

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Microbiologia delle acque  
di diversa derivazione**

A cura di  
Francesca Anna Aulicino e Laura Volterra  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**04/14**

Istituto Superiore di Sanità

**Microbiologia delle acque di diversa derivazione.**

A cura di Francesca Anna Aulicino e Laura Volterra

2004, ii, 144 p. Rapporti ISTISAN 04/14

È sempre più evidente la necessità di un approccio globale nello studio della qualità di acque superficiali e profonde, più o meno esposte a fenomeni di contaminazione ambientale o di inquinamento antropico. La loro qualità variabile ha un costo economico per una comunità e influisce sulle potenzialità d'uso. Le acque inquinate in genere, e quelle reflue in particolare, devono essere considerate sia per i rischi sanitari, cui possono soggiacere le persone che vengano in contatto con esse, sia per i problemi ecologici connessi alla contaminazione ambientale e dei corpi idrici ricettori. Nel presente rapporto sono raccolti lavori mutuati da attività di ricerca patrocinate dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) come i Progetti di ricerca triennali dell'ISS 1997-1999: "Le acque di falda: nuovi indicatori di qualità e rischio sanitario" e Convenzione PR-28IS 1999-2000 che ha riguardato indagini microbiologiche di reflui per l'influenza sui corpi idrici recettori. Questi lavori sviluppano nuovi obiettivi di misura e controllo della contaminazione di vari tipi di comparti idrici. Sono anche toccate tematiche connesse alle acque di balneazione. È trattato inoltre il tema dell'aggiornamento bibliografico, capitolo nodale per l'informazione scientifica in questo settore.

*Parole chiave:* Microbiologia, Comparti idrici, Acque di falda, Liquami, Acque potabili, Acque superficiali, Acque sotterranee, Acque di balneazione

Istituto Superiore di Sanità

**Microbiology of different kinds of waters.**

Edited by Francesca Anna Aulicino and Laura Volterra

2004, ii, 144 p. Rapporti ISTISAN 04/14 (in Italian)

Surface and groundwaters of any origin need to be studied according to a global approach. Environmental contamination and human pollution affect water quality. This fact has costs for each community and reduces the potential use of water. Generally polluted waters, particularly sewages, have to be considered both as a sanitary risk for people that come in touch with them and as ecological problem for environment included receptor waters. In this report we have collected papers derived from research activities sponsored by the Istituto Superiore di Sanità (Triennial projects 1997-1999: "Groundwater: new indicators of quality and sanitary risks" and "Program Environmental protection PR28IS: Microbiological investigation on sewages to evaluate their influence on environment"). These papers include new systems for measuring and monitoring contamination in various kinds of water-related areas, including bathing waters. The relevance of up to date of bibliography is also treated.

*Key words:* Microbiology, Water-related areas, Groundwaters, Sewages, Drinking waters, Surface waters, Bathing waters

Per informazioni su questo documento scrivere a: [aulicino@iss.it](mailto:aulicino@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

---

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

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2004

# INDICE

<b>Microbiologia delle acque sotterranee e aspetti sanitari</b> <i>Francesca Anna Aulicino</i> .....	1
<b>Problematiche concernenti le acque destinate al consumo umano</b> <i>Laura Volterra, Francesca Anna Aulicino</i> .....	12
<b>Protocollo analitico per lo studio microbiologico di acque di falda</b> <i>Laura Volterra, Francesca Anna Aulicino</i> .....	24
<b>Contaminazione microbiologica di corpi idrici superficiali utilizzati come fonte di acque potabili</b> <i>Fabiano Bitonte, Alessandro Micheli</i> .....	37
<b>Valutazione dell'esposizione a microrganismi aerodispersi e composti volatili nella filtropressatura dei fanghi biologici di depurazione delle acque reflue urbane</b> <i>Stefano Basilico, Gabri Brambilla, Antonio Colombi</i> .....	43
<b>Alcuni criteri per la valutazione dei punti critici degli acquiferi in ambiente dolomitico</b> <i>Fabio Decet</i> .....	51
<b>Settore ambiente: terminologia nella ricerca per soggetto nel recupero dell'informazione</b> <i>Maria Cristina Calicchia</i> .....	63
<b>Acque di falda della provincia di Catania: esperienze su nuovi parametri di caratterizzazione della qualità</b> <i>Marta Finocchiaro, Maria Rita Pinizzotto</i> .....	74
<b>Indicatori ed enteropatogeni nelle acque ad uso umano in una ULSS dell'arco alpino orientale</b> <i>Domenico Grazioli, Rosanna Burigo</i> .....	90
<b>Inquinamento di tipo agricolo nelle falde acquifere della provincia di Udine</b> <i>Anna Lutman, Walter Avoscan, Ivan Ciani, Paolo Coan, Giannantonio Gava, Renato Nardini, Ludovico Pressello</i> .....	96

<b>Epidemie di epatite A in Italia e possibili indagini su matrici ambientali</b> <i>Graziella Morace, Maria Rapicetta</i> .....	110
<b>Analisi microbiologiche su acque di falda della provincia di Treviso</b> <i>Marina Raris, Franco Rigoli, Valentina Catto, Biancarosa Fiorotto, Alfredo Mussato</i> .....	118
<b>Applicazione di un protocollo di lavoro sulle acque di falda nella provincia di Rieti</b> <i>Adriana Vecchi, Cesare Pezzotti</i> .....	125
<b>Circolazione di <i>Vibrio cholerae</i> in ambienti contaminati da liquami</b> <i>Ennio Zaottini</i> .....	132
<b>Fattori di pressione per la salute connessi con la balneazione</b> <i>Laura Mancini, Marcello Iaconelli, Giovanni Alfredo Zapponi, Francesca Anna Aulicino, Annamaria D'Angelo</i> .....	139

# MICROBIOLOGIA DELLE ACQUE SOTTERRANEE E ASPETTI SANITARI

Francesca Anna Aulicino

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

## Introduzione

Le attività antropiche e gli eventi naturali possono essere causa di contaminazione degli acquiferi, che possono arricchirsi di materiali indesiderati tra i quali possono essere annoverati microrganismi come batteri, virus e protozoi patogeni.

L'incremento della popolazione e la sempre maggiore richiesta di acqua rendono necessario un approccio critico alla gestione delle risorse di acque sotterranee. Ciò deve essere particolarmente sentito per quei territori nei quali le acque sotterranee rappresentano la risorsa idrica preponderante. È il caso del nostro paese nel quale l'acqua utilizzata dalla popolazione è in percentuale elevata di provenienza sotterranea l'80% circa.

È opinione diffusa che le acque sotterranee siano generalmente di buona qualità, considerata la naturale azione del terreno che funziona come un vero e proprio filtro nei confronti di microrganismi contaminanti provenienti dagli strati superiori della crosta terrestre. In realtà non sono ben conosciuti e approfonditi aspetti peculiari e importanti di questo tipo di risorse idriche, in particolare, la loro distribuzione, i loro movimenti e la loro suscettibilità alla contaminazione. In conseguenza di ciò possono essere attuate azioni le cui conseguenze si estrinsecano in veri e propri danni su un tipo di risorsa che dovrebbe essere considerata preziosa.. Per una oculata gestione delle acque sotterranee è corretto ed efficace affrontare ognuno di questi aspetti considerandoli in un approccio globale. Va, perciò, perseguita la gestione globale dei bacini idrogeologici, considerandone gli aspetti geologici, idrologici, analitici e pedologici. Inoltre mai come oggi è importante l'aspetto della comunicazione gestionale, che significa coinvolgimento della popolazione, sia quella utilizzatrice della risorsa, sia quella coinvolta come del bene pubblico.

