si è dimostrata più sensibile all'azione della TTX rispetto alle cellule Na C 1300. In particolare, la concentrazione di TTX di 4,5 ng/pozzetto, pari a  $0,03 \times 10^{-3}$  ng/ml, è risultata in grado di indurre una mortalità del 50% delle cellule trattate (IC<sub>50</sub>) (Fig. 2).

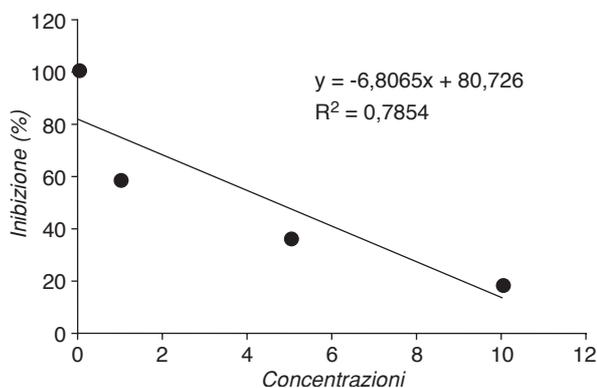
Tale parametro è stato calcolato sulla base della protezione indotta dalla veratridina ed oubaina nei confronti della tetrodotossina. Lo studio effettuato ha permesso di confermare la linea cellulare Neuro 2A come sistema biologico *in vitro* potenzialmente utilizzabile nei metodi di *screening* per la ricerca della TTX, essendo dotato di una sensibilità più elevata rispetto all'animale da laboratorio.

### Conclusioni

I risultati delle prove svolte hanno consentito di evidenziare come la reazione RT-PCR possa rappresentare un valido strumento per la diagnosi di contaminazione di virus enterici nei molluschi bivalvi [15]. Le prove sperimentali condotte hanno infatti evidenziato una elevata sensibilità e specificità della prova e, di conseguenza, una sua attendibilità [11]. Tuttavia, mentre sperimentalmente si è evidenziata una perfetta corrispondenza fra la reazione di biologia molecolare, che consente di evidenziare sequenze nucleotidiche



**Fig. 1.** - Correlazione tra dati ottenuti *in vivo/in vitro* sulla linea cellulare H9c2 a seguito di trattamenti con omogenati contaminati da tossine DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*).



**Fig. 2.** - IC<sub>50</sub> ottenuta sulla linea cellulare Neuro 2A a seguito del trattamento combinato veratridina-oubaina-TTX (tetrodotossina).

virali, e la propagazione sulle colture cellulari, che è direttamente correlabile alla presenza di virus attivo e completamente infettante, nei campioni di campo tale perfetta corrispondenza non è stata riscontrata. Infatti nella maggior parte dei casi è stato possibile evidenziare soltanto l'acido nucleico virale e tale reperto può essere ipoteticamente attribuito alle non perfette condizioni di conservazione/trasporto del materiale inviato e alla natura stessa del mollusco ricco di inibitori virali. L'insieme di questi fattori può essere alla base della perdita dell'integrità strutturale del virus e conseguente perdita dell'infettività principalmente legata a determinanti antigenici superficiali [16]. Come ampiamente documentato in letteratura l'isolamento virale può essere infatti limitato e fortemente condizionato dalle condizioni del campione [17]. D'altro canto la sola persistenza di acido nucleico, a causa della ben documentata lability dell'RNA virale [18] e la presenza di inibitori rende particolarmente complessa la comprensione di tali reperti. Queste considerazioni, associate al fatto che alcuni virus non sono in grado di replicare in

nessun tipo di coltura cellulare (calicivirus umani) o inducono alterazioni evidenti in tempi estremamente lunghi e con molte difficoltà (virus dell'epatite A) suggeriscono come le tecniche di biologia molecolare, altamente sensibili e specifiche, possano fornire un valido strumento per lo *screening* dei campioni prima della immissione nella rete commerciale. Si ritiene comunque importante sottolineare come, anche in questo settore, dovrebbe essere adottata una strategia non solo di controllo, ma soprattutto e principalmente di prevenzione. A tal fine le indagini dovrebbero non tanto essere svolte su campioni già destinati alla rete commerciale, ma ancora nelle sedi naturali di allevamento attraverso l'esecuzione di prelievi ed esami svolti in maniera sistematica. Infatti, la presenza di positività anche in campioni già destinati alla commercializzazione, così come le forti implicazioni sanitarie che tali virus sono in grado di indurre, sottolineano ulteriormente la necessità di una pianificazione dei controlli da eseguirsi a monte della commercializzazione e non limitati alla conferma di tossinfezioni già conclamate.

Il secondo aspetto della ricerca è relativo alle indagini tossicologiche condotte *in vitro* evidenzia come le colture cellulari possano rappresentare un sistema biologico di laboratorio di particolare interesse. Infatti il ricorso a tipi di cellule specifici e derivanti da organi bersaglio delle tossine stesse, può fornire, in tempi brevi e con metodologie attendibili, una chiara indicazione non soltanto della eventuale presenza/assenza di prodotti tossici nei campioni in esame, ma anche una prima indicazione del tipo di tossina eventualmente presente. Ulteriormente, l'impiego congiunto di diversi tipi di colture cellulari può consentire un'analisi ad ampio spettro sullo stesso campione potendo evidenziare presenza contemporanea di tossine di gruppi diversi. Si ritiene inoltre utile sottolineare come tali metodologie, in associazione a quelle in fase di allestimento e basate su metodologie di biologia molecolare, possano trovare largo impiego nel controllo delle condizioni dei bacini idrici marini e d'acqua dolce. Infatti, i recenti cambiamenti climatici rendono sempre maggiori le contaminazioni delle acque da parte di microrganismi di differente natura ed in grado di produrre diversi tipi di sostanze tossiche. La messa a punto di metodi diagnostici in grado non solo di verificarne la presenza, ma anche di effettuare una loro corretta tipizzazione può consentire un monitoraggio costante e una individuazione delle specie potenzialmente produttrici. Da ultimo, si ritiene utile anche la loro quantificazione al fine dell'accertamento dei limiti di contaminazione già esistenti e della loro eventuale ridefinizione.

Quanto esposto evidenzia come l'attività diagnostica, compito principale degli Istituti Zooprofilattici dell'intero territorio nazionale, possa estendersi al controllo delle condizioni sanitarie di prodotti ittici nei

riguardi di differenti agenti patogeni potenzialmente agenti causali di patologie per i consumatori. La messa a punto, la standardizzazione, la divulgazione e l'applicazione sistematica dei metodi proposti, applicati nei laboratori dei dieci Istituti Zooprofilattici del Paese potrebbero consentire un monitoraggio dei prodotti ittici e, indirettamente, una sorveglianza costante sulle condizioni degli ambienti marini e dei bacini d'acqua dolce.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Stolle A, Sperner B. Viral infections transmitted by food of animal origin: the present situation in the European Union. *Arch Virol* 1997;Suppl.13:219-28.
2. Enriquez R, Frosner GG, Hochstein-Mintzel V, Riedemann S, Reinhardt G. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J Med Virol* 1992;37:174-9.
3. Flehmig B. Hepatitis A virus in cell culture: propagation of different hepatitis A virus isolates in fetal rhesus monkey kidney cell line (FRhK-4). *Med Microbiol Immunol* 1980;168:239-48.
4. Hoskins JM. *Diagnosi virologica principi e metodi*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 1975.
5. Cromeans TL, Nainan OV, Margolis HS. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(6):2460-3.
6. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in mollusco positive to RT-nested-PCR. *Lett in Appl Microbiol* 2001;33:362-6.
7. Croci L, De Medici D, Morace G, Fiore A, Scalfaro C, Beneduce F, Toti L. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *Intern J Food Microbiol* 1999;48:67-71.
8. Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus L. Improved detection of human enteric viruses in food by RT-PCR. *J Med Virol* 2002; 100:57-69.
9. Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(10):3665-71.
10. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human Adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *J Appl Microbiol* 1998; 64(9):3376-82.
11. Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microb* 2000;66(8):3241-8.
12. Pinoni C, Nicolosio L, Galoppi A, Boni P. Identificazione del virus dell'epatite A nei molluschi attraverso la reazione "Reverse transcription seminested PCR" (RT-SN-PCR). In: *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Riva del Garda, 28-30 settembre 2000. Messina: Grafiche Scuderi; 2002. 163 p.
13. Pinoni C, Cosciani Cunico E, Rubini S. Accumulo e persistenza del virus dell'epatite A nei molluschi bivalvi. In: *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Rimini, 20-22 settembre 2001. Messina: Grafiche Scuderi; 2001. 379 p.

14. Muniain Mujika I, Girones R, Lucena F. Viral contamination of shellfish: evaluation of method and analysis of bacteriophages and human viruses. *J Med Virol* 2000;89:109-18.
15. Vantarakis AC, Papapetropoulou M. Detection of entero-viruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Wat Res* 1998;32(8):2365-72.
16. Lewis GD, Molloy SL, Greening GE, Dawson J. Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. *J Appl Microbiol* 2000;88:633-40.
17. Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by molecular biology - a trip of over 50 years. *Annual Rev Microbiol* 1995; 49:461-87.
18. Richards GP. Limitation of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *J Food Protec* 1999; 62(6):691-7.
19. Flanagan AF *et al.* A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins. *Toxicon* 2001; 39:1021-7.
20. La Rosa LA *et al.* Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:827-33.
21. Koji Hamasaki *et al.* A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon* 1996;34:490-5.
22. Derek seng Ann Yeo *et al.* Neuroblastoma cell culture assay shows that *Carcinoscorpius Rotundicauda* haemolymph neutralizes tetrodotoxin. *Toxicon* 1996;34:1054-7.
23. Manger RL. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins. *Anal Biochem* 1993;214:190-4.

*Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorsa GUIDUCCI*

## **Il programma di monitoraggio per il controllo degli ambienti marino-costieri italiani del Ministero dell'Ambiente**

Irene DI GIROLAMO

*Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio,  
Direzione Difesa del Mare, Roma*

**Riassunto.** - Il Ministero dell'Ambiente, in collaborazione con le Regioni costiere italiane, svolge da circa 10 anni un'attività sistematica di monitoraggio delle acque marino-costiere attraverso programmi di monitoraggio triennali. I dati provenienti da queste ricerche, tese ad ottenere le conoscenze di base sugli ecosistemi marini, sono a tutt'oggi gli unici che descrivono a livello nazionale la qualità di tali ambienti. Il programma 2001-2003, in base ad analisi statistiche sui dati pregressi, ha focalizzato le indagini su 73 aree, di cui 57 sono aree critiche e 16 sono aree di controllo. Vengono indagate diverse matrici ambientali (colonna d'acqua, plancton, sedimenti, molluschi e benthos) con campionamenti quindicinali, semestrali ed annuali.

*Parole chiave:* ambiente marino, monitoraggio ambientale, Italia.

**Summary** (*The Marine Coastal Water Monitoring Program of the Italian Ministry of Environment and Territory*). - The Ministry of the Environment carries out marine and coastal monitoring programs with the collaboration of the coastal Regions. The program in progress (2001-2003), on the basis of results of the previous one, has identified 73 particularly significant areas (57 critical areas and 16 control areas). The program investigates several parameters on water, plancton, sediments, mollusks and benthos with analyses fortnightly, six-monthly and annual. The main aim of these three year monitoring programs is to assess the quality of national marine ecosystem.

*Key words:* seawater, environmental monitoring, Italy.

### **Introduzione**

La Direzione Difesa del Mare del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio svolge da circa 10 anni, ai sensi della Legge 979/82 "Disposizioni per difesa del mare", un'attività sistematica di verifica della qualità delle acque e degli ambienti marino-costieri in stretta collaborazione con 14 Regioni costiere.

Il sistema di controllo che è stato messo a punto è articolato in programmi di monitoraggio triennali, predisposti per ottenere le conoscenze di base sugli ecosistemi marini. A tutt'oggi i dati provenienti da queste ricerche sono gli unici che descrivono a livello nazionale la qualità di tali ambienti.