## Microbiologia del sottosuolo: la storia

I primi studi sulla microbiologia del suolo condotti nel 1919 indicavano che i microrganismi diminuivano con l'aumentare della profondità e negli anni successivi era opinione comune che i microrganismi fossero assenti negli acquiferi. Nello stesso periodo, però, furono concepite anche le prime ipotesi sulla presenza di microrganismi in acquiferi. Un geologo, Sherburne Rogers, verificò che in un'area petrolifera la composizione dell'acqua di acquiferi profondi era ricca in solfato e povera in bicarbonato a differenza delle acque salmastre associate a idrocarburi, che, al contrario presentavano elevate concentrazioni di bicarbonato e la quasi totale assenza di solfato. Il geologo ipotizzò che la coesistenza dell'acqua sotterranea e degli idrocarburi portava all'ossidazione degli idrocarburi con riduzione del solfato ad opera di batteri solfato riducenti e produzione di bicarbonato. Successivamente, nel 1926, Edson S. Bastin riuscì ad indurre la crescita di batteri solfato riducenti in acque provenienti da pozzi petroliferi affermando che la causa del basso contenuto in solfato in quelle acque era senz'altro imputabile

ad essi. Negli anni successivi pur se l'idea della presenza di microrganismi in acquiferi profondi destava interesse, non furono fatti molti passi avanti, anzi intorno agli anni '50, Foster dimostrò, con una serie di esperimenti, come alcune reazioni chimiche dell'acqua, che erano attribuite ai batteri solfato riducenti, di cui, gli assertori della teoria microbica delle reazioni chimiche del sottosuolo, non riuscivano a dimostrare la presenza, in effetti potevano avvenire in assenza di questi batteri. Egli suggerì che il materiale organico sedimentario, soggetto a processi dinamochimici come aumenti di temperatura e pressione, eliminava progressivamente gruppi carbossilici producendo anidride carbonica, che reagendo con minerali carbonati dava luogo alla produzione di bicarbonati. Il lavoro di Foster ebbe un'enorme influenza sulla convinzione che i processi inorganici nelle acque sotterranee fossero quelli predominanti e che non ci fosse il coinvolgimento microbico. Accadde, comunque, che in Russia negli anni immediatamente successivi (1962), M.I. Gurevich riuscisse, invece, a dimostrare l'intervento microbico in reazioni chimiche di acque sotterranee per cui batteri come i solfo-ossidanti e i denitrificanti, a profondità di 1,8 km nel sottosuolo, erano responsabili della ossidazione dello zolfo. Il dibattito su questi temi (la produzione di anidride carbonica negli acquiferi è un processo chimico mediato da microrganismi?) proseguì per diversi anni ancora, tant'è che, come afferma Chapelle, il 20° secolo è considerato, in relazione alla microbiologia del sottosuolo alla stessa stregua del secolo 19° secolo in relazione al molto acceso il dibattito sulla natura biotica o abiotica del fenomeno della fermentazione. Fu proprio Chapelle a dimostrare definitivamente la origine biologica della produzione di anidride carbonica in acquiferi profondi e ciò è avvenuto nel 1986. I risultati dei lavori di Chapelle, quindi, dimostrano il coinvolgimento di microrganismi in processi geochimici che hanno impatto sugli acquiferi (1).

## Microrganismi presenti nelle acque sotterranee

I microrganismi presenti nelle acque sotterranee appartengono ai gruppi qui di seguito riportati:

- archeobatteri
- eucarioti
- procarioti (batteri)
- virus enterici.

I procarioti costituiscono il gruppo di gran lunga più nutrito nell'ambito dei microrganismi presenti negli acquiferi. Gli archeobatteri annoverano batteri termofili e metanogeni (questi ultimi caratterizzati dalla capacità di produrre metano a partire da anidride carbonica e idrogeno), batteri termoacidofili che vivono alle alte temperature e a bassi valori di pH, batteri alofili, che vivono nelle acque salmastre. Gli eucarioti sono alghe, funghi e protozoi, la cui presenza nelle acque sotterranee è meno numerosa (2-3 ordini di grandezza) di quella dei procarioti, in quanto il loro habitat è quello degli ambienti ossigenati, quindi, non si trovano negli acquiferi profondi.

I procarioti presenti nelle acque sotterranee possono essere suddivisi in:

- *litotrofi*  
Utilizzano carbonio inorganico (es. anidride carbonica o bicarbonato) come fonte di carbonio e una fonte esterna di energia. I chemiolitotrofi, ad esempio, sono litotrofi che ottengono energia dalla ossidazione di sostanze chimiche inorganiche ridotte (es. ferro ferroso o solfuri). I fotolitotrofi sono litotrofi che ottengono energia dalla luce solare
- *eterotrofi o orfanotrofi*  
Utilizzano carbonio organico come fonte energetica e di carbonio.

Tra i gruppi sopra elencati sono i batteri eterotrofi quelli dominanti negli acquiferi.

Per ottenere energia dal substrato i batteri rimuovono elettroni da un substrato e li trasferiscono ad altre sostanze, che fungono da accettori di elettroni. Si ha respirazione quando gli accettori di elettroni sono sostanze inorganiche come ossigeno, ferro ferrico, solfato. Si ha fermentazione quando gli accettori di elettroni sono sostanze organiche. I batteri aerobi sono quelli in cui l'accettore di elettroni è l'ossigeno. I batteri facoltativamente aerobi sono quelli che possono usare l'ossigeno come accettore, ma anche sostanze organiche (possono *respirare e fermentare*). Sono anaerobi quelli che crescono solo in assenza di ossigeno.

La Tabella 1 riporta i principali gruppi batterici rilevati in acque sotterranee (2-6).

**Tabella 1. Principali gruppi batterici rilevati nelle acque sotterranee**

<b>Gruppo batterico</b>	<b>Generi</b>
Gram negativi	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Azotobacter, Rhizobium</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Achromobacter, Alcaligenes, Alteromonas, Azomonas</i> <i>Aeromonas</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Agrobacterium</i> Batteri ferro precipitanti: <i>Gallionella</i> <i>Caulobacter</i> <i>Neisseria like microorganism</i> <i>Moraxella</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Chromobacterium</i> Batteri solfato riducenti: <i>Desulfovibrio, Desulfotomaculum</i> Batteri solfo-ossidanti <i>Geobacter metallireducens</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Cytophaga</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Proteus</i> <i>Salmonella, Shigella</i> <i>Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Erwinia, Serratia, Aerobacter</i> <i>Vibrio</i>
Gram positivi	<i>Micrococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Actynomyces</i> <i>Beggiatoa</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i>

I Gram negativi sono quelli presenti in maggiori quantità. Uno studio realizzato nel 1985 ha evidenziato una flora batterica composta per 2/3 da Gram negativi (2, 3). Tra i batteri presenti negli acquiferi *Pseudomonas* è il genere predominante, annoverando specie molto versatili in quanto a sostanze organiche da utilizzare come nutrimento. Hanno un metabolismo di tipo respiratorio non riescono ad operare fermentazione in condizioni di anaerobiosi, pur tuttavia possono usare vie alternative per il meccanismo respiratorio in carenza di ossigeno, ad esempio,

utilizzando il nitrato come accettore di elettroni (4). *Acinetobacter* è un altro genere molto comune nelle acque sotterranee (5).

*Gallionella* è un chemiolitotrofo che recupera energia dalla ossidazione di ferro ferroso in ferro ferrico. Essendo un aerobio obbligato e trovandosi il ferro ferroso in ambienti anaerobici, vive dove si mescolano acque aerobiche e acque anaerobiche.

Il *Desulfovibrio* fa parte del gruppo dei solfato riducenti, largamente distribuiti nelle acque sotterranee. Usano acetato come fonte di energia e solfato come accettore di elettroni. Microambienti anaerobici in ambienti aerobici supportano la crescita di questi microrganismi (3, 6).

*Geobacter* è un genere caratteristico e largamente distribuito nelle acque sotterranee. Usa come accettore di elettroni ferro trivalente idrossilico, ma è capace di ridurre anche il manganese tetravalente (3).

*Bacillus* e *Clostridium* sono Gram positivi sporigeni. Il primo ha un metabolismo respiratorio e fermentativo (aerobico), il secondo solo fermentativo.

L'ambiente delle acque sotterranee è caratterizzato dalla presenza di nicchie differenti che possono essere colonizzate da gruppi diversi di microrganismi. I diversi gruppi possono interagire in relazioni competitive e sinergiche. In quest'ultimo caso più che di generi isolati occorre parlare di consorti biologici, nell'ambito dei quali si stabiliscono delle vere e proprie relazioni tra gruppi microbici diversi. In questi ambienti, infatti, sopravvivono gruppi microbici in associazioni tali per cui le azioni metaboliche di un gruppo possono risultare utili a quelle di altri gruppi (7).

## Contaminazione delle acque sotterranee

Rispetto alle acque superficiali quelle sotterranee dovrebbero essere di qualità igienica migliore poiché gli strati del suolo agiscono su di esse come filtri naturali. Questo tipo di risorsa, comunque, può risultare contaminata da apporti provenienti dagli strati superiori o dalla superficie dei terreni e, in funzione, del tipo di terreno, che attraverso, può mantenere o meno i contaminanti acquisiti.

Le acque sotterranee costituiscono la parte del ciclo dell'acqua che scorre nel sottosuolo e che può essere esemplificativamente distinto in:

- precipitazione atmosferica,
- infiltrazione,
- percolazione,
- accumulo,
- emergenza (l'ambito nel quale si trovano le opere di presa dell'acqua).

La conoscenza e la gestione di ciascuna delle fasi del ciclo dell'acqua consente il controllo di eventi le cui conseguenze possono estrinsecarsi in contaminazioni più o meno massicce delle acque sotterranee. Ad esempio, una buona conoscenza, nella zona di infiltrazione, di quali sono tra gli apporti provenienti dal suolo quelli di origine antropica può aiutare molto a limitare/annullare il rischio di contaminazioni consistenti delle acque sotterranee. Ancora, ad esempio, può essere molto importante la verifica della presenza di flussi preferenziali nell'acquifero e la conoscenza del tempo minimo di arrivo, considerato che la presenza di questi flussi consente il trasporto più o meno rapido di contaminanti in sorgente. Eventuali contaminazioni di tipo antropico nella zona di infiltrazione potrebbero anche non destare particolari timori se fosse noto che il loro arrivo alla scaturigine avviene in tempi piuttosto lunghi in conseguenza, magari, della presenza di percorsi peculiari e/o di tempi di trasporto lunghi.

Nel suo ciclo naturale l'acqua, sia quella meteorica che quella proveniente dal dilavamento dei suoli o quella di derivazione fluviale o lacustre e che si infiltra dagli alvei, passa attraverso la zona di aerazione (zona insatura o area di ricarica), caratterizzata dalla presenza di una mistura di aria e acqua tra le rocce e le particelle del suolo. Qui l'acqua può essere assorbita dalle piante, essere scaricata in un corpo idrico ricevente, fluire nel suolo sottostante cioè nella zona di saturazione, che è l'acquifero (falda), definito come *formazione rocciosa o sedimentaria capace di accumulare, contenere e trasmettere (produrre, rendere) quantità di acqua a pozzi o sorgenti*.

È tra l'area di ricarica, cioè la zona insatura e la zona satura che si trovano zone ricche di elementi e composti chimici, come materiale organico particolato, ma anche carbonio, azoto e fosforo organici, metalli solubili e in tracce). Si tratta di zone ritenive per i microrganismi che in esse trovano un ambiente idoneo a supportarne la sopravvivenza e la crescita. Ed è da queste zone che si verifica il passaggio dei microrganismi nelle acque di falda, nelle quali possono divenire stanziali, se l'ambiente è idoneo, a supportarne la sopravvivenza e sviluppo, o possono sopravvivervi per tempi variabili se svantaggiati dalla carenza di nutrienti, da condizioni fisiche non idonee e dalla competizione biologica. Tra questi ultimi sono inclusi i microrganismi enterici.

Nei successivi paragrafi saranno descritti i fattori che permettono la permanenza e la sopravvivenza dei microrganismi nei suoli e quelli che ne provocano il distacco e il conseguente trasporto negli acquiferi.

## Permanenza dei microrganismi nei suoli

I batteri contenuti nelle acque e, quindi, anche quelli di origine enterica e, tra essi, anche i patogeni, che attraversano i suoli sono per la maggior parte filtrati dal suolo perché si adsorbono al materiale particellato ivi presente. I batteri sono biocolloidi caricati e la loro rimozione dalle acque percolanti è inversamente proporzionale alla grandezza delle particelle del suolo. Una volta adsorbiti possono rimanere in questo stato per periodi di tempo variabili in funzione di diversi fattori. I fattori che agiscono sull'adsorbimento batterico al suolo sono:

- presenza di cationi, che riducono le forze repulsive batteri/particelle del suolo,
- presenza di minerali di argilla, che forniscono i siti di adsorbimento sulle particelle del suolo,
- concentrazioni di sostanze organiche solubili, che competono con i microrganismi sui siti di adsorbimento delle particelle del suolo,
- valori di pH, per cui l'adsorbimento microbico aumenta in funzione inversa al suo valore (8).

Una volta adsorbiti al suolo i batteri possono permanervi per periodi variabili in funzione di diversi fattori. I principali fattori che influenzano questa persistenza sono:

- luce solare e temperatura (per gli strati più superficiali dei suoli),
- umidità,
- pH,
- sostanze organiche,
- tipo di microrganismo,
- microflora antagonista, che è rappresentata da batteri autoctoni e da protozoi predatori (9).

La disseccazione del suolo è un fattore importante di controllo per la sopravvivenza batterica: la diminuzione dell'umidità comporta diminuzione della persistenza batterica.

Per i virus i fattori che ne influenzano la persistenza nei suoli sono:

- luce solare e temperatura (per gli strati più superficiali dei suoli),
- umidità,

- pH,
- sostanze organiche,
- tipo di microrganismo,
- microflora antagonista presente nel suolo, la quale produce sostanze antivirali.

La persistenza è anche in funzione di specie virali diverse: Epatite A ha elevati tassi di persistenza nei suoli a differenza di altri virus enterici (10). Virus nei fanghi applicati ai suoli persistono anche 23 settimane in inverno e 2-4 settimane in estate o autunno.

I tipi di suolo che favoriscono adsorbimento per i virus sono soprattutto di tipo argilloso e quelli in cui vi è presenza di minerali come ematite e magnetite. Nell'adsorbimento al suolo intervengono forze elettrostatiche-idrofobiche (9). L'adsorbimento dei virus al suolo è influenzato dalla tessitura del suolo. I suoli argillosi adsorbono di più rispetto a quelli sabbiosi, che, invece, mostrano una scarsa affinità per i virus (11). Alcuni virus, come i poliovirus si adsorbono bene, altri come Echovirus 1 e 11, hanno bassa capacità di adsorbimento (12).

### **Trasporto dei microrganismi attraverso il suolo**

La composizione chimica dell'acqua sotterranea (grado di mineralizzazione), determinata dall'aggressività delle acque meteoriche e dalla solubilità delle rocce attraversate da essa, è un fattore molto importante per il trasporto e la sopravvivenza microbica. La solubilità delle rocce varia in funzione del percorso dell'acqua considerato sia come lunghezza che come durata.

L'acqua sotterranea è molto aggressiva, cioè povera di sali:

- se attraversa suoli poco solubili e
- se segue percorsi brevi e con tempi di permanenza limitati.

L'acqua è, invece, mineralizzata nel caso in cui:

- attraversi rocce solubili (carbonatiche) e/o
- soste a lungo nel sottosuolo.

Nella fase di attraversamento nel suolo le acque sotterranee deadsorbono ioni e forme biologiche vitali adsorbite o adese alle particelle del suolo o trasportano le particelle e le forme biologiche libere negli spazi interstiziali.

Lo spostamento microbico attraverso il suolo dipende da fattori quali, il flusso dell'acqua (piogge), la natura e lo stato di saturazione dei suoli (13).

Suoli porosi ostacolano lo spostamento di microrganismi, al contrario di suoli non porosi. Gli spostamenti delle particelle microbiche attraverso i suoli sono, infatti, massimi in suoli sabbiosi, che sono assimilabili, in quanto a trasporto microbico, a colonne cromatografiche, in cui il movimento di discesa dei microrganismi dipende dalla dimensione dei pori e dal volume, forma e peso dei microrganismi stessi (le cellule più grandi e pesanti si muovono più rapidamente, quelle capsulate, in quanto lisce sono avvantaggiate rispetto non capsulate (14,15)

Terreni carsici, quindi, mentre assicurano quantità elevate di acqua possono produrne di qualità scarsa. Suoli di natura argillosa e con elevata presenza di materiali organici, ricchi di cariche elettriche, ostacolano il progredire dei microrganismi verso gli acquiferi poiché tendono a trattenerli adsorbiti. Terreni porosi, quindi, assicurano una qualità dell'acqua migliore di quelli non porosi come i carsici, in quanto operano una vera e propria depurazione sulle acque, in funzione dello spessore, granulometria e composizione chimica dei terreni, ma anche del tipo e quantità degli inquinanti, della velocità del percolamento dell'acqua attraverso il suolo e del grado di saturazione dell'ambiente insaturo.