Il tratto caratteristico del monitoraggio coordinato dal Ministero dell'Ambiente è quello di essere teso a verificare lo stato di qualità delle acque marino-costiere italiane da un punto di vista ambientale e non in funzione della salute dei bagnanti, come avviene per esempio con le analisi per la balneazione. Infatti, mentre in quest'ultimo caso il fine è quello di valutare

la "salubrità" del mare (cioè l'impatto che le sue acque hanno sulla salute umana), il monitoraggio curato dal Ministero dell'Ambiente ha l'obiettivo opposto e cioè verificare quanto le attività dell'uomo modificano l'ambiente marino e in che misura lo alterano.

E', in poche parole, un test sullo stato di salute del mare e di conseguenza i dati che emergono da questi controlli rappresentano un formidabile strumento per valutare ed indirizzare le politiche territoriali.

I programmi di monitoraggio del Ministero sono di durata triennale: l'ultimo ha coperto il triennio 1996-1999, concludendosi in realtà a dicembre 2000 mentre quello attualmente in corso ha preso avvio il 4 giugno 2001 e terminerà nel giugno 2004.

### **Il programma di monitoraggio per il triennio 1996-1999**

Durante il programma sono stati controllati annualmente circa 1700 punti di campionamento, per un totale di oltre 33 000 analisi effettuate.

Obiettivo del monitoraggio è stato essenzialmente quello di definire:

- i livelli trofici, che individuano le aree costiere soggette a fenomeni di eutrofizzazione;
- i livelli di contaminazione microbiologica delle acque e dei molluschi, in relazione alla presenza di scarichi civili, trattati e non;
- i livelli di contaminazione chimica dei molluschi, definiti in base al bioaccumulo di metalli pesanti e microinquinanti organici nel *Mytilus galloprovincialis* (la comune cozza) un organismo filtratore praticamente ubiquitario lungo le nostre coste.

I risultati del triennio di monitoraggio, raccolti in un volume di recente pubblicazione [1], possono essere così semplificati:

a) per quanto attiene lo stato trofico, la qualità degli ambienti costieri italiani è piuttosto soddisfacente: facendo infatti riferimento al recente DL.vo 152/99 che definisce, seppure preliminarmente, la qualità degli ambienti marini in base ad una scala trofica, 5 regioni raggiungono lo stato "elevato", 7 quello "buono" e solo 2 quello "scadente". Va notato però che le regioni che devono essere classificate nello stato mediocre, tipico di sistemi marino-costieri caratterizzati da acque molto produttive, con situazioni che possono essere definite "a rischio eutrofico" sono l'Emilia-Romagna ed il Lazio ed è significativo il fatto che queste zone costiere sono influenzate dagli apporti di due tra i maggiori fiumi italiani, il Po e il Tevere, che condizionano in maniera pesante ampi tratti di costa con i loro carichi eutrofizzanti;

b) per quanto attiene i livelli di contaminazione microbiologica rilevati tanto nelle acque quanto nei molluschi, l'elaborazione dei dati provenienti dai monitoraggi regionali consente di interpretare la reale dimensione del problema su scala nazionale evidenziando l'entità della contaminazione diffusa nella fascia costiera in relazione alla presenza di scarichi urbani non trattati, o non adeguatamente depurati. L'analisi critica di questi dati, oltre che ad identificare particolari situazioni di crisi locale, rappresenterà l'occasione per una valutazione dell'effettivo fabbisogno residuo di collettamento e di depurazione delle acque reflue nelle aree costiere del nostro paese;

c) relativamente al bioaccumulo nei molluschi, i dati prodotti nell'ambito dei piani di monitoraggio pongono le basi per una valutazione dei trend di inquinamento degli ambienti costieri nazionali. Più in particolare:

- i derivati del DDT sono stati rilevati in campioni provenienti da molte località costiere, sia dell'Adriatico che del Tirreno, seppure con concentrazioni molto basse che rivelano uno stato di diffusa contaminazione dell'ambiente marino-costiero operato soprattutto da fiumi che drenano vaste aree di territorio;

- per i policlorobifenili (PCB) valgono le stesse considerazioni già espresse per i derivati del DDT:

molti dei campioni esaminati hanno rilevato livelli medi di accumulo in genere compresi tra 15 e 30 µg/kg peso secco (p.s.), che risultano molto contenuti se confrontati con i valori di riferimento riportati in letteratura;

- la ricerca di idrocarburi clorurati ha fornito quasi sempre risultati negativi, con poche eccezioni rappresentate da sorgenti locali di contaminazione da sostanze organoclorurate peraltro note e già segnalate in letteratura;

- relativamente ai metalli pesanti, sono stati eseguite su scala nazionale le analisi su Mercurio e Cadmio: nel primo caso i livelli sono generalmente medio-bassi (inferiori a 0,5 mg/kg p.s.), con l'eccezione di aree ben localizzate, caratterizzate sia da peculiarità geologiche che dalla presenza di specifiche attività industriali. Per quanto riguarda il Cadmio, nella maggior parte delle stazioni le concentrazioni rilevate sono da considerarsi basse o medie (minori di 1 mg/kg p.s.).

### **Il programma di monitoraggio per il triennio 2001-2003**

I dati raccolti durante il triennio 1996-1999 sono stati elaborati statisticamente, per evidenziare la presenza di eventuali "aree a rischio".

Da questa analisi è emerso che la maggior parte delle zone controllate forniva risultati analitici del tutto sovrapponibili tra loro: erano cioè aree senza particolari problemi di inquinamento e, conseguentemente, anche con minori esigenze di controllo. Alcune altre aree invece si differenziavano nettamente, presentando, per alcuni parametri, valori analitici sensibilmente più alti della media: queste sono state definite "aree critiche". Le aree individuate con l'approccio statistico sono risultate essere quasi del tutto coincidenti con quelle che ciascuna Regione per suo conto reputava essere, in base alla approfondita conoscenza delle problematiche territoriali, più critiche dal punto di vista ambientale.

Parallelamente è stata individuata un'area di controllo, il cosiddetto "bianco", vale a dire un'area che si avvicinasse quanto più possibile alla condizione naturale e servisse quindi da "punto zero" per valutare esattamente il livello di compromissione delle aree critiche.

Nel complesso sono state individuate 73 aree, di cui 57 critiche e 16 di controllo; l'elenco e la localizzazione geografica di tali aree sono riportati rispettivamente alla Tab. 1 ed alla Fig. 1.

Nelle aree individuate è in corso dal 4 giugno 2001 il Programma di Monitoraggio per il triennio 2001-2003 che è stato elaborato in collaborazione con l'ICRAM e poi discusso e condiviso con i principali Enti di ricerca nazionali (ANPA, ENEA, ISS, IRSA-CNR) e con le maggiori associazioni ambientaliste operanti nel settore.

**Tabella 1.** - Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero. Triennio 2001-2003: aree sottoposte ad indagine**Regione Liguria**

1. Area compresa tra il comune di Imperia (IM) e Isola di Gallinara (SV)
2. Area antistante il comune di Vado Ligure (SV)
3. Area compresa tra il comune di Cogoleto e quello di Genova-Cornigliano (GE)
4. Area compresa tra Punta S. Pietro e il comune di Sarzana (SP)
5. (\*) AMP - Cinque Terre (P.ta Mesco) (SP)

**Regione Toscana**

6. Area compresa tra il fiume Serchio e il fiume Arno (PI)
7. Area compresa tra il Porto di Livorno e il comune di Rosignano Marittimo (LI)
8. Area compresa tra il comune di Cecina (LI) e il comune di San Vincenzo (LI)
9. Area compresa tra il Porto di Piombino (LI) e il Porto Fiumara (GR)
10. Area antistante la foce del fiume Ombrone (GR)
11. (\*) Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano, Elba (GR)

**Regione Lazio**

12. Area antistante il tratto tra il fiume Fiora e il fiume Marta (VT)
13. Area antistante il comune di Ladispoli (RM)
14. Area antistante la fiumara Piccola (RM)
15. Area antistante il tratto tra la Foce Acque Alte e la Foce Rio Martino (LT)
16. Area antistante la località Monte Argento (LT)
17. (\*) Parco Nazionale del Circeo - Isola di Zannone (LT)

**Regione Campania**

18. Area antistante la foce del fiume Volturno (CE)
19. Area antistante la foce del fiume Sarno (NA)
20. Area antistante il comune di Napoli (NA)
21. Area antistante il comune di Portici (NA)
22. Area del golfo di Salerno (SA)
23. Area antistante Punta Tresino (SA)
24. (\*) Area antistante Punta Licosa (SA)

**Regione Basilicata**

25. Area antistante la fiumara di Costrocucco (PZ)
26. Area antistante la foce del fiume Basento (MT)
27. (\*) Area antistante il tratto tra il fiume Agri (MT) e il fiume Sinni (MT)

**Regione Calabria**

28. Area antistante il comune di Vibo Valentia (VV)
29. Area antistante la foce del fiume Mesima (VV)
30. Area compresa tra il comune di Villa S. Giovanni (RC) e il comune di Punta Pellaro (RC)
31. Area antistante il comune di Crotona (KR)
32. Area antistante il comune di Caulonia (RC)
33. (\*) Area prospiciente il comune di Capo Rizzuto (KR) (bianco ionico)
34. (\*) Area compresa tra il comune di Scalea (CS) e il comune di Paola (CS) (bianco tirrenico)

**Regione Puglia**

35. Area antistante il comune di Bari (BA)
36. Area antistante il comune di Brindisi (BR)
37. Area compresa tra la foce del fiume Candelaro e il comune di Carapelle (FG)
38. Area compresa tra la foce del fiume Ofanto e il comune di Trani (BA)
39. Area compresa tra il comune di Castellaneta Marina (TA) e la località lido Azzurro (TA)
40. (\*) AMP Isole Tremiti (FG) (bianco adriatico)
41. (\*) Porto Cesareo (LE) (bianco ionico)

**Regione Molise**

42. Area antistante la foce del fiume Trigno (CB)
43. Area antistante la foce del fiume Biferno (CB)

**Regione Abruzzo**

44. Area compresa tra il comune di Giulianova (TE) e la foce del fiume Tordino (TE)
45. Area compresa tra la foce del fiume Saline e la foce del fiume Pescara (PE)
46. Area antistante il comune di Ortona (CH)
47. (\*) Area antistante il comune di Vasto (CH)

**Regione Marche**

48. Area compresa tra il fiume Foglia ed il fiume Metauro (PS)
49. Area compresa tra il comune di Montemarciano (AN) e il comune di Colle del Guasco (AN)
50. Area compresa tra il comune di Porto Civitanova (MC) e il comune di Porto S. Elpidio (AP)
51. Area compresa tra la foce del fiume Fulvia (MC) e la foce del fiume Tronto (AP)
52. (\*) Area prospiciente il Monte Conero (AN)

**Regione Emilia-Romagna**

53. Area compresa tra il comune di Goro (FE) e la località Porto Garibaldi (FE)
54. Area compresa tra le località Casal Borsetti (RA) e Lido Adriano (RA)
55. Area compresa tra il comune di Cesenatico (FO) e quello di Bellaria (RN)
56. (\*) Area prospiciente il comune di Cattolica (RN)

**Regione Veneto**

57. Area antistante il comune di Caorle (VE)
58. Area antistante la foce del fiume Piave (VE)
59. Area antistante la località Cavallino (VE)
60. Area antistante la località Caleri (RO)
61. (\*) Area antistante Pellestrina - Cà Roman (VE)

**Regione Friuli-Venezia Giulia**

62. Area antistante Porto Nogaro (UD)
63. Area compresa tra Punta Sdobba (GO) e il comune di Aurisina (TS)
64. Area antistante Punta Sottile (TS)
65. (\*) AMP Miramare (TS)

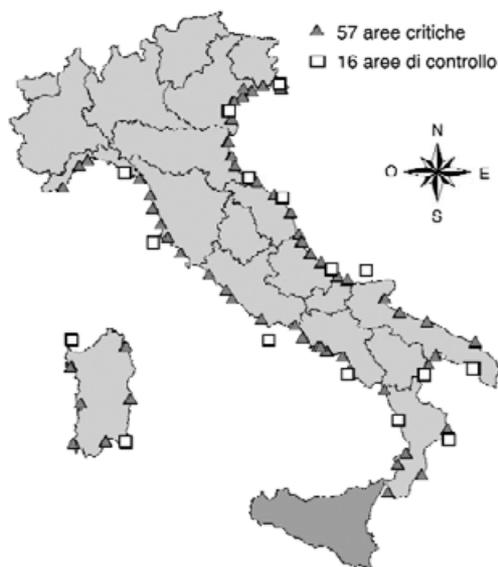
**Regione Sardegna**

66. Area del Golfo di Olbia (SS)
67. Area del Golfo di Cagliari (CA)
68. Area compresa tra il comune di Sant'Antioco (CA) ed il comune di Portoscuso (CA)
69. Area antistante il fiume Tirso (OR)
70. Area antistante il comune di Alghero (SS)
71. Area antistante il comune di Arbatax (NU)
72. AMP Capo Carbonara (CA)
73. (\*) AMP Isola dell'Asinara (SS)

**Regione Siciliana (\*\*)**

- Area del Golfo di Milazzo (ME)
- Area del Golfo di Palermo (PA)
- Area del Golfo di Castellammare (TP)
- Area compresa tra la foce del fiume Acate e il comune di Pozzallo (RG)
- Area antistante l'area industriale del comune di Augusta (SR)
- Area antistante l'area industriale del comune di Gela (CL)
- (\*) AMP delle Ciclopi (CT) bianco versante ionico)
- (\*) AMP Isola di Favignana (TP) (bianco versante tirrenico)

Le aree contrassegnate da (\*) sono aree di controllo (i bianchi), AMP indica Area Marina Protetta; (\*\*) la Regione Siciliana, per problemi di carattere amministrativo, ha firmato la convenzione con il Ministero dell'Ambiente un anno dopo le altre Regioni.



**Fig. 1.** - Localizzazioni delle aree di indagine del programma di monitoraggio 2001-2003. Numero totale aree indagate: 73.

Il programma avviato riduce drasticamente, rispetto al triennio precedente, il numero di punti controllati ma in compenso prevede, su tali punti, un notevole approfondimento analitico sia per quanto riguarda le matrici da studiare sia per la frequenza dei campionamenti, che per le acque ed il plancton sarà addirittura quindicinale (Tab. 2).

Proprio lo studio approfondito del plancton è una delle peculiarità analitiche del nuovo programma di monitoraggio, che, a differenza del passato, è focalizzato sulla qualità ambientale del mare, tralasciando gli aspetti legati alla sua "salubrità". In questo senso le analisi microbiologiche sono ridotte al minimo e sono previste solo nei sedimenti del fondo, mentre sono ampie le verifiche sulla dinamica delle popolazioni animali e vegetali (a vita libera o legate al fondale) e sui fattori che ne determinano le alterazioni.

Rispetto al passato inoltre si sono privilegiate sia le indagini sulla contaminazione dei sedimenti e dei molluschi, poiché queste matrici, al contrario dell'acqua, conservano per mesi, talvolta per anni, la "memoria" di tutte sostanze con cui sono venute a contatto sia quelle sugli ecosistemi particolarmente rilevanti dal punto di vista ambientale, come le praterie di Posidonia oceanica.

Oltre all'obiettivo prioritario di valutare parallelamente, per ciascuna Regione, lo stato di qualità ambientale di aree particolarmente sottoposte ad impatti antropici e di altre caratterizzate da alti gradi di naturalità, il Programma 2001-2003 si è dato anche le seguenti finalità:

a) raccogliere in una banca dati, il Si.Di.Mar, tutti i dati emersi a livello nazionale e metterli a disposizione, con modalità differenti, di vari utenti. Nella prepa-

razione del nuovo Programma è stata posta grande attenzione proprio alla parte relativa al trasferimento dei dati dalle Regioni al Si.Di.Mar.; il protocollo messo a punto e regolato con un apposito allegato alle Convenzioni con le Regioni prevede un trasferimento on-line dei dati, una successiva ed immediata verifica della congruità e della completezza dei dati trasmessi effettuata in automatico con procedure realizzate *ad hoc* e quindi l'inserimento di tali dati nel Si.Di.Mar. Tutti i dati, dopo essere stati verificati e validati con le procedure illustrate vengono poi resi disponibili alla banca dati dell'ANPA (SINA). Gli stessi dati, appositamente elaborati e semplificati, sono poi messi in rete, in modo di assicurare, attraverso il sito [www.minambiente.it](http://www.minambiente.it), la loro massima diffusione;

b) raccogliere e distribuire le metodiche analitiche di riferimento per le analisi previste. Infatti, al fine di assicurare la massima confrontabilità dei risultati delle analisi effettuate nell'ambito del Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero, era necessario che tutti gli esami venissero eseguiti con analoghi protocolli. Dal momento che per le acque marine non esistevano metodi analitici ufficiali, si è ritenuto necessario stabilire dei metodi di riferimento da utilizzare nell'ambito del Programma. I metodi individuati sono poi stati discussi ed elaborati tanto con gli enti di ricerca di riferimento (ICRAM, ANPA, ISS) quanto con i tecnici delle Regioni, delle ARPA e delle Università che materialmente poi avrebbero eseguito le analisi previste. Le metodologie analitiche di riferimento sono state raccolte in un volume di recente pubblicazione [2];

c) applicare e valutare su scala nazionale metodiche di nuova introduzione: alcuni dei parametri previsti nel nuovo Programma, benché suggeriti e/o previsti tanto dalla normativa nazionale (DL.vo 152/99 e successivi aggiornamenti) quanto da quella comunitaria, e quindi utili per organizzare in maniera sempre più aggiornata quella rete di osservazione della qualità dell'ambiente marino di cui alla Legge 979/82, non sono mai stati ricercati in modo uniforme lungo tutte le coste italiane. Il triennio 2001-2003 rappresenta quindi una particolare occasione di approfondimento e di verifica. In pratica per la prima volta alcune decine di laboratori uniformemente distribuiti lungo le coste italiane utilizzeranno contemporaneamente nuove metodiche analitiche per la valutazione della qualità dell'ambiente marino. Questo renderà possibile valutare con grande precisione l'attendibilità dei diversi metodi di indagine e quindi contribuire finalmente alla definizione dei metodi per la rilevazione e la valutazione degli elementi biologici e morfologici delle acque marine costiere;

d) ottimizzare ed uniformare il livello delle conoscenze degli operatori periferici attivati dalle Regioni, attraverso un programma di formazione incentrato sia

**Tabella 2.** - Protocollo analitico e frequenza dei campionamenti previsti dal Programma di monitoraggio del triennio 2001-2003

<b>Analisi effettuate ogni 15 giorni su acqua</b>	<b>Analisi effettuate ogni 6 mesi su sedimento</b>	<b>Analisi effettuate ogni 6 mesi su molluschi</b>
Temperatura	Granulometria	Composti organoclorurati <sup>(a)</sup>
pH	Composti organoclorurati <sup>(a)</sup>	Metalli pesanti <sup>(b)</sup>
Salinità	Metalli pesanti <sup>(b)</sup>	Idrocarburi policiclici aromatici <sup>(c)</sup>
Ossigeno disciolto	Idrocarburi policiclici aromatici <sup>(c)</sup>	Composti organostannici (TBT)
Clorofilla 'a'	Carbonio organico totale	
Azoto totale	Composti organostannici (TBT)	
Azoto ammoniacale	Saggi biologici	
Azoto nitroso	Spore di clostridi solfitoriduttori	
Azoto nitrico		
Fosforo totale		
Ortofosfato		
Silicati		
Trasparenza		
Fitoplancton <sup>(d)</sup>		
Zooplancton <sup>(e)</sup>		
<b>Analisi effettuate una volta l'anno su comunità bentoniche</b>		
<b>Analisi sulla <i>Posidonia oceanica</i></b>	<b>Analisi sulle SFBC (sabbie fini ben calibrate)</b>	
Densità fogliare	Lista delle specie complete o lista delle specie guida della biocenosi	
Lepidocronologia	Numero di individui per specie	
Fenologia	Parametri strutturali della biocenosi	
Marcaggio limite inferiore		

<sup>(a)</sup> DDT e analoghi (DD's); isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH's); Drin's; esaclorobenzene; PCB's (4/7 atomi di cloro, specificando quali congeneri sono stati ricercati ed i valori delle singole concentrazioni).

<sup>(b)</sup> Hg, Cd, Cr, Pb, Zn, Cu, V, As, Ni, Al e Fe come screening preliminare per il 1° anno.

<sup>(c)</sup> Naftalene, Acenaftene, Acenaftilene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenzo(a,h) antracene, Benzo(g,h,i)perilene, Indeno(1,2,3,c,d)pirene.

<sup>(d)</sup> 1° anno: densità Diatomee, densità Dinoflagellate, densità altro fitoplancton; 2° anno: lista e densità delle specie.

<sup>(e)</sup> 1° anno: densità Copepodi, densità Cladoceri; 2° anno: lista e densità delle specie.

sulla didattica delle metodiche analitiche di nuova introduzione sia su esercizi di intercalibrazione tra i vari laboratori, nell'ottica di garantire la massima confrontabilità dei risultati analitici. In tal senso, in collaborazione con ANPA ed ICRAM è stato messo a punto un piano didattico destinato agli operatori dei laboratori periferici e focalizzato sulle metodologie analitiche di nuova introduzione. Il piano formativo messo a punto ha di fatto soprattutto evidenziato quanto sia sentita, da parte degli operatori che lavorano nel controllo dell'ambiente marino, la necessità di una adeguata preparazione; la richiesta formativa da parte delle Regioni che partecipano al programma è stata fortissima. Nell'arco del primo anno di attività si sono svolti 5 corsi di formazione di 5 giorni ciascuno presso diversi centri di ricerca regionali e due giornate di studio presso il Ministero.

Al fine di ottimizzare quanto più possibile l'intero sistema di monitoraggio è stato poi istituito un

Comitato tecnico-scientifico con funzioni di verifica del costante funzionamento e di aggiornamento del Programma stesso, costituito da rappresentanti del Ministero, da rappresentanti dei principali enti di ricerca nazionali e da esperti particolarmente qualificati.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2002.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Qualità degli ambienti marini costieri italiani. 1996-1999. *Valutazione preliminare del monitoraggio realizzato in convenzione con le Regioni costiere*. Roma: Ministero dell'Ambiente, Servizio Difesa Mare, ICRAM; 2000.
2. Cicero AM & Di Girolamo I (Ed.). *Metodologie analitiche di riferimento del programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003)*. Roma: Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM; 2001.

## Indicatori per il mare: prima applicazione di un approccio integrato

Antonio MELLEY

*Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana (ARPAT), Area per la Tutela dell'Ambiente Marino, Lagunare, Lacustre, Costiero e dell'Ittiofauna - Area MARE, Firenze*

**Riassunto.** - Si è tentato di mettere a punto un set di indicatori che consentisse un primo tentativo di valutazione dell'ambiente costiero italiano, sulla base dello schema DPSIR (determinanti, pressioni, stato, impatto, risposta), metodologia in grado di descrivere le diverse componenti di un sistema ambientale. Gli indicatori individuati sono i seguenti: popolazione e turismo (determinanti); attività produttive, carico organico potenziale, carichi trofici, traffico marittimo, flotta peschereccia, pesca ed acquacoltura (pressioni); indice di stato trofico TRIX ed indice di qualità batteriologica IQB (stato); balneabilità (impatto); bilancio depurativo, catasto degli scarichi ed aree protette (risposte). Per ogni indicatore viene presentata una breve descrizione delle caratteristiche, delle modalità di costruzione e del significato ambientale e ne vengono discussi pregi e difetti.

*Parole chiave:* indicatori, DPSIR, acque costiere, balneazione, stato dell'ambiente.