Forti piogge promuovono il trasporto batterico attraverso i suoli (9). Esperimenti di laboratorio condotti con misture di fanghi e suoli cui erano adsorbiti batteri indicatori hanno

mostrato che solo forti piogge (12,3 cm/giorno) inducono il trasporto di batteri verso il basso al fondo di una colonna di 8 piedi. Piogge meno consistenti non producono migrazione significativa di cellule batteriche. In condizioni ambientali normali, cioè in assenza di piogge consistenti o di altre condizioni particolari come presenza di scarichi, ecc., i batteri sono ritenuti in modo efficiente dal suolo e sono rilevabili solo in piccole quantità nelle acque sotterranee (16). Ad esempio, fanghi applicati al suolo non rilasciano la maggior parte di batteri e anche dei virus, che sono ritenuti sulla superficie del suolo, per cui il loro trasporto nelle acque sotterranee è improbabile.

Il meccanismo di trasporto dei virus attraverso il suolo è in dipendenza del tipo del suolo, del sierotipo del virus, della forza ionica della soluzione del suolo e del tasso del flusso idraulico.

Le piogge tendono a deadsorbire i virus poiché questi microrganismi si adsorbono poco in suoli in presenza di soluzioni a bassa forza ionica. Le piogge ridistribuiscono le particelle virali nell'ambito del profilo del suolo.

Quando si smaltiscono i liquami o acque con elevati carichi inquinanti il trasporto dei virus attraverso il suolo avviene mediante i materiali solubili organici e mediante gli acidi umici e fulvici. Il trasporto dei virus è incrementato anche dall'aumento del flusso idraulico

## Potenziali fonti di contaminazione

La Tabella 2 riporta alcune delle potenziali fonti di contaminazione delle acque sotterranee in funzione della vicinanza o della lontananza dalla superficie del suolo

**Tabella 2. Fonti potenziali di contaminazione delle acque sotterranee**

Origine della contaminazione	Potenziali fonti di contaminazione		
	<i>urbane</i>	<i>industriali</i>	<i>agricole</i>
Sulla superficie del suolo	Rifiuti urbani	Sostanze chimiche impropriamente gestite e/o sversate	Pesticidi, fertilizzanti e rifiuti di allevamenti impropriamente gestiti e/o smaltiti
Sotto la superficie del suolo	Discariche Perdite da condutture fognarie Vasche settiche Pozzi mal costruiti o abbandonati	Perdite da condotte Perdite da serbatoi sotterranei	Perdite da serbatoi sotterranei Pozzi mal costruiti o abbandonati

## Conseguenze della contaminazione microbiologica

Acque sotterranee contaminate da microrganismi patogeni possono essere causa di affezioni di tipo epidemico nella popolazione. Nonostante l'importanza della conoscenza della diffusione di malattie di origine idrica usualmente descritte come *epidemie*, nel nostro territorio e in Europa (eccetto che per UK) i dati al riguardo sono scarsi poiché non vi è un organizzato sistema di sorveglianza per la rilevazione di malattie di origine idrica nella popolazione e le indagini (incluse le analisi delle acque) per accertarne le cause. Purtroppo anche in paesi industrializzati mancano le risorse sia di personale che economiche che supportino questo tipo di indagini. Non sono previsti neanche impieghi di risorse per l'educazione e la sensibilizzazione della popolazione in tema di potenziale diffusione di malattie attraverso

l'utilizzo dell'acqua da bere. Dati di questo tipo sono disponibili relativamente a paesi come UK e USA. Negli Stati Uniti dal 1971, il CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), l'EPA (*Environmental Protection Agency*) e il CSTE (*Council of State Territorial Epidemiologists*) collaborano per l'organizzazione e il funzionamento di un sistema di sorveglianza per la rilevazione di epidemie di origine idrica e l'accertamento delle cause. Sono, inoltre pubblicati periodicamente i risultati di queste indagini accorpate in bienni (17-21).

Nelle Tabelle 3 e 4 sono mostrati rispettivamente i numeri degli episodi epidemici connessi all'utilizzo di acque destinate al consumo umano negli USA per il 1992-2000 e le percentuali riferite a quegli episodi risultati associati con l'utilizzo di acque sotterranee. Le epidemie, in questo decennio risultano essere 144 con il coinvolgimento di circa 30.000 persone (Tabella 3). Non risulta inclusa in questi numeri l'epidemia da *Cryptosporidium* di Milwaukee (derivata dall'uso di acqua superficiale contaminata), che si è verificata nel 1993 e che ha coinvolto 429.103 individui (Tabella 3). Nel 1999-2000 sono state accertate 39 epidemie di malattie associate all'uso di acqua potabile, che hanno coinvolto 2.068 persone, di cui 122 ospedalizzate e 2 morte. Il 68,4% degli episodi epidemici è risultato conseguente all'uso di acqua potabile di origine sotterranea (pozzi), il 5,3% all'uso di acqua sorgiva, il resto (13,2%) da acqua di origine superficiale (17). Considerando che negli Stati Uniti solo il 40% circa dell'acqua usata a scopo potabile è di origine sotterranea (22) e valutando le percentuali riportate nella Tabella 3 si evidenzia come le acque sotterranee risultino avere un certo peso nell'induzione di episodi epidemici nella popolazione.

**Tabella 3. Epidemie di origine idrica e individui coinvolti (Stati Uniti 1991-2000)**

Periodo	N. episodi epidemici	Individui coinvolti
1991-1992	34	17.464
1993-1994	29+1*	2.366 + 403.000*
1995-1996	23	2.654
1997-1998	19	3.495
1999-2000	39	2.068
<b>1991-2000</b>	<b>145</b>	<b>26.103 (429.103*)</b>

\*Epidemia di Milwaukee (440 ospedalizzati-100 morti)

**Tabella 4. Epidemie di origine idrica associate con l'utilizzo di acque sotterranee (Stati Uniti 1991-2000)**

Periodo	Epidemie associate alle acque sotterranee (%)
1991-1992	(28/34) 82%
1993-1994	(20/30) 67%
1995-1996	(13/23) 56%
1997-1998	(16/19) 84%
1999-2000	(29/39) 74%
<b>1991-2000</b>	<b>73%</b>

In parentesi i numeri reali delle epidemie imputabili al consumo di acque sotterranee sul totale delle epidemie

Si è rilevato che gli episodi epidemici sono connessi soprattutto ad assenza di trattamento delle acque, a trattamenti impropri delle acque e a problemi nella distribuzione.

Le cause degli episodi epidemici sono risultate ascrivibili a 3 diverse classi (Tabella 5):

- AGI (*Acute Gastrointestinal Illness of unknown etiology*: affezioni gastrointestinali acute di etiologia sconosciuta),
- infezioni,
- sostanze chimiche tossiche.

Gli episodi epidemici sono imputabili per percentuali variabili dal 25% al 68% a cause sconosciute (AGI), per il 25%-60% ad infezioni dovute a microrganismi patogeni e per il 7%-15% a sostanze chimiche tossiche. Le affezioni per le quali non è stato riconosciuto l'agente etiologico (AGI) sembrano, imputabili per una buona percentuale, per il complesso dei sintomi mostrati dalle persone implicate nelle epidemie, a contaminanti di origine virale (17-21). Episodi di intossicazioni da sostanze chimiche risultano indotti da presenza elevata di nitriti e di nitrati nelle acque, evidenziati dopo episodi di metaemoglobinemia in bambini (17) da presenze elevate di rame e di piombo, rilasciati dalle condutture o da vasche di stoccaggio dell'acqua (18, 19), ma anche da presenza di elevate quantità di fluoruri (18).