**Summary** (*Indicators for marine environment: a preliminary application of an integrated approach*). - A draft set of indicators was selected to make a state assessment of Italian coastal environment, based upon DPSIR scheme (driving, pressure, state, impact, response), a method which can describe different components of complex environmental systems. The selected indicators are the followings: population and tourism (driving); manufacturing, potential organic loads, trophic loads, maritime transport, fishing fleet, fishing intensity, mariculture (pressure); trophic index TRIX, microbiological quality index IQB (state); bathing water quality (impact); waste water treatment budget, register of sewers, protected areas (response). A brief description is presented for each indicator, in relation to their most important features, construction modalities and environmental meaning.

*Key words:* indicators, DPSIR, coastal waters, bathing waters, state of environmental.

### Introduzione

Per poter parlare con sufficiente cognizione di causa di protezione ambientale e per poter operare interventi di risanamento e di tutela è necessario avere una conoscenza approfondita dello stato dell'ambiente, della sua evoluzione, dei processi fondamentali e delle dinamiche di questi. Risulta, inoltre, imprescindibile la consapevolezza dei forti legami che intercorrono tra le diverse componenti ambientali "in senso stretto" e quelle più specificamente economiche, sociali e politiche. Per questi motivi diventa fondamentale possedere degli strumenti conoscitivi potenti, affidabili, di facile lettura e validi per le diverse realtà locali, nazionali ed internazionali. Questi strumenti sono gli indicatori e, ancor più, gli indici ambientali.

Il sistema di indicatori ed indici adottato a livello europeo, sia dall'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA) sia da EUROSTAT, è quello basato sullo

schema DPSIR (*driving, pressure, state, impact, response*). Questo approccio considera sia i fattori che inducono i cambiamenti partendo da lontano (*driving* = cause generatrici o determinanti), sia quelli che gravano più direttamente sull'ambiente, le pressioni, sia quelli che descrivono la situazione attuale, lo stato, sia quelli che misurano gli effetti delle alterazioni, l'impatto, e le contromisure che vengono prese per ridurle, la risposta.

Questo sistema, per poter funzionare, necessita di parametri facilmente e rapidamente misurabili, che forniscano una base dati molto estesa, costantemente aggiornata e controllata ed il flusso delle informazioni deve essere efficiente e continuo, a partire da chi preleva il dato, passando dai centri di raccolta e di controllo, fino al destinatario finale.

Ciò ha determinato la necessità della creazione, in Europa come in Italia, di un sistema conoscitivo ambientale "normalizzato" sia a livello regionale, sia a

livello nazionale e comunitario, relativo alla rilevanza dei dati, alla riconoscibilità ed alla validazione delle fonti, alla sistematicità dell'elaborazione.

Queste esigenze, presenti in Italia fin dalla fine degli anni '80, hanno portato all'ipotesi del Sistema Informativo Ambientale (SINA), affidato direttamente al Ministero dell'Ambiente. Successivamente, nel 1997 con il trasferimento del SINA all'Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (ANPA) si è avviata una fase di sviluppo, attuata con l'apporto delle Agenzie Regionali (ARPA) e delle Province autonome (APPA).

Il modello DPSIR, però, richiede anche una rete di relazioni e di connessioni esterne al sistema delle agenzie ambientali, con gli altri soggetti che, a vario titolo, possono vantare competenze nel campo della raccolta, della gestione e dell'elaborazione dei dati e delle informazioni sull'ambiente: dagli istituti di statistica alle organizzazioni del mondo produttivo, dagli enti di ricerca agli organi istituzionali.

A livello europeo, il modello di rete utilizzato (European Environment Information and Observation Network, EIONET) prevede una struttura articolata su centri di raccolta e di elaborazione dati per i diversi settori ambientali, gli European Topic Centre (ETC), costituiti dai maggiori esperti provenienti dagli stati membri dell'UE, a cui affluiscono le informazioni dai punti di raccolta dati a livello nazionale, i National Focal Point (NFP), che agiscono in sintonia con i National Reference Centre (NRC), competenti per le diverse tematiche.

Dovendo garantire una uniformità tra strutture nazionali e comunitarie, ANPA (NFP per l'Italia) ha adottato lo stesso schema, creando i Centri Tematici Nazionali (CTN), appoggiandosi al sistema delle Agenzie Ambientali (ARPA-APPA), che ormai, dopo sette anni, si può considerare completo ed in grado di coprire tutto il territorio italiano.

I CTN ed i Punti Focali Regionali (PFR), la cui designazione è di competenza delle Regioni, sono i soggetti specificamente orientati all'alimentazione della base conoscitiva, con un ruolo prevalente di produzione di informazioni e conoscenze tipicamente legate all'ambiente.

Attualmente vi sono 6 CTN, ciascuno guidato da una diversa Agenzia regionale (leader), con la partecipazione a vario livello di molte altre (co-leader, partner) e da soggetti esterni (Università, istituti di ricerca, ecc.) come Istituzioni Principali di Riferimento (IPR):

- 1) Atmosfera, Clima & Emissioni in aria (CTN\_ACE) - leader: ARPA Lombardia;
- 2) Agenti Fisici (CTN\_AGF) - leader: ARPA Emilia-Romagna;
- 3) Acque Interne e Marino costiere (CTN\_AIM) - leader: ARPA Toscana;

4) Natura e Biodiversità (CTN\_NEB) - leader: ARPA Valle d'Aosta;

5) Rifiuti e Flussi di materiali (CTN\_RFM) - leader: ARPA Veneto;

6) Territorio e Suolo (CTN\_TES) - leader: ARPA Piemonte.

Sostanzialmente, il ruolo dei CTN è legato alla identificazione degli indicatori necessari a soddisfare le esigenze conoscitive per la gestione integrata dell'ambiente. In base a questi strumenti, alla richiesta della normativa, cioè alle informazioni ed ai controlli che sono previsti dalle varie norme (regionali, nazionali, comunitarie o internazionali) ed alla identificazione delle possibili fonti di dati, devono essere individuati i criteri generali di creazione delle reti per il monitoraggio ambientale, nelle diverse matrici e, di conseguenza, devono essere definiti gli standard informatici e metodologici per la raccolta e la trasmissione dei dati. Altro compito fondamentale è quello di prevedere dei modelli interpretativi degli indicatori all'interno del sistema DPSIR, cercando di definire gli obiettivi di qualità ambientale a cui tendere. Il tutto dovrebbe anche comportare la determinazione dei principi su cui impostare l'attività di reporting ambientale, per coordinare ed uniformare il panorama nazionale e regionale.

## Metodologia

Il primo criterio di selezione di indicatori ed indici è stato quello di valutare le esperienze già maturate all'estero (EEA, OCSE, EUROSTAT, ecc.) in relazione alle peculiarità dell'area mediterranea, considerando quanto richiesto dalla normativa nazionale, europea ed internazionale. Il CTN\_AIM nel 1999 ha prodotto il primo documento di individuazione degli indicatori per le acque, comprendendo anche quelle marine (*Manuale degli indici e degli indicatori* [1]), sulla base del quale sono stati realizzati degli studi applicativi su alcune limitate realtà regionali, raccolti nel volume *Verso il 1° rapporto sui corpi idrici italiani* [2] e, in particolare, il caso studio sul litorale toscano, realizzato da ARPA Toscana.

Prendendo spunto da queste esperienze nel 2000, il Ministero della Salute, con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ha chiesto la collaborazione del Ministero dell'Ambiente, dell'ANPA e del CTN\_AIM, della Regione Toscana e dell'ARPAT, per studiare la realizzazione di un rapporto che mettesse in relazione la qualità delle acque di balneazione con le pressioni che su di esse si esercitano. Questo prodotto, che ha tentato di considerare gli aspetti igienico-sanitari, la qualità ambientale ed i fattori di pressione, applicando l'approccio DPSIR alle acque di balneazione della Toscana, è stato allegato al consueto rapporto sulla

*Qualità delle acque di balneazione del 1999*, con il titolo di *Le pressioni ambientali e la balneazione. Un caso studio: la Toscana* [3].

L'anno successivo, visto il buon esito dell'esperienza toscana, il Ministero della Salute ha proceduto ad un allargamento di questa esperienza ad altre Regioni interessate e si è così potuto realizzare un rapporto su 4 regioni: Toscana, Emilia Romagna, Marche e Sardegna. Questo ha consentito di verificare la validità dell'approccio a realtà territoriali assai diverse, per quanto riguarda le caratteristiche delle acque (Adriatico e Tirreno), delle coste e soprattutto le situazioni di antropizzazione assai variabili.

In questa seconda esperienza si sono introdotti alcuni indicatori, nel frattempo messi a punto dal CTN\_AIM, per una miglior valutazione, sia qualitativa che quantitativa, degli apporti antropici. Il volume *Pressioni ambientali e balneabilità. Emilia-Romagna, Marche, Sardegna, Toscana*, edito dal Ministero della Salute, è stato distribuito a parte ma in un circuito analogo a quello del rapporto annuale 2000 sulla *Qualità delle acque di balneazione* [4].

Tra il 2000 ed il 2001, il CTN\_AIM ha provveduto alla realizzazione di una nuova applicazione del DPSIR, utilizzando tutti gli indicatori nel frattempo selezionati per le acque interne e marine, stavolta a livello nazionale, il *Rapporto SINAnet sulle acque* [5]. Questo documento è servito per verificare quali indicatori fossero realmente costruibili in modo uniforme su tutto il territorio italiano, valutandone il grado di significatività e la possibilità di aggiornamento, arrivando a darne un giudizio complessivo sulla efficacia di ciascuno.

Infine, a livello regionale, ARPAT ha realizzato, in collaborazione e per conto della Regione Toscana, un primo tentativo di valutazione dell'ambiente marino toscano [6], analizzando secondo la metodologia DPSIR tutta la costa, avendo a disposizione un set di dati completo ed omogeneo.

Sulla base di tutti questi documenti e sull'esperienza maturata nella loro realizzazione, è stato individuato un set di indicatori, che sono apparsi affidabili ed utilizzabili per un'analisi dettagliata a livello di acque costiere. In questa selezione non è stato, però, trascurato di prendere in considerazione anche ciò che, nel frattempo, veniva proposto da altri soggetti nel campo del *reporting* ambientale sulle acque (Regioni, ARPA, EEA, ecc.).

Di certo vi è che la causa determinante (*driving*), di qualunque ambiente si tratti, è rappresentata dall'azione modificatrice, a qualunque livello, da parte dell'uomo. Nel caso particolare delle acque costiere, ciò si traduce nella presenza antropica sulla fascia costiera, che può essere facilmente e schematicamente quantificata tramite il numero di abitanti (popolazione residente e densità di popolazione) ed il turismo

(presenze turistiche, densità turistica ed incidenza del turismo sulla popolazione).

Se, poi, andiamo a considerare quale sia la reale pressione causata dall'antropizzazione, vediamo come il principale mezzo di trasferimento degli inquinanti dal territorio costiero all'ambiente marino sia quello "liquido" (\*), cioè tramite i corsi d'acqua che sboccano a mare, veicolando tutto ciò che recepiscono in termini di scarichi diretti ed indiretti. I carichi fluviali, quindi, dovrebbero dare un'esatta stima della pressione che viene esercitata.

Tuttavia, l'inadeguatezza delle reti di monitoraggio quantitativo dei corsi idrici (il regime fortemente torrentizio della maggior parte dei corsi d'acqua ne rende ardua la stima della portata) ed il numero stesso di quelli che confluiscono al mare (dai piccoli fossi ai canali artificiali, dai torrenti ai fiumi), non consentono un bilancio completo dei carichi inquinanti. Allora, è stato necessario stimare la restante parte dei carichi immessi in mare tramite dati indiretti di produzione agricola, zootecnica ed industriale, oltre che di popolazione e turismo. Sulla base di questi dati è stato valutato il carico organico potenziale ed i carichi trofici (azoto e fosforo), in riferimento alle quantità potenzialmente prodotte dai diversi settori ed introdotte nell'ambiente idrico.

Inoltre, per avere qualche informazione sulla possibilità di immissione di altre tipologie di sostanze inquinanti, meno abbondanti ma altrettanto dannose per gli ecosistemi (metalli pesanti, solventi clorurati, PCB, IPA, pesticidi, fitofarmaci, ecc.) è stato preso in considerazione lo sviluppo industriale, come numero di addetti alle attività produttive, considerando in particolare quelle di tipo manifatturiero (le "industrie" vere e proprie).