**Tabella 5. Percentuali degli eventi epidemici in relazione alle cause (Stati Uniti 1991-2000)**

Periodo	AGI %	Infezioni %	Sostanze chimiche %
1991-1992	68	25	7
1993-1994	25	55	20
1995-1996	54	31	15
1997-1998	27	60	13
1999-2000	47	46	7

Dal 1991 al 2000 è stato accertato un numero totale di 46 epidemie di origine infettiva (17-21). In esse sono risultati coinvolti i seguenti gruppi microbici:

- batteri nel 46% dei casi (21/46)
- virus nel 14% dei casi (6/46)
- protozoi nel 43% dei casi (20/46).

Le specie microbiche responsabili sono riportate nella Tabella 6 (17-21).

**Tabella 6. Specie batteriche, virali e protozoarie riconosciute responsabili delle epidemie di origine idrica registrate negli Stati Uniti dal 1991 al 2000**

Gruppo	Specie	N. episodi in cui sono risultati coinvolti (1991-2000)
<b>Batteri</b>	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	6
	<i>Campylobacter jejuni</i>	5
	<i>Shigella sonnei</i>	5
	<i>Salmonella typhimurium</i>	2
	<i>Shigella flexneri (1)</i>	1
	<i>Vibrio cholerae non- 01</i>	1
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1
<b>Virus</b>	Norwalk Virus	4
	Small Round Virus	1
	Virus dell'Epatite A	1
<b>Protozoi</b>	<i>Giardia intestinalis</i>	8
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	7
	<i>Giardia lamblia</i>	5

I microrganismi patogeni coinvolti sono, in larga misura, batteri, come *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, e Shigella, virus enterici, come Norwalk virus, e protozoi come *Cryptosporidium parvum* e *Giardia*.

*Escherichia coli* O157:H7 è una specie tossigena che causa pericolose gastroenteriti emorragiche che, nel 15% dei casi, evolvono in sindromi uremiche emolitiche, anche fatali. È stata isolata per la prima volta nel 1982, nell'ambito di una epidemia di diarrea emorragica causata dal consumo di carne di manzo poco cotta. La sopravvivenza di questo stipite di *E. coli* sembra essere molto prolungata in acqua a bassa temperatura (5 °C) (23).

I protozoi patogeni possono essere presenti in acque sotterranee come cisti (*Giardia*) e oocisti (*Cryptosporidium*) a seguito di contaminazione da liquami. Non è stato ben studiato il trasporto di questi microrganismi in forma cistica negli acquiferi. I protozoi patogeni possono essere trasportati in acquiferi, ma è riportato che è improbabile che si estendano a distanze maggiori di 10 metri dalla fonte inquinante (2).

Studi effettuati in UK (24) e analoghi a quelli condotti negli Stati Uniti mostrano risultati simili a quelli evidenziati negli Stati Uniti negli stessi anni. Nel trentennio 1970–2000 si rilevano casi di infezioni dovute all'uso di acqua potabile imputabili a patogeni emergenti come *Cryptosporidium*, *Campylobacter* ed *Escherichia coli* O152:H7). La prevalenza di *Cryptosporidium* può essere conseguente alla resistenza di questo protozoo ai trattamenti di disinfezione.

## Bibliografia

1. Chapelle FH. History, geology and microbiology. In: Chapelle FH (Ed.). *Ground water microbiology and geochemistry*. New York: J Wiley and Sons; 2001. p. 3-31.
2. Chapelle FH. Microorganisms present in the ground-water environment. In: Chapelle FH (Ed.). *Ground water microbiology and geochemistry*. New York: J Wiley and Sons; 2001. p. 32-57.
3. Balkwill DL, Ghiorse WC. Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Appl Environm Microbiol* 1985;50:580-8.
4. Chapelle FH, Morris JT, McMahan PB, Zelibor JL. Bacterial metabolism and the del-13C composition of ground water, Floridian aquifer, South Carolina. *Geology* 1988;16:117-21.
5. Balkwill DL, Boone DR. Identity and diversity of microorganisms cultured from subsurface environments. In: Amy PS, Haldeman DL (Ed.). *The microbiology of the terrestrial deep subsurface*. Boca Raton: CRC Lewis; 1997. p. 58-97.
6. Jones RE, Beeman RE, Suflita JM. Anaerobic metabolic processes in deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiol J* 1989;7:117-30.
7. Chapelle FH. Microbial ecology and ground-water systems. In: Chapelle FH (Ed.). *Ground water microbiology and geochemistry*. New York: J Wiley and Sons; 2001. p. 150-185).
8. Gerba CP, Bitton G. Microbial pollution: the survival and transport pattern to ground water. In: Gerba CP, Bitton G (Ed.). *Grounwater pollution microbiology*. New York: Wiley; 1984. p. 45-57.
9. Zyman J, Sorber CA. Influence of simulated rainfall on the treatment and survival of selected indicator organisms in sludge-amended soils. *J Water Poll Contr Fed* 1988; 60: 2105-10.
10. Bitton G. *Wastewater microbiology*. New York: Wiley-Liss; 1994.
11. Sobsey MD, Dean MD, Knuckles CW, Wagner ME. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl Environm Microbiol* 1980;40:92-101.
12. Jansons J, Edmonds LW, Speight B, Bucens MR. Survival of viruses in groundwater. *Water Res* 1989;23: 301-6.

13. De Walle FB, Hatlen J. Well water quality deterioration in Central Pierce County, Washington. *J Am Wat. Wks Assoc* 1989;72:533-43.
14. Volterra L. L'inquinamento microbiologico delle acque di falda. In: Volterra L, Aulicino FA (Ed.). *Acque di falda: stato dell'arte delle conoscenze in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 99/32).
15. Leach FR. Biochemical indicators of groundwater pollution. In: Bitton G, Gerba CP (Ed.). *Ground water pollution microbiology*. New York: J Wiley and Sons; 1984. p. 303-52.
16. Alhajar BJ, Stramer SL, Cliver DO, Harkin JM. Transport modelling of biological tracers from septic system. *Water Res* 1988;22:907-15.
17. Surveillance of waterborne disease outbreak-United States, 1999-2000. *MMWR Surveillance summaries* 2002;51(SS-08):1-28.
18. Surveillance of waterborne disease outbreak-United States, 1991-1992. *MMWR Surveillance summaries* 1993;42(SS-05):1-22.
19. Surveillance of waterborne disease outbreak-United States, 1993-1994. *MMWR Surveillance summaries* 1996;45(SS-1):1-33.
20. Surveillance of waterborne disease outbreak-United States, 1995-1996. *MMWR Surveillance summaries* 1998;47(SS-5):1-34.
21. Surveillance of waterborne disease outbreak-United States, 1997-1998. *MMWR Surveillance summaries* 2000;49(SS04):1-35.
22. McKay LD. Hydrogeology and groundwater contamination. In: Pillai SD (Ed.) *Microbial pathogens within aquifers principles and protocols*. Berlin: Springer;1998. p 1-24.
23. Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell JrHD, Geldreich EE, Payne BJ, Meyer Jr A, Wells JG, Greene KD, Bright M, Bean NH, Blake PA. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death. *Ann Intern Med* 1992;117:812-20.
24. Payment P, Hunter PR. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO; 2001. p. 61-8.

# PROBLEMATICHE CONCERNENTI LE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

Laura Volterra, Francesca Anna Aulicino

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

## Introduzione

Già Roster nel 1893 dichiarava che per giudicare la potabilità di un'acqua si deve tener di mira tanto il suo valore come alimento, destinato ad elevare il grado di salute; quanto la possibilità che diventi causa o mezzo di trasmissione di malattia (1, 2).

L'acqua potabile deve essere innocua e gradevole, non deve determinare rischi sanitari imputabili a sostanze chimiche, deve essere povera di germi e priva di agenti patogeni. Le sue qualità estetiche devono stimolare il consumo, deve essere incolore, limpida, fresca, inodore e di buon sapore. Il contenuto di sostanze solubili deve mantenersi entro certi limiti per non provocare corrosione. Dovrebbe, inoltre essere in quantità sufficiente e con adeguata pressione. L'acqua "potabile" non serve solo per bere, ma anche per lavaggio e cottura dei cibi, per la pulizia personale, per quella degli indumenti e della casa e per altre attività primarie, secondarie e terziarie. Tutto ciò porta ad un fabbisogno complessivo ripartito *pro capite* di 70-400 e più L/giorno (3, 4).