Infine, come ulteriori fattori di pressione sono state valutate le attività che avevano dirette conseguenze sulle risorse ittiche, cioè la pesca, l'acquacoltura ed il traffico marittimo, quest'ultimo anche per le gravi conseguenze che può provocare in termini di inquinamento massivo ed altamente tossico (idrocarburi, composti organostannici, ecc.).

Dal punto di vista dello stato e della qualità delle acque, è stato valutato il grado di trofia del sistema attraverso l'indice TRIX. Inoltre, dato che non si potevano tralasciare gli aspetti legati specificatamente alle acque di balneazione, facenti parte a pieno titolo di quelle costiere, sono stati utilizzati i dati del monitoraggio ai sensi del DPR 470/82 per costruire un indice

---

(\*) In realtà, anche le emissioni atmosferiche sono una modalità di trasferimento degli inquinanti verso l'ambiente marino, non solo costiero, ma hanno una certa rilevanza solo a livello di grande circolazione, di scambi tra bacini (per esempio tra Mar Mediterraneo ed Oceano Atlantico) ed evoluzione temporale a media e grande scala del bilancio delle sostanze chimiche.

di qualità batteriologica, che rappresentasse non tanto un livello igienico quanto un grado di compromissione delle acque dovuto a scarichi civili.

L'impatto, per ora, è stato possibile valutarlo solo sulle acque di balneazione, attraverso l'idoneità alla balneazione (balneabilità), in quanto solo in questo campo si hanno elementi certi di conseguenze sulle attività umane ed esistono dati raccolti a questo scopo.

Nel campo delle risposte messe in atto dalle pubbliche amministrazioni per eliminare o mitigare i fattori di alterazione delle acque, si può considerare come predominante lo sforzo fatto nel settore degli scarichi, sia attraverso il bilancio depurativo, cioè la quantità di sostanza organica (in abitanti equivalenti) trattata dagli impianti rispetto a quella potenzialmente prodotta, sia come controllo di tipo amministrativo sulle autorizzazioni (catasto degli scarichi). Infine, è stata valutata l'attenzione rivolta alla tutela ed alla conservazione degli ambienti naturali, tramite l'istituzione di aree protette.

## Risultati

### *L'ambito territoriale considerato*

Le zone costiere costituiscono degli ambienti complessi, influenzati da vari fattori di origine naturale antropica (idrologici, geomorfologici, socio-economici), sia nelle componenti terrestri che marine, e necessitano ovviamente di una gestione integrata che consideri tutti questi aspetti.

Per poter comprendere, valutare e gestire i vari fenomeni che si sviluppano sulla fascia costiera, è necessario, innanzitutto definirne i limiti territoriali, fisiologici ed ecologici degli ambienti considerati. Naturalmente, dovendo applicare un modello concettuale ed interpretativo a situazioni naturali, sono necessarie delle schematizzazioni e semplificazioni che riducono la variabilità intrinseca, permettendo comunque un'analisi dei fenomeni.

Generalmente le zone costiere vengono definite come estensioni "marine": "dal limite di marea fino alla parte più esterna della piattaforma continentale", "zona che circonda il continente per 200 miglia nautiche della zona economica esclusiva" [6], "zona di circa 120 miglia che si estende verso il mare includendo ecosistemi come le praterie di fanerogame, e le barriere coralline e che comunque incorpora gli estuari e le acque salmastre" [8]. Tali definizioni difficilmente si adattano a situazioni particolari quali quella mediterranea.

Per ciò che riguarda l'estensione "terrestre", il limite interno della zona costiera viene spesso esteso all'interno dei bacini dei fiumi che defluiscono in mare, perché il flusso d'acqua dolce insieme al carico dei sedimenti e della sostanza organica trasportata

fanno parte integrante della dinamica costiera [9]. Una definizione inerente alla parte "terrestre" della fascia costiera generalmente utilizzata, soprattutto per cercare di uniformare l'estensione spaziale, è quella di considerare una fascia terrestre di 10 km di larghezza all'interno della linea di costa. Tale approccio è stato utilizzato ad esempio nei rapporti della Commissione Europea e dell'Agenzia Europea per l'Ambiente [10].

Vista la notevole indeterminatezza della definizione di "fascia costiera" o, comunque, la notevole complessità di una trattazione ben rispondente a tutte le diverse situazioni territoriali, morfologiche, economiche e demografiche, il campo di indagine è stato ristretto ai soli comuni che possedessero almeno un piccolo tratto di costa, sia continentale che insulare. In tal modo sono stati ottenuti due vantaggi: un criterio oggettivo ed uniforme per tutto il territorio regionale e, soprattutto, il riferimento all'entità amministrativa "comune", presente in moltissime banche dati da cui sono stati prelevati i dati necessari alla costruzione degli indicatori. Naturalmente, un criterio così restrittivo, presenta i suoi limiti quando si vanno ad analizzare situazioni puntuali o di particolare rilevanza, anche in considerazione della notevole diversità che presentano le coste italiane.

Per quanto è stato possibile, quindi, sono stati reperiti i dati disaggregati in modo da consentire un'analisi dei diversi indicatori riferita ai soli comuni della fascia costiera (644). Quando non sono stati reperiti i dati comunali, è stato comunque riportato a questa unità territoriale il dato disponibile, operando nel modo seguente:

- se il dato era "provinciale", conoscendo la popolazione residente nei comuni costieri rispetto al totale della Provincia di appartenenza è stato stimato che in uguale proporzione fossero anche distribuite le presenze turistiche;

- se il dato era "regionale", non è stato utilizzato, in quanto gli errori a cui si sottoponeva erano troppo elevati, fatta eccezione per quegli indicatori prettamente marini, quali flotta peschereccia, pesca, balneazione e traffico marittimo, il cui ambito è comunque la costa, anche se il dato risulta apparentemente riferito all'intera regione.

### *La costruzione degli indicatori*

Di seguito si riportano, per ogni indicatore individuato, le principali caratteristiche, il significato e le modalità di costruzione utilizzate (\*).

---

(\*) Il CTN\_AIM sta curando la pubblicazione di un nuovo manuale degli indicatori per le acque, al quale si rimanda per una descrizione maggiormente dettagliata ed aggiornata.

• **Popolazione e densità di popolazione (determinante)**

*Definizione:* distribuzione spaziale e/o temporale della popolazione residente e della densità abitativa nell'area di interesse.

*Dati:* ISTAT, "Censimento della popolazione" 1951, '61, '71, '81, '91 e 2001 (dettaglio a livello di sezione censuaria), "Movimenti anagrafici" 1997, '98, '99 e 2000 (dettaglio comunale e minor uniformità dei dati).

*Descrizione:* dai dati della popolazione residente, così rilevati, si ottiene la concentrazione sul territorio (densità) dividendo il numero di abitanti (Ab) per la superficie totale dell'area di interesse o per la lunghezza della costa.

*Scopo:* valutare l'incidenza dello sviluppo demografico in base al territorio sul quale insiste per prevedere effetti sulla disponibilità delle risorse e sulla naturalità degli ecosistemi.

*Unità:* Ab; Ab/km<sup>2</sup>; Ab/km.

• **Presenze turistiche e incidenza del turismo (determinante)**

*Definizione:* numero di presenze turistiche e rapporto percentuale sugli abitanti residenti (Incidenza del turismo).

*Dati:* rilevati da parte degli uffici statistici provinciali e/o regionali e dagli enti turistici e immessi nel sistema statistico nazionale (SiStaN) per le elaborazioni successive da parte dell'ISTAT, effettuate con cadenza annuale.

*Descrizione:* le presenze turistiche (dato fornito) sono relative al numero delle notti (giorni) trascorse dai clienti negli esercizi ricettivi; per poter meglio riferire il dato alla situazione costiera sarebbe opportuno poterlo possedere differenziato per tipologia turistica (balneare, culturale, montana, ecc.). Calcolando il rapporto, in percentuale, tra le presenze ed i residenti nel periodo di interesse, si ottiene l'incidenza del turismo sulla popolazione, facendo attenzione a rapportare alla stessa unità di misura i due termini, nominatore e denominatore, tramite la moltiplicazione degli abitanti residenti per i giorni considerati:

$$\frac{\text{presenze}}{\text{Ab}} \times \frac{1}{\text{giorni}} \times 100$$

giorni = 365 (anno) o 153 dal 1° maggio al 30 settembre

*Scopo:* valutare la rilevanza del fenomeno "turismo" sul territorio di interesse, in qualità di potenziale consumo delle risorse ed impatto sugli equilibri degli ecosistemi, e la sua incidenza rispetto alla popolazione su queste stesse componenti, per comprendere quanto un territorio possa essere più o meno in grado di assorbirne il carico.

*Unità:* presenze in un anno o in una stagione (n) e sua percentuale sugli abitanti (%).

• **Attività produttive (pressione)**

*Definizione:* numero di addetti alle imprese per le diverse tipologie di attività produttive, maggiormente impattanti per l'ambiente (manifatture, trasporti, ecc.).

*Dati:* ISTAT, censimenti nazionali delle attività produttive 1951, '61, '71, '81, '91, 2001 e censimento intermedio 1996.

*Descrizione:* sulla base della classificazione delle imprese 1996 (ATECO5) sono state valutate le attività che potevano essere più impattanti per l'ambiente idrico, raggruppandole in manifatturiere (Manif.), classi ATECO5 da 15 000 a 40 000, e legate ai trasporti (Trasp.), classi da 60 000 a 65 000. Oltre ai valori assoluti degli addetti totali e dei due gruppi, si deve calcolare il rapporto (in percentuale) tra questi settori ed il totale di addetti.

*Scopo:* misura della pressione potenzialmente esercitata da parte delle attività produttive, sia come apporti inquinanti in genere che come consumo delle risorse.

*Unità:* numero di addetti (n).

• **Carichi fluviali (pressione)**

*Definizione:* quantità di sostanze (azoto ammoniacale, nitrico e nitroso, fosforo totale e ortofosfato, metalli pesanti) veicolate dai fiumi al mare.

*Descrizione:* dai dati di portata giornaliera (m<sup>3</sup>/s) e di concentrazione (g/m<sup>3</sup>) delle sostanze veicolate, rilevati con frequenza almeno mensile, si calcolano la media mensile di portata (m<sup>3</sup>/s) ed il carico medio mensile (kg/mese), come specificato nelle seguente equazione:

Carico medio mensile (kg/mese) =

$$\frac{\sum_{i=1}^n Q_d}{n} \times \frac{\sum_{m=1}^m [X_m]}{m} \times \frac{86400 \times n}{10^6}$$

Q<sub>d</sub> = portata giornaliera in dm<sup>3</sup>/s; n = numero di giorni del mese; [X<sub>m</sub>] = concentrazione in mg/dm<sup>3</sup> rilevata in un campionamento; m = numero di campionamenti nel mese; 86 400 = numero di secondi in un giorno. La somma dei carichi complessivi dei 12 mesi darà il carico annuale (t/anno).

*Scopo:* studio dell'impatto fluviale sulle acque marine costiere, anche riguardo all'eutrofizzazione, per valutare le pressioni non generate direttamente nella fascia costiera.

*Unità:* t/anno.

• **Carichi trofici (pressione)**

*Definizione:* quantità di azoto e fosforo generate da parte del settore civile, industriale, agricolo e zootecnico e potenzialmente immesse nell'ambiente idrico.

**Tabella 1.** - Coefficienti per il calcolo dei carichi trofici (azoto e fosforo) divisi per settore di produzione

Settore	Parametro	Dati	Coeff. N	Coeff. P	Unità
Civile	Popolazione	Abitanti	4,50	0,67	kg/abitante
	Turismo	Presenze/365	4,50	0,67	kg/presenza
Industriale	Addetti	Classi ATECO5 da 10 000 a 45 000	10	(a)	kg/addetto
Agricoltura	Suolo coltivato	SAU	(b)	(b)	
	Suolo incolto	Sup. totale – SAU	2	0,10	kg/ha
Zootecnia	Bovini	Capi	54,80	7,40	kg/capo
	Equini	Capi	62,00	8,70	kg/capo
	Ovo-caprini	Capi	4,90	0,80	kg/capo
	Suini	Capi	11,30	3,80	kg/capo
	Pollame	capi	0,48	0,17	kg/capo

(a) per il carico di fosforo del settore industriale il CNR-IRSA suggerisce di considerare il 10% di quello attribuibile alla popolazione residente; (b): per il suolo coltivato (SAU) le quantità di N e P contenute nei fertilizzanti a livello regionale (dati ISTAT) sono state divise per gli ettari di SAU di ciascuna regione, in modo da ottenere un dato medio di N e P per unità di SAU; moltiplicando questo per la SAU di ogni comune (o di una provincia) si può stimarne il contributo comunale (o provinciale).