Attualmente, al crescere del fabbisogno, funzione dello standard di vita di una società, le risorse idriche sfruttabili non aumentano. Rimangono, al più, quantitativamente eguali, ma tendono a peggiorare qualitativamente.

L'acqua potabile può derivare da superficie o da profondità. Quest'ultima, pur essendo assimilabile ad una risorsa mineraria, è, al pari dell'acqua di superficie, rinnovabile. In funzione dell'uso del territorio, del recapito di reflui in corpi idrici (per la loro diluizione e il loro rapido allontanamento), della esistenza di un reticolo idrico e di ecotoni di transizione tra zone sature e insature, la qualità di un'acqua anche profonda è soggetta a inquinamenti microbiologici o a contaminazioni chimiche, nel caso di contatto, rispettivamente con reflui domestici e con reflui industriali. Con riferimento alla salute dei consumatori, nella prima evenienza si determinano effetti a breve termine (epidemie idrodifuse ad agente patogeno manifesto), nella seconda si possono produrre eventi cronici manifestabili con anni di ritardo, a seguito di procrastinate esposizioni e variabili anche in relazione alla "sensibilità" dei soggetti esposti. Per questi motivi l'acqua, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), deve essere di eccellente qualità e non deve dare effetto lesivo per la salute dell'uomo che la usi per l'intera durata della sua vita. Per questi motivi ogni normativa elenca parametri intesi a caratterizzarla, in particolare, CMA (Concentrazioni Massime Ammissibili) volte a scongiurare effetti rischiosi o indesiderabili per la salute e per gli usi, VG (Valori Guida) volti a migliorarne la qualità. Se, però, ipoteticamente si disponesse di acque di qualità superiore ai limiti indicati dai VG è chiaro che non bisognerebbe abbassare questa ai valori indicati. Anzi occorrerebbe tendere sempre ad aver la migliore e la più salubre acqua possibile.

## Acqua: veicolo di patogeni e malattie trasmissibili

Già Koch e Snow avanzarono l'ipotesi che l'acqua può divenire veicolo di patogeni e definirono le epidemie da essi causate "idrodiffuse" (5). Era l'epoca in cui colera e tifo mietevano periodicamente molte vittime.

Le normative, fiorite in quegli anni e modificate nei successivi, hanno mirato a contenere l'inquinamento fecale, misurato attraverso standard che tenevano conto di indicatori di inquinamento fecale (coliformi totali e fecali, streptococchi fecali, colifagi) e di patogeni enterici (enterobatteri patogeni, pensando principalmente a *Salmonella ed* enterovirus).

Si può dire che questo approccio microbiologico previsto dalle normative attualmente è, nei paesi più sviluppati, carente e superato. Studi eseguiti in USA dal CDC e dall'EPA dimostrano che l'accordo con questi limiti non basta a scongiurare il pericolo di epidemie idrotrasmissibili (6-8). Queste ultime nei paesi industrializzati, sono dovute ad enterobatteri patogeni, *Shigella* più che *Salmonella*, e ad altri patogeni emergenti come ceppi di *Escherichia coli* enterotossigeni. È solo dagli anni '80 che è stato riconosciuto un ceppo di *Escherichia coli* O157:H7 produttore di due potenti tossine (9). In USA esso è stato certamente responsabile di 2 epidemie: una avvenuta in una comunità del Missouri con 243 casi e associata all'acqua potabile (10), l'altra, con 80 soggetti colpiti, legata alla qualità dell'acqua balneare di un lago dell'Oregon nel 1991 (11). La sopravvivenza di questo stipite di *E. coli* sembra essere molto prolungata in acqua a bassa temperatura (5 °C).

Avanzano anche forme antropozoonotiche batteriche (*Campylobacter*) e protozoarie (*Giardia*, *Cryptosporidium*) e malattie virali causate da esponenti della più estesa famiglia dei virus enterici (Rotavirus, Norwalk Virus, Small Round Virus, ecc), rispetto a quella degli enterovirus (12).

*Helicobacter pilori*, prima detto *Campylobacter pilori*, si associa a ulcere gastro-duodenali con dolori addominali. *Campylobacter* (*jejuni*, *lari*, spp.) fu riconosciuto responsabile di enteriti solo nel 1977. Le enteriti da *Campylobacter/Helicobacter*, attualmente in UK, sono addirittura più numerose di quelle imputabili a *Salmonella*. La circolazione di questo microrganismo è aumentata con la politica di salvaguardia della vita selvatica, in particolare avicola. Una volta diffuso nell'ambiente e presente nelle acque potabilizzate, questo germe microaerofilo trova nel biofilm di rivestimento di tubazione un luogo possibile di sopravvivenza (13).

NorwalkVirus (NV) e SRV (Small Round Virus) sono stati associati in USA, Svezia e Canada a gastroenteriti epidemiche legate all'uso di acqua da bere, ma anche al consumo di ghiaccio, di vari generi alimentari, di molluschi eduli lamellibranchi, oltre che al contatto con acqua per uso ricreativo e alla contaminazione ambientale. Il NV e i simil-NV includono Snow Mountain Agent, Hawaii Agent, e Tauton Agent. I dati di sieroprevalenza indicano che infezioni epidemiche ed endemiche debbono essere comuni. In USA il 50-70% della popolazione adulta ha anticorpi anti NV; in Inghilterra il 48% dei bambini tra 12 e 23 mesi e fino al 90% della popolazione da 50 anni in su. Più diffusi tra i paesi in via di sviluppo i Rotavirus e i virus dell'Epatite E (HEV). Un Rotavirus B, che ha causato un'epidemia in Cina nel 1984, a differenza dei Rotavirus del gruppo A, colpisce prevalentemente gli adulti: La sieroprevalenza in Paesi come USA e Canada si aggira sul 10% (14). HEV colpisce in prevalenza gli adulti da 15 a 40 anni e mostra un'elevata virulenza tra le donne incinte (>30%). Epidemie si sono avute nei paesi in via di sviluppo dell'Africa, Asia, India, Messico.

Gastroenteriti di origine idrica ad andamento epidemico possono essere imputabili a "nuovi agenti patogeni virali". Ad esempio, gastroenteriti acute principalmente diffuse tra i bambini sono causate da Astrovirus e Calicivirus. Patologie enteriche sono prodotte da Adenovirus enterici sierotipo 40 e 41, Coronavirus e altri virus a RNA con membrana di rivestimento esterno pleomorfa. Responsabili di forme diarroiche sono Torovirus e Picobirnavirus

riconosciuti nelle feci di bambini, in precedenza ritenuti patogeni a esclusiva diffusione animale. Pestivirus della famiglia dei Flaviviridae sono stati identificati in tamponi rettali di bambini con diarrea tra gli indiani di Arizona.

Non mancano nuovi patogeni anche tra i protozoi. È il caso di *Cyclospora cayetanensis*, identificato come tale solo nel 1993 (prima era ritenuto un cianobatterio). Studi in Nepal e in Perù dimostrano che ha un andamento stagionale con picchi nei mesi estivi. In USA un'epidemia si è verificata nella estate 1991 tra il personale di un ospedale di Chicago, essendo diffuso all'interno della struttura dai serbatoi colonizzati da questo "nuovo" protozoo patogeno (15). Altri protozoi patogeni emergenti appartengono a 5 generi: *Nosema*, *Encephalitozoon*, *Isospora*, *Pleistophora*, *Enterocytozoon*, *Septata*.

L'acqua può diffondere tossine prodotte da microalghe (cianobatteri), patologie dovute a germi tipicamente ambientali che possono esplicare la loro pericolosità su soggetti a rischio. Ad esempio, Micobatteri non tubercolari ambientali possono causare malattie in individui immunodepressi. *Mycobacterium avium*, *M.kansasii*, *M.xenopi* sono stati isolati da acqua domestiche e ospedaliere. Altri gruppi batterici possono acquisire la potenzialità di produrre enterotossine (ad esempio *Aeromonas hydrophila*).

Molte epidemie idrotrasmesse si manifestano come generiche gastroenteriti di cui non si riesce ad identificare la eziologia. Nel sistema di sorveglianza delle epidemie di origine idrica negli Stati Uniti sono definite AGI (*Acute Gastrointestinal Illness of unknown etiology*) e rappresentano una quota cospicua degli eventi epidemici associati all'uso dell'acqua potabile (14, 16). L'esistenza di una frazione consistente delle malattie idrodiffuse le cui cause (agenti patogeni) sono ignote dipende dall'unicità della risposta generica del corpo umano a insulti di più tipi, biologici o chimici, dall'emersione di molti patogeni occasionali, ma soprattutto dalla difficoltà di distinguere chiaramente un'epidemia a diffusione idrica da altri tipi di diffusione essendo il contagio interumano prevalente una volta che si è instaurato il primo caso. Anche le limitazioni metodologiche hanno il loro peso. Per molti virus, possibilmente patogeni per l'apparato gastroenterico, non esistono metodi di rilevamento dall'acqua. Anche i metodi di arricchimento e selezione dei batteri possono sottostimare fino 100-1.000 volte il titolo effettivo presente in un campione. L'isolamento batterico è reso difficile dalle condizioni di devitalizzazione, dalla competizione con la flora microbica concorrente e dalle specifiche richieste nutrizionale dei patogeni, a volte non sufficientemente soddisfatte dai terreni colturali. Infatti la persistenza dei batteri enterici in ambiente acquatico dipende dalla specie e dalla varietà dei fattori ambientali (temperatura, pH, radiazione solare, predazione o competizione con i microrganismi acquatici indigeni, sostanza organica disciolta, particolato, associazione a vettori come amebe, protozoi o copepodi, presenza di sali e altri soluti). Inoltre certi batteri enterici, prima di perdere definitivamente tutte le funzioni vitali, possono entrare in uno stato di dormienza che ne fa permanere la virulenza, ma ne inibisce le capacità riproduttive su substrati artificiali (17-20).

## Acqua da bere e acqua per altri usi

L'acqua "destinata al consumo umano" ha lo scopo di sopperire alla necessità vitale di mantenere la omeostasi biologica, ma serve anche a predisporre alimenti da consumarsi crudi o cotti, serve anche a lavare e a lavarsi. Deve, pertanto rispondere a criteri sanitari più estesi di quelli legati alla possibile ingestione, con essa, di organismi pericolosi o di componenti tossiche. Deve possedere quindi anche caratteristiche fisiche, fisico-chimiche e chimiche tali da potere consentire tutti i possibili usi oltre a quello potabile.

Il dover riscontrare la presenza/assenza di germi enterici diffondibili per ingestione è conseguenza della priorità data alla componente igienico-microbiologica in relazione alla possibilità che l'acqua possa essere veicolo diretto di patogeni. È, pertanto, perseguito l'obiettivo di assicurare l'assenza di patogeni nel quantitativo fisiologicamente ingerito giornalmente da ciascun individuo. Nel caso di utilizzo per la preparazione di alimenti, è, invece, perseguito l'obiettivo di contenere il numero dei microrganismi in considerazione del fatto che i pochi patogeni inizialmente presenti sulle materie prime utilizzate come alimenti o all'interno di composti, che con esse siano preparati, possono indirettamente giungere alla dose infettante attraverso la moltiplicazione dei pochi presenti. Ma se l'acqua, proprio per gli altri usi cui può essere destinata, deve rispondere a criteri sanitari più estesi di quelli legati alla ingestione di patogeni, allora l'attenzione deve essere allargata a forme ambientali occasionalmente patogene che possono generare la patogenicità sull'uomo per contatto e per inalazione oltre che per ingestione.

## Opportunisti patogeni

Nel gruppo delle forme ambientali occasionalmente patogene rientrano *Legionella*, varie specie di *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Pseudomonas*. Tra essi, *Aeromonas* e *Legionella* possono essere considerati indicatori di stato trofico di un'acqua.

*Legionella pneumophila*, patogeno emergente causa di affezioni respiratorie soprattutto a carico di individui ospedalizzati, è da valutare con attenzione considerata anche la sua tipica modalità di propagazione attraverso aerosol. L'acqua costituisce la maggiore riserva di legionelle ed è l'ambiente dove questi microrganismi, probabilmente, sono presenti da lungo tempo. Lo sviluppo di sistemi di tecnologia industriale ha creato le condizioni per una trasmissione efficace di legionelle nell'ambito della popolazione. Temperature di 25-50 °C, ristagni dell'acqua, biofilm ricchi di incrostazioni calcaree favoriscono la proliferazione di legionelle in condotte, serbatoi, impianti di condizionamento, torri di raffreddamento dell'acqua. Di conseguenza questi batteri possono risultare frequentemente presenti in docce, rubinetti, apparecchi per terapie respiratorie, umidificatori dell'aria, ecc. *Legionella* può essere trasportata anche all'interno di protozoi e alghe; nulla vieta che viaggi adeso a particolato biotico, abiotico e a forme metazoiche. La legionellosi è inserita nell'elenco delle malattie infettive e diffusive previsto dal relativo Decreto del Ministero della salute (21).

Le aeromonadi, organismi idrofili, sono stimolate a replicarsi in ambienti organicamente contaminati e quindi in acqua di scarichi domestici e industriali. Nella Tabella 1 sono riportate le quantità di *Aeromonas* mesofili rilevati in diversi comparti idrici (22).

**Tabella 1. Quantità di *Aeromonas* mesofili in diversi tipi di acque (18)**

Tipo di acqua	Numero di <i>Aeromonas</i> (UFC)/100 mL
Liquame grezzo	$10^7$ - $>10^9$
Liquame trattato	$10^3$ - $10^8$
Acqua superficiale	$10^4$ - $10^6$
Acqua sotterranea	$1$ - $10^2$
Acqua trattata dopo clorazione	$1$ - $10$
Acqua clorata in rete	$1$ - $10^2$

Alcuni autori ipotizzano l'esistenza di una relazione tra casi di diarree con rilevamento di *Aeromonas* nelle feci dei malati e numero di *Aeromonas* nelle acque potabili. L'Olanda, con un

approccio precauzionale, ha stabilito per *Aeromonas* un VG di <20 UFC/100 mL, come valore medio di un anno per acque che lasciano l'impianto di potabilizzazione e di <200 UFC/100 mL per le acque al rubinetto, senza però specificare se questo numero si deve riferire alle forme enterotossiche, le quali sole sono pericolose per la salute umana (22).

Due sono i fattori che favoriscono la presenza di *Aeromonas* nelle acque potabili: la scarsa efficienza dei trattamenti di potabilizzazione nella rimozione di questi microrganismi e, addirittura, il loro aumento a seguito dei processi di filtrazione che prevedono l'utilizzo di filtri a sabbia e di filtri con carbone attivo, sui quali questi microrganismi aderiscono e si replicano. Inoltre *Aeromonas* possono replicarsi anche in biofilm adesi a tubature convoglianti acqua potabile (22).

## Alghe

Le alghe, espressione del livello nutrizionale di un'acqua di superficie e di quello saprobio dell'acqua di rete, sono sempre "indesiderabili", perché imprimono caratteri organolettici peculiari dell'acqua, riducendone la trasparenza e arricchendo il mezzo idrico di sostanza organica, ma, a volte, sono anche rischiose per la salute poiché produttrici di tossine. Nel primo gruppo sono comprese alghe verdi (*Chlorella*, *Pediastrum*, *Spirogyra*), diatomee (*Asterionella*, *Cyclotella*, *Fragillaria*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Synedra*, *Tabellaria*, *Tribonema*) e flagellate (*Chlamydomonas*, *Euglena*, *Synura*). Al secondo si ascrivono solo le cianofitiche che possono produrre epatotossine, neurotossine ed endotossine.

Almeno 25 specie di cianofitiche possono avere effetti negativi per la salute dell'uomo e/o degli animali. Le specie, in questione appartengono ai generi *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria*.