*Dati:* per popolazione, turismo e addetti vedi indicatori precedenti; per agricoltura e zootecnia: ISTAT, censimento generale dell'agricoltura 1960, '70, '80, '90, 2000 ed altre indagini campionarie con rilevazioni più frequenti.

*Descrizione:* calcolo delle quantità di N e P attraverso l'uso dei coefficienti di conversione messi a punto dal CNR-IRSA secondo la Tab. 1.

*Scopo:* valutare la pressione dovuta all'immissione nell'ambiente di nutrienti che, una volta trasferiti ai corpi idrici, possono essere un importante fattore di alterazione degli ecosistemi, soprattutto a carico della componente biologica.

*Unità:* t/anno.

#### • Carichi organici potenziali (pressione)

*Definizione:* stima dei carichi organici potenzialmente generati dal settore civile, industriale e zootecnico nell'area di interesse.

*Dati:* ISTAT, vedi indicatori precedenti.

*Descrizione:* calcolo degli abitanti equivalenti (AbEq) civili, produttivi e zootecnici nell'area di interesse (comune), attraverso l'uso di coefficienti di conversione secondo lo schema seguente:

- civile: numero di abitanti + (presenze turistiche/365)
- attività produttive: numero di addetti x coefficienti del CNR-IRSA (Tab. 2).
- zootecnia: numero di capi allevati x coefficienti del CNR-IRSA (bovini 8,16; equini 8,08; ovo-caprini 1,78; suini 1,95; pollame 0,20).

*Scopo:* valutare la pressione esercitata sulla qualità della risorsa idrica dai carichi inquinanti che teoricamente giungono ad essa.

*Unità:* AbEq.

**Tabella 2.** - Coefficienti per il calcolo dei carichi organici potenziali per le attività produttive

Cod. ATECO5	Coeff. CNR-IRSA	Cod. ATECO5	Coeff. CNR-IRSA
10100-10300	20	25110-25240	10
11110-11200	30	26110-26820	1,5
12000	0,6	27100-27540	2,3
13100-13200	5	28110-28756	2
15111-15990	98	29111-29720	1
16000	7,5	30010-30020	0,6
17110-17300	17	31101-32300	1
17401-18300	0,6	33101-33500	0,6
19100-19303	17	34100-36636	1,7
20100-20522	1,6	37100-37202	0,6
21110-21250	118	40100-40202	1,4
22110-22330	0,6	40300-41002	0,6
23100-24700	66		

#### • Traffico marittimo (pressione)

*Definizione:* quantificazione del traffico marittimo, sia commerciale che passeggero, nei principali porti in un anno e variazioni negli anni.

*Dati:* per passeggeri e merci movimentate (arrivi e partenze), indagini ISTAT a carattere discontinuo (1996 e 1997); per traffico petrolifero, Unione Petroli-fera 1995-99.

*Descrizione:* i dati sono riferiti singolarmente ai principali porti italiani (rappresentativi di oltre il 95% del traffico totale nazionale) e ai minori aggregati insieme.

*Scopo:* valutare la pressione esercitata sull'ambiente marino dal traffico marittimo ed i potenziali fattori di alterazione grave degli ecosistemi (rischi di sversamenti).

*Unità:* passeggeri (n/anno); merci (t/anno); petrolio (t/anno).

• **Flotta peschereccia (pressione)**

*Definizione:* dimensione della flotta di natanti da pesca presenti a livello regionale e nazionale e sua variazione nel tempo.

*Dati:* Archivio delle Licenze di Pesca (ALP) del Ministero Politiche Agricole e Forestali, anni 1993-1998 aggregati a livello regionale e nazionale.

*Descrizione:* numero imbarcazioni per anno, potenza motore espressa come kW e tonnellate di stazza lorda (TSL).

*Scopo:* valutare la pressione a cui sono sottoposte le popolazioni ittiche e, quindi, le possibili alterazioni della rete alimentare degli ecosistemi marini.

*Unità:* kW/anno; TSL/anno; n. natanti/anno.

• **Pesca (pressione)**

*Definizione:* quantità di prodotto ittico pescato in un anno, a livello nazionale e regionale, suddiviso per gruppi di specie.

*Descrizione:* le statistiche della pesca marittima e lagunare riguardano il prodotto ittico sbarcato dal naviglio italiano; esse derivano dalle segnalazioni di vari soggetti (cooperative di pescatori, mercati ittici costieri, Capitanerie di Porto ed uffici dipendenti). I dati più aggiornati si riferiscono al periodo 1993-1998 e sono aggregati a livello regionale o nazionale. Le specie considerate sono raggruppate in pesci, molluschi e crostacei.

*Scopo:* valutare la pressione a cui sono sottoposte le popolazioni ittiche, come prelievi della risorsa in termini assoluti e, quindi, le possibili alterazioni della rete alimentare degli ecosistemi marini, sia attualmente che nel tempo.

*Unità:* t/anno.

• **Acquacoltura (pressione)**

*Definizione:* distribuzione di impianti di allevamento di specie marine e relativa produzione a livello nazionale e regionale.

*Dati:* Associazione Piscicoltori Italiana (API), ultimo aggiornamento 1998.

*Descrizione:* i dati riportano la produzione totale nazionale delle varie specie allevate, suddivisa in intensivo ed estensivo per le principali specie, il numero di impianti censiti ed infine la suddivisione regionale dei vari impianti e relative produzioni per l'allevamento intensivo.

*Scopo:* stima dell'acquacoltura per indicare un possibile impatto sull'ambiente nel caso di aree delimitate (lagune e stagni) dove si pratica l'allevamento intensivo.

*Unità:* numero di impianti e gabbie; t/anno.

• **Indice trofico TRIX (stato)**

*Definizione:* grado di trofia delle acque marino costiere, considerando nutrienti e biomassa fitoplanctonica.

*Dati:* Servizio Difesa Mare del Ministero dell'Ambiente, 1996-2000, 2001-2003; Regioni.

*Descrizione:* l'indice trofico TRIX riassume in un valore numerico (in una scala di valori da 1 a 10) le condizioni di trofia del sistema di acque considerato e si calcola nel modo seguente:

$$\text{TRIX} = [\log_{10}(\text{Cha} \times \text{D\%O} \times \text{N} \times \text{P}) - (a)] \div b$$

Cha = clorofilla a [ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ]; D%O = ossigeno disciolto come deviazione percentuale assoluta della saturazione ( $100 - \text{O}_2\text{D\%}$ ); N = azoto inorganico disciolto [ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ]; P = fosforo totale [ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ]; a = -1,5 costante ricavata dai dati del Mar Adriatico settentrionale; b = 1,2 costante ricavata dai dati del Mar Adriatico settentrionale.

Oltre alla definizione matematica dell'indice, per la quale rimandiamo ad una trattazione più dettagliata nella specifica pubblicazione del CTN\_AIM [11], è importante chiarire e sottolineare il significato ecologico ed ambientale da attribuire al TRIX. Il DL.vo 152/99 nella tabella 17 dell'Allegato 1 (par. 3.4.3) associa ai valori di TRIX uno "stato ambientale" a cui corrispondono una serie di specifiche condizioni (Tab. 3). In tale maniera le acque marino costiere vengono classificate esclusivamente in base ad un indice di trofia che fornisce delle indicazioni solo su alcune delle condizioni del sistema considerato.

*Scopo:* la necessità di poter disporre di un criterio oggettivo per la classificazione delle acque marino-costiere riveste importanza essenziale nell'attività di pianificazione: l'uso della scala trofica rende possibile il confronto tra differenti sistemi costieri, per mezzo di una scala numerica che copre un'ampia gamma di situazioni, così come queste si presentano lungo tutto lo sviluppo costiero italiano, e più in generale, nella regione mediterranea.

*Unità:* 10 unità di TRIX; classi trofiche.

• **Indice di qualità batteriologica (IQB) (stato) (\*)**

*Definizione:* numero di campioni con assenza di coliformi fecali o di Streptococchi fecali in percentuale sul numero totale dei campioni prelevati per il controllo delle acque di balneazione.

*Dati:* Sistema Informativo Sanitario del Ministero della Salute, rapporti annuali dal 1990 al 2000.

*Descrizione:* il DPR 470/82 stabilisce, per il controllo delle acque di balneazione, 11 parametri da ricercare nelle acque sottoposte ad analisi: coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali, salmonella, pH, ossigeno disciolto, colorazione, trasparenza, oli

(\*) Attualmente questo indice è in corso di revisione (vedi pag. 122).

**Tabella 3.** - Classificazione delle acque marine costiere in base alla scala trofica

TRIX	Stato	Condizioni
2-4	Elevato	Buona trasparenza delle acque Assenza di anomale colorazioni delle acque Assenza di sottosaturazione di ossigeno disciolto nelle acque bentiche
4-5	Buono	Occasionali intorbidimenti delle acque Occasionali anomale colorazioni delle acque Occasionali ipossie nelle acque bentiche
5-6	Mediocre	Scarsa la trasparenza delle acque Anomale colorazioni delle acque Ipossie e occasionali anossie delle acque bentiche Stati di sofferenza a livello di ecosistema bentonico
6-8	Scadente	Elevata torbidità delle acque Diffuse e persistenti anomalie nella colorazione delle acque Diffuse e persistenti ipossie/anossie nelle acque bentiche Morte di organismi bentonici Alterazione/semplificazione delle comunità bentoniche Danni economici nei settori del turismo, pesca ed acquacoltura

TRIX: Indice trofico.

minerali, tensioattivi, fenoli. I prelievi vengono eseguiti ogni 15 giorni nel periodo compreso fra il 1° aprile e il 30 settembre di ogni anno ed i dati sono inviati al Ministero della Salute. Dato che i parametri, che determinano la qualità delle acque di balneazione, sono prevalentemente quelli batteriologici e che la loro presenza è esclusivamente dovuta ad apporti di acque dolci, è stato elaborato un indice che ne valutasse l'aspetto ambientale. E' stato, perciò, calcolato il numero di campionamenti con assenza (intesa come "non rilevabilità" secondo le procedure tecniche adottate in fase di analisi) di coliformi fecali o di Streptococchi fecali, in percentuale sul numero totale dei campioni prelevati: tanto più alto è il valore percentuale, tanto migliore è la qualità dell'acqua. Per semplicità di lettura e per una sostanziale analogia con la classificazione dell'indice trofico TRIX, è stato attribuito un giudizio valutativo alle classi percentuali secondo lo schema successivo:

- pessimo: 0-20%
- scadente: 20-40%
- mediocre: 40-60%
- buono: 60-80%
- elevato: 80-100%

*Scopo:* dare conto del livello di alterazione delle acque di balneazione e, quindi, delle acque costiere causato da immissioni di acque contaminate da scarichi civili.

*Unità:* percentuale.

#### • Balneabilità (impatto)

*Definizione:* rapporto percentuale tra la lunghezza (in km) della costa dichiarata balneabile su quella

effettivamente controllata e tra la costa vietata, sia per motivi dipendenti che indipendenti dall'inquinamento, ed il totale della costa.

*Dati:* Sistema Informativo Sanitario del Ministero della Salute, rapporti annuali dal 1990 al 2000.

*Descrizione:* tutte le zone permanentemente vietate alla balneazione sono indicate dalle Regioni (aree inquinate, porti, zone militari, zone di tutela integrale, ecc.) e vengono escluse dal sistema di controllo. Inoltre, tutte quelle zone dove non sono stati effettuati i controlli in numero sufficiente sono considerate non balneabili. In definitiva, sono stati calcolati i seguenti due rapporti, espressi in percentuale di costa e come variazione nell'ultimo quinquennio, sulla base dei dati pubblicati ogni anno dal Ministero della Salute: il primo è dato dalla costa balneabile, cioè tutta la costa dove non sia vietata, permanentemente o temporaneamente e per motivi dipendenti o indipendenti dall'inquinamento, la balneazione e dove vi sia stato un campionamento sufficiente, in rapporto alla costa effettivamente controllata, intesa come differenza tra quella teoricamente da controllare e quella poco o nulla campionata; il secondo risulta dalla lunghezza della costa vietata alla balneazione, permanentemente o temporaneamente e per motivi dipendenti o indipendenti dall'inquinamento, tranne quella sottoposta ad un qualche tipo di protezione o tutela ambientale per la quale sia interdotta alla balneazione (riserve marine, parchi, ecc.), rispetto al totale provinciale.

*Scopo:* la diversa interpretazione dei due rapporti consiste nel fatto che mentre il primo (costa balneabile/controllata) è sintomo esclusivamente di inquinamento delle acque, soprattutto dovuto a scarichi

urbani, e sensibile anche per una scala temporale limitata all'anno, il secondo (costa vietata/totale) è significativo per un impatto anche di tipo potenziale (antropizzazione della costa) e solo a scala temporale più ampia (i divieti permanenti mostrano variazioni significative solo considerando periodi di 5-10 anni).

*Unità:* percentuale.

#### • Bilancio depurativo (risposta)

*Definizione:* rapporto tra la necessità di depurazione e la reale capacità depurativa degli impianti esistenti nell'area di interesse.

*Descrizione:* per effettuare correttamente il bilancio depurativo, cioè stimare quanta parte del carico organico potenziale civile ed industriale venga effettivamente eliminato dagli impianti di trattamento prima di essere immesso nelle acque, bisognerebbe possedere tutta una serie di dati molto dettagliati. Si deve conoscere: per ciascun impianto depurativo: a) il reale bacino di utenza, cioè quali agglomerati sono effettivamente allacciati o lo dovrebbero essere, per stimare la necessità depurativa (in AbEq) con l'uso dei coefficienti appositi, b) la capacità di trattamento (in AbEq) di progetto e quella attuale, c) il livello di abbattimento del carico organico in ingresso, d) il recettore diretto dello scarico del depuratore ed il relativo bacino di appartenenza; per ciascun comune: quanti e quali depuratori sono presenti sul suo territorio e quanta parte delle industrie e della popolazione è allacciata ai diversi depuratori.

Purtroppo allo stato attuale i dati del reale bacino di utenza, anche solo riferito agli utenti allacciati, non sono facilmente reperibili, soprattutto non esiste un soggetto preposto alla raccolta e trasmissione di queste informazioni a livello nazionale. Esistono alcune indagini portate avanti dall'ISTAT nel 1993 [12], dalla Federgasacqua nel 1996 [13] e dal Nucleo Operativo Ecologico dei Carabinieri nel 1998, ma nessuna è sufficientemente dettagliata da fornire i dati disaggregati e/o con una copertura territoriale sufficiente. In seguito all'introduzione ed alla completa applicazione del DL.vo 152/99, che prevede l'identificazione degli agglomerati, quale unità base per la gestione di scarichi ed impianti di trattamento delle acque (art. 2, comma 1, lettera "m"), e che disciplina i limiti di emissione degli scarichi idrici in base alla potenzialità degli impianti di depurazione (Allegato 5), si prevede che tale deficit informativo verrà colmato. Inoltre, dato che lo stesso decreto prevede che tutte queste ed altre informazioni, necessarie per la redazione dei piani di tutela, vengano trasmesse dai vari soggetti detentori all'ANPA, si potrà avere una banca dati uniforme e completa. Nel frattempo, il CTN\_AIM tra il 1999 ed il 2000 ha effettuato una propria raccolta dati relativi a scarichi e depuratori presso tutte le province italiane, che, per quanto incompleta, ha fornito un quadro più

aggiornato e dettagliato rispetto alle indagini precedenti. Allora, in prima approssimazione, sono stati usati i dati dei carichi organici potenziali in AbEq del settore civile ed industriale del comune rapportati alla somma delle capacità massime di progetto di tutti i depuratori presenti sul territorio comunale. In definitiva, quindi, la formula utilizzata per il calcolo del bilancio depurativo di ogni comune è:

$$\frac{\sum_{i=1}^n AbEq_{(prog.)}}{(COP_{(civile)} + COP_{(industr.)})} \times 100$$

AbEq(prog) = capacità di trattamento di progetto di ogni impianto; n = numero di depuratori presenti sul territorio comunale; COP = carico organico potenziale, civile o industriale.

*Scopo:* valutare la risposta, nel tempo, della pubblica amministrazione alla pressione esercitata sulla qualità della risorsa idrica dagli scarichi non sottoposti a depurazione.

*Unità:* percentuale.

#### • Catasto degli scarichi (risposta)

*Definizione:* realizzazione del catasto degli scarichi nelle province costiere e valutazione in base ai metadati del catasto: tipo di dati contenuti, loro aggiornamento ed informatizzazione.

*Dati:* Province.

*Definizione:* in base alla Legge 319/76 (Legge "Merli") veniva demandato alle Province il compito di tenere un catasto degli scarichi, pubblici e privati, che recapitano nei corpi idrici superficiali e con la successiva Delibera del Comitato Interministeriale del 4 febbraio 1977 venivano dati i criteri metodologici per la formazione e l'aggiornamento del catasto. Nonostante queste norme, molte delle Province italiane a tutt'oggi ancora non posseggono un catasto o lo hanno in forma assai approssimativa e con scarso aggiornamento. Del resto i metadati relativi ai catasti, cioè le informazioni sulle caratteristiche dei dati (la loro presenza, consistenza, tipologia, qualità, ecc.), possono essere utilizzate per la costruzione di un indicatore di risposta. In quest'ottica si ritiene importante fornire un esempio di come si potrebbe calcolare l'indicatore, assegnando un valore numerico al giudizio espresso sui principali dati che un catasto dovrebbe contenere e classificando i catasti provinciali sulla base del punteggio ottenuto. Sono state considerate come prioritarie tutte quelle informazioni in qualche modo già specificate dalla Delibera del 1977 e, comunque, necessarie affinché il catasto non sia uno strumento burocratico per il rilascio di autorizzazioni, ma utile per un controllo degli scarichi ed una gestione dei

**Tabella 4.** - Valori assegnati al giudizio sul livello di informazioni contenute nel catasto provinciale degli scarichi in base ai principali metadati

Parametro	Metadato	Valore assegnato	Ambito
Catasto	Presenza	+	
	Assenza	-	
Aggiornamento	Annuale	3	0-3
	Altro	1,5	
	Assente	0	
Tipologia scarico	Classificazione a 3 o più voci	1	
	Classificazione da 1 a 2 voci	0,5	
	Senza classificazione	0	
Localizzazione scarico	Dettagliata <sup>(a)</sup>	1	0-3
	Approssimativa <sup>(b)</sup>	0,5	
	Assente	0	
Corpo idrico recettore	Indicazione completa <sup>(c)</sup>	1	
	Indicazione parziale <sup>(d)</sup>	0,5	
	Assente	0	
Dati di portata	Sempre presenti	3	0-3
	Non sempre presenti	1,5	
	Assenti	0	
Dati di qualità - COD	Sempre presenti	1	
	Non sempre presenti	0,5	
	Assenti	0	
Dati di qualità - N	Sempre presenti	1	0-3
	Non sempre presenti	0,5	
	Assenti	0	
Dati di qualità - P	Sempre presenti	1	
	Non sempre presenti	0,5	
	Assenti	0	
Dati su depuratori	Dettagliata <sup>(e)</sup>	3	0-3
	Approssimativa <sup>(f)</sup>	1,5	
	Assente	0	

(a) con indicate le coordinate geografiche (ed il *datum*), la località ed il comune; (b) con indicata solo la località ed il comune; (c) nome del recettore diretto e del bacino idrografico di appartenenza con indicazione di eventuali sottobacini e/o affluenti per giungere all'asta principale; (d) nome del recettore diretto; (e) almeno con indicato tipo di trattamento, potenzialità e capacità di servizio (AbEq) e localizzazione; (f) con indicato il tipo di trattamento e la localizzazione.

corpi idrici, in un quadro normativo più aderente al DL.vo 152/99 rispetto alla vecchia impostazione della Legge Merli. Nella Tab. 4 sono stati assegnati i valori cercando di equilibrare i pesi delle diverse tipologie di metadati, raggruppando quelli che fornivano informazioni generali circa lo scarico stesso (tipologia, localizzazione e corpo idrico recettore) e quelle riferite alla qualità chimica (concentrazioni di COD, azoto e fosforo), lasciando invece distinti gli altri, in modo da avere 5 ambiti omogenei (da 0 a 3 punti ciascuno). Tale "pesatura" potrà essere rivista una volta che saranno a disposizione un maggior numero di informazioni su tutte le province. A partire dalla somma dei punteggi ottenibili, si è poi proceduto all'attribuzione di una

classe che rappresentasse il livello di un catasto provinciale, individuando 6 diversi ambiti e conseguenti classi (da A ad F), oltre ad una classe 0 (zero), nel caso in cui (mai verificatosi) un'amministrazione provinciale avesse risposto alla nostra indagine affermando di non possedere un catasto (Tab. 5).

*Scopo:* evidenziare il grado di attenzione verso il controllo e la tutela delle acque ed il livello di organizzazione messo in piedi per rendere efficiente il sistema.

#### • Aree protette (risposta)

*Definizione:* estensione in ettari delle superfici marine delle aree sottoposte a protezione (parchi, riserve, oasi, aree di tutela, ecc.) nel tempo e per regione.

**Tabella 5.** - Classificazione dei catasti degli scarichi in base ai punteggi dei metadati

Catasto	Punteggio		Classe	Giudizio
	Min.	Max.		
Presente	13,5	15,0	A	Efficiente, completo ed aggiornato
Presente	12,0	13,0	B	Completo ed abbastanza aggiornato
Presente	9,0	11,5	C	Abbastanza completo, poco aggiornato
Presente	6,0	8,5	D	Buon numero di informazioni ed abbastanza dettagliate
Presente	3,5	5,5	E	Informazioni insufficienti e poco dettagliate
Presente	0,0	3,0	F	Informazioni scarse ed approssimative
Assente			0	Catasto assente

*Dati:* Servizio Difesa Mare e Servizio Conservazione della Natura del Ministero dell'Ambiente.

*Descrizione:* per questo indicatore sono stati utilizzati i dati sull'estensione delle aree marine protette già istituite e sul loro andamento temporale, negli anni 1986-1998, a partire quindi dall'anno di istituzione delle prime riserve marine (Ustica e Trieste).

*Scopo:* verificare il livello di attenzione rivolta alla salvaguardia di un dato ambiente ed identificare le zone dove tale necessità è stata recepita.

*Unità:* ha (ettari).

### Discussione

Si espone, qui di seguito, un breve commento sugli indicatori utilizzati esaminando i principali aspetti metodologici sulla reale possibilità di costruzione attuale e futura e sulla significatività degli indicatori.

*Popolazione e densità di popolazione.* - Indicatori ben strutturati, la cui copertura temporale e spaziale, ivi compreso il livello di disaggregazione, sono garantiti da un sistema di raccolta consolidato ed efficiente, sostanzialmente ISTAT, che non presenta problemi per il futuro.

*Presenze turistiche e incidenza del turismo.* - Indicatori importanti, ma attualmente non è facile reperire i dati di dettaglio (livello comunale) ed aggiornati sulle presenze turistiche. E' sicuramente migliorabile attraverso flussi informativi più efficienti, che sono potenzialmente realizzabili in tempi brevi (1-2 anni), ma sarebbe importante avere dati di tipo mensile e differenziati per tipologia turistica, problema di più difficile soluzione.

*Attività produttive.* - Questo indicatore appare sufficientemente dettagliato, sia per copertura spaziale e temporale sia per differenziazione delle attività, non presenta problemi interpretativi ed il suo significato informativo, sebbene di pressione antropica abbastanza generica sulle acque, è importante per una valutazione del comparto industriale, in attesa che si individuino strumenti migliori e più specifici per questi aspetti: resta aperta la questione se debba essere considerato un vero indicatore di pressione o piuttosto di driving.

*Carichi fluviali.* - Si tratta di un indicatore assai importante per lo studio dell'ambiente marino costiero, ma di non facile applicazione, vista la grande carenza di informazioni sui dati quantitativi dei corsi d'acqua. La sua importanza è stata verificata, nell'analisi integrata delle acque costiere, con la mancanza di significatività degli altri indicatori di carico nel caso delle zone influenzate da foci fluviali. Inoltre, vista la limitata conoscenza dei processi di sedimentazione, trasporto orizzontale e verticale, e delle caratteristiche idrodinamiche di queste aree, non è possibile sapere come e quanto influiscano questi apporti fluviali sugli ecosistemi costieri.

*Carichi organici potenziali e carichi trofici.* - Indicatori teoricamente fondamentali per valutare queste pressioni sulle acque, ma, essendo costruiti utilizzando vari dati, risentono della disomogeneità di questi, soprattutto a causa di raccolte dati non contemporanee. Inoltre, i coefficienti da utilizzare non soddisfano a pieno, per carenza di evidenze sperimentali dirette e per una mancanza di adattamento alle diverse situazioni territoriali. Entrambi gli indicatori devono essere, comunque, mantenuti, anche per approfondire verifiche ed analisi, e, contemporaneamente, si deve lavorare per migliorarne la definizione.

*Traffico marittimo.* - Indicatore sufficientemente definito, anche se gli aggiornamenti sarebbero necessari con maggior frequenza. Il suo contenuto informativo è buono, ma manca un indicatore di stato al quale correlarlo, in quanto si riferisce ad una pressione generica che grava sugli ecosistemi marini, non solo costieri, e sulla disponibilità delle risorse, mentre il TRIX dà conto del solo aspetto trofico ed è legato alle acque costiere, così come la balneabilità è relativa ad inquinamenti essenzialmente civili e solo per le acque di balneazione. E' importante, ma perde di valore se non si individuano indicatori di stato e di impatto che descrivano anche gli altri aspetti della qualità degli ecosistemi marini.

*Flotta peschereccia, pesca e acquacultura.* - Questi tre indicatori sono, al momento, troppo poco dettagliati e danno conto solo di un livello nazionale di pressione sulle risorse ittiche. Probabilmente sarà possibile in un prossimo futuro reperire dati disaggregati, ma resta,

comunque, il dubbio sul tipo di dati e sul loro reale contenuto informativo, vista l'incertezza sulle zone di attività delle imbarcazioni da pesca e sul rapporto tra pesce allevato e pescato. Inoltre, come per il traffico marittimo, non esistono per ora indicatori di stato o di impatto da mettervi in relazione: si sospende quindi il giudizio di merito se considerarli per la valutazione ambientale.

*Indice trofico TRIX.* - Di fatto è l'unico indicatore di stato riconosciuto a livello nazionale (anche perché previsto da una norma), ma questo fatto non deve portare ad una sua sopravvalutazione di utilizzo e di potenzialità informativa, riferendolo come indice di qualità ambientale in senso lato delle acque marine. Innanzitutto, si tratta di un indicatore che riferisce solo delle caratteristiche trofiche (quantità di biomassa fitoplanctonica e nutrienti) degli ecosistemi marini, aspetti fondamentali, ma certo non esaustivi della complessità ecosistemica, non riferendo per esempio della biodiversità, della disponibilità delle risorse ittiche o dell'inquinamento chimico e fisico. Inoltre, essendo riferito solo alla matrice acquosa, non è applicabile ad una valutazione che comprenda sedimenti marini e biota, come invece deve fare un indice di qualità ambientale. Infine, la sua significatività è stata dimostrata per le acque strettamente costiere, soprattutto se a scarso ricambio e fortemente influenzate da apporti terrigeni (di tipo "adriatico"), mentre sembra non molto sensibile per le altre tipologie. Comunque, resta un indice potente per valutare i fenomeni di eutrofizzazione, ponendolo in diretto rapporto con molti dei determinanti (popolazione e densità di popolazione) e delle pressioni (attività produttive, carichi organici potenziali e carichi trofici) previste dal nostro sistema di indicatori e la sua validità statistica non si pone in discussione. E' necessario individuare altri indicatori che forniscano informazioni sintetiche sugli aspetti soprattutto biologici (biodiversità, biocenosi, ecc.) e che si possano riferire anche a zone di mare non strettamente costiere.

*Indice di qualità batteriologica (IQB).* - Questo indice ha già dimostrato una sufficiente affidabilità e significatività, soprattutto nel segnalare situazioni di contaminazione localizzata anche non grave. La grande potenzialità offerta da un database omogeneo e disponibile a livello nazionale, con un dettaglio spaziale estremamente puntuale ed una copertura temporale di oltre 10 anni, lo rende uno degli indici più promettenti per il futuro, soprattutto se migliorato dal punto di vista statistico. Da poco si sta sperimentando un nuovo sistema di classificazione per l'IQB, che renda conto non solo della frequenza di comparsa dei Coliformi fecali nei campioni, ma anche delle concentrazioni che questi raggiungono, prendendo in considerazione i valori guida e imperativi della direttiva CEE/76/160. I due aspetti sono stati combinati assegnando un punteggio alle diverse possibilità e considerando il risultato finale: è stata data

un'importanza crescente al fatto che le concentrazioni fossero comprese tra valori guida (corrispondenti ai limiti della norma italiana, DPR 470/82) e gli imperativi, oppure superiori a questi ultimi. Da queste combinazioni, risultano 5 classi calcolate sulla base dei punteggi totalizzati, assumendo come punto fermo di considerare come condizione "incontaminata" solo quella con il massimo punteggio e di penalizzare fortemente laddove venivano superati i limiti imperativi in più di un campione all'anno e cercando di dare una distribuzione omogenea di combinazioni nelle classi intermedie, come si può vedere nello schema risultante [14].

*Balneabilità.* - Questo indicatore è concettualmente corretto, ma il livello di definizione normalmente messo a disposizione dal Ministero della Salute con i suoi rapporti annuali non è soddisfacente: sarebbe necessario avere i dati disaggregati almeno a livello comunale ed ancor di più quelli inerenti al giudizio di idoneità (a fine stagione) sul singolo punto di campionamento. Infatti, disponendo di dati analitici puntuali si potrebbe arrivare ad una scala di valori più differenziata, corrispondente alle realtà locali e con possibili correlazioni con l'IQB. In tal modo, inoltre, sarebbe possibile svincolarsi dalle diverse forzature contenute nelle definizioni di zone vietate o da controllare che compaiono nelle statistiche ufficiali del Ministero.

*Bilancio depurativo.* - Questo indicatore è essenziale, sia per valutare gli sforzi verso una protezione ed una corretta gestione delle risorse idriche, sia per evidenziare quanto dei carichi organici potenziali raggiunga effettivamente i corpi idrici, ma attualmente non esistono dati disponibili per una sua corretta costruzione. Il tentativo fatto di adattarne la formulazione ai dati reperibili non sembra offrire sufficienti garanzie di affidabilità e significatività, tali da poterne operare un'analisi di dettaglio, ma solo per dare un quadro a livello forse regionale e nazionale e fornire qualche indicazione generale.

Il suo miglioramento è legato essenzialmente alla piena operatività del DL.vo 152/99, che prevede la raccolta dei dati necessari alla corretta costruzione dell'indicatore ed un soggetto unico (ANPA) depositario dei dati stessi a livello nazionale, altra condizione importante finora mancante. Comunque, fino ad allora se ne può utilizzare la versione modificata, con tutte le cautele viste.

*Catasto degli scarichi.* - Si tratta di una semplice ipotesi di come potrebbe essere valutata una risposta da parte delle amministrazioni provinciali, per vedere se ciò che le norme prevedono viene messo in pratica e, soprattutto, se quando ciò avviene lo si fa solo per esigenze burocratiche ed amministrative od anche per dotarsi di strumenti utili alla programmazione ed alla gestione del territorio. Nel caso specifico, il catasto degli scarichi, pur essendo previsto da 25 anni, risulta ancora non attivato in molti casi o, comunque, del tutto statico e inutile, quindi evidenzia abbastanza bene il grado di

attenzione verso queste problematiche. Il problema fondamentale è quello del reperimento dei dati, mentre eventuali modifiche nella formulazione e nella definizione di coefficienti e scala di sensibilità saranno non solo possibili, ma anche inevitabili avendo a disposizione dati completi e aggiornati ed applicando l'indicatore in modo completo su tutto il territorio nazionale.

*Aree protette.* - Indicatore la cui significatività, nel caso specifico delle riserve marine, non scende al di sotto della scala regionale, essendo l'istituzione di nuove aree evento raro nello spazio e nel tempo e determinato da leggi nazionali.

Lavoro presentato su invito.

Accettato il 22 ottobre 2002.

#### BIBLIOGRAFIA

- Bucci M, Cavalieri S, Comperini W, Giovanardi F, Mazzoni M, Melley A, Montanari G, Raffetto G, Ressa M, Siligardi M, Spaggiari R. *Manuale di elaborazione indicatori e indici*. Roma: ANPA; 1999. (RTI CTN\_AIM 1/1999).
- Bucci M, Mazzoni M, Melley A. *Verso il 1° rapporto sui corpi idrici italiani*. Firenze: ANPA-ARPAT; 1999.
- Bonadonna L, Bucci M, Di Girolamo I, Dottarelli P, Fabiani C, Gramaccioni L, Bozzelli M, Mazzoni M, Melley A, Oleari F, Rosini R, Sarti N, Vescovi U, Zapponi A. Le pressioni ambientali e la balneazione. Un caso di studio: la Toscana. In: *Qualità delle acque di balneazione. Rapporto 1999*. Roma: Ministero della Sanità, Sistema Informativo Sanitario; 2000.
- Bolognini L, Bonadonna L, Brun F, Bucci M, Colagrossi R, Coltelli E, Erbi G, Ferrari S, Gambassi F, Iozzelli M, Loi S, Macis S, Melley A, Meloni G, Mulas G, Strino V, Vescovi U. Pressioni ambientali e balneabilità. Emilia-Romagna, Marche, Sardegna, Toscana. In: *Qualità delle acque di balneazione. Rapporto 2000*. Roma: Ministero della Sanità, Sistema Informativo Sanitario; 2001.
- Primo rapporto SINAnet sulle acque*. Roma: ANPA; 2001. (Stato dell'Ambiente, 3/2001).
- Melley A, Iozzelli M. *Rapporto sullo stato delle acque marine in Toscana 2001*. Firenze: Regione Toscana; ARPAT; 2001.
- Organization for Economic Co-operation and Development. *Coastal zone management-integrated policies*. Paris: OECD; 1993.
- Hinrichsen D. *Coastal waters of the world: trends, threats and strategies*. Washington DC: Island Press; 1998.
- Miller BT. *The living ocean*. Washington DC: Island Press; 1999.
- European Environment Agency. *Environment in the European Union at the turn of the century*. EEA; 1999. (Environmental assessment report, 2).
- Montanari G, Giovanardi F, Melley A. *Gli indici trofici per le acque marine costiere*. Roma: ANPA; 2000. (RTI CTN\_AIM 1/2000).
- Istituto Nazionale di Statistica. *Il processo di depurazione e la qualità delle acque reflue urbane. Anno 1993*. Roma: ISTAT; 1998. (Informazioni, 67).
- PROAQUA. *L'impatto sul servizio idrico della direttiva CEE 91/271 concernente il trattamento delle acque reflue urbane*. Roma: PROAQUA Istituto per studi e ricerche sui servizi idrici; 1996.
- Cavalieri S, Giacomelli V, Mazzoni M, Melley A, Pistozzi V. *Manuale di indici ed indicatori per le acque*. Roma: ANPA, 2003. (AIM\_T\_MAN\_01\_01). (in stampa).