Fioriture tossiche si verificano in tutto il mondo, compresa l'Italia e sono legate all'aumento trofico delle acque. Nel nostro Paese sono state riscontrate *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, certamente produttrici di epatotossine.

Gli effetti dell'intossicazione acuta per l'uomo includono gastroenteriti, danni al fegato, al sistema nervoso, irritazioni da contatto sulla pelle e gli occhi. Esposizioni ripetute anche a basse concentrazioni possono dar luogo a fenomeni di tossicità cronica e ritardate nel tempo che includono, in certi casi, effetti mutageni, cancerogeni, teratogeni. Un monitoraggio in UK ha messo in rilievo che in questo Paese il 75% delle fioriture di cianofitiche è ascrivibile a specie tossiche. Il rischio è quello di una tossicità prevalentemente cronica, perché l'acqua bevuta, essendo trattata, è comunque alleggerita del materiale flottante che si accumula galleggiando sulle riserve idriche scoperte e al quale si riferiscono conclamati casi di avvelenamento di bestiame, che, quando si abbevera, assume ingenti quantitativi di alghe.

Le alghe tossiche o indesiderabili producono, comunque, escreti che, reagendo con il cloro, costituiscono una sorgente di produzione di THM (Trihalometani) e di organoalogenati.

## Microrganismi indesiderabili

Sono definiti indesiderabili quei microrganismi che, pur non essendo necessariamente patogeni, sono in grado di fare scendere il gradimento di un'acqua.

Tra essi sono annoverati gli actinomiceti, batteri Gram positivi, che morfologicamente sono filamenti sottili e ramificati (ad eccezione del genere *Actinomices*), simili a quelli caratteristici dei funghi, ma con ife più sottili (0,5-1  $\mu$ m di diametro). Si tratta di forme transienti nell'ambiente idrico che hanno una larga diffusione nel terreno (Tabella 2).

**Tabella 2. Quantità di attinomiceti rilevate in matrici diverse e generi isolati dalle acque potabili**

Habitat	Quantità
Suolo	$10^6$ - $10^8$ /g
Acque superficiali	$0$ - $10^7$ /100 mL
Acque potabili	$0$ - $10^3$ /100 mL

È stato verificato che gli attinomiceti possono aumentare nel corso dei processi di potabilizzazione, in particolare durante i trattamenti di filtrazione con filtri a sabbia, sui quali questi microrganismi aderiscono e si replicano (23). *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* sono i generi di attinomiceti rilevati nelle acque potabili. Essi possono replicarsi in biofilm adesi a tubature convoglianti acqua potabile e concorrere al processo di usura di giunti e parti costruite con polimeri naturali e prodotti di sintesi oltre a conferire all'acqua odori e sapori sgradevoli per la produzione di sostanze organiche (geosmina e 2-metilsorboneolo) percettibili anche a basse concentrazioni.

Tra gli indesiderabili sono annoverati i funghi e i lieviti di diversi generi dei quali è stata segnalata la presenza in reti acquedottistiche (Tabella 3).

**Tabella 3. Generi di funghi e lieviti isolati da acque potabili**

Gruppo	Genere (specie)
<b>Funghi</b>	<i>Alternaria</i>
	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. janus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terricola</i> , <i>A. versicolor</i> )
	<i>Aureobasidium</i>
	<i>Cephalosporidium</i>
	<i>Cladosporium</i>
	<i>Epicoccum</i>
	<i>Fusarium</i>
	<i>Geotrichum</i>
	<i>Nectria</i>
	<i>Nigrospora</i>
	<i>Penicillium</i>
	( <i>Petriellidium boydii</i> )
	<i>Peyronella</i>
	<i>Phaeococcus</i>
	<i>Phialophora</i>
	<i>Pithomyces</i>
	<i>Phoma</i>
<i>Trichoderma</i>	
<i>Verticillium</i>	
<b>Lieviti</b>	<i>Cryptococcus</i>
	<i>Rhodotorula</i>
	<i>Sporobolomyces</i>
	<i>Candida parapsilosis</i>

I titoli di questi microrganismi nelle acque potabili variano da  $10^0$  a  $10^2$  UFC/100 mL (sono riportati anche valori di  $10^3$ /mL per *Candida*), mentre nelle fanghiglie che si formano all'interno delle condutture giungono a  $10^4$ - $10^5$  UFC/100 mL (9, 23). Funghi e lieviti possono fare scadere le caratteristiche organolettiche di un'acqua, producono sostanze umiche, che agiscono come precursori di THM, possono indurre allergie e reazioni tossiche e sono responsabili

dell'aumentata richiesta di cloro, anche perché proteggono eventuali patogeni dall'azione dei biocidi.

Tra gli indesiderabili più noti delle reti idriche potabili vi è *Pseudomonas*, genere talmente diffuso ovunque da far parte della flora di acquiferi anche protetti. L'estrema diffusione nell'ambiente fa sì che il rilevamento nell'acqua non necessariamente debba essere considerato indice di contaminazione. *Pseudomonas* ha grande capacità di ricrescita in rete (è tra i primi colonizzatori di reti idriche) ed è resistente alla clorazione grazie alla produzione di SPE (Sostanze Polimeriche Extracellulari). Sono state isolate da acque potabili varie specie: *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps.fluorescens*, *Ps.alcaligenes*, *Ps.mendocina*, *Ps.putida*, *Ps.cepacia*, *Ps. malthophila*, *Ps.flava*, *Ps.vesicularis*, *Ps.palleroni*.

La sua naturale presenza nell'ambiente pone dei grossi problemi di salute poiché *Pseudomonas* può essere un opportunisto patogeno. A questo genere tipicamente ambientale appartengono infatti specie con stipiti occasionalmente patogeni. La patogenicità si estrinseca per ingestione (forme gastrointestinali rilevabili in neonati) ma soprattutto per contatto (infezioni di ferite o patologie degli epiteli). Sono riportate epidemie associate all'utilizzo di acque potabili con presenza di *Pseudomonas aeruginosa* (9).

Lo stato saprobio effettivo è segnalato da protozoi a vita libera: amebe, flagellati, *Paramecium*, *Vorticella convallaria*, *Aspidisca cicada*, *Chilodonella uncinata*, *Trachelophyllum pusillum*, ecc. Tra i protozoi a vita libera alcuni possono costituire un rischio sanitario come *Naegleria fowleri* (che ha indotto casi di meningoencefalite primaria) e *Acanthamoeba* (responsabile di meningiti amebiche, e infezioni polmonari). La loro pericolosità è però espletata per contatto.

Nella parte alta della piramide evolutiva si possono trovare in rete: rotiferi, poriferi, briozoi (*Plumatella*), idracarini, vermi: [*Nais*, nematodi, (*Aphalemohoides*, *Cephalobus*, *Diplogaster*, *Ditylenchus*, *Endorylaimus*, *Ironus*, *Monhystera*, *Mononchus*, *Tobrilus*, *Trypyla*, ecc.), gordiacei], insetti (larve di *Chironomus* e *Culex*), molluschi gasteropodi e lamellibranchi (*Dreissenia polymorpha*), crostacei (*Gammarus pulex*, *Crangonyx pseudogracilis*, *Cyclops*, *Chydorus sphaericus*, *Asellus aquaticus*).

Gli animali macroscopici presenti in rete pongono prima di tutto un problema estetico: indicano che la condotta non è mantenuta costantemente in pressione e non è ben pulita. Il loro numero e la loro infestazione aumenta con il crescere delle temperature. Possono immettersi in rete a seguito del lavaggio dei filtri (larve di chironomidi), per contatti con l'ambiente esterni durante la manutenzione di reti e serbatoi, ma non si può escludere che, almeno alcuni di essi, facciano parte della fauna di acquiferi e sorgenti.

Ma un'acqua deve essere anche organoletticamente gradevole e non produrre situazioni indesiderabili in tubazioni, macchine e per usi umani diversi da quello potabile *sensu stricto*. Si pensi all'acqua usata per produrre alimenti o per lavare.

## Conclusioni

L'insieme dei parametri disposti dal Decreto n. 31 (24) mira a valutare lo stato della risorsa e la gestione di un impianto di potabilizzazione e di distribuzione. Non ha valore sanitario preventivo perché i risultati delle analisi non si hanno in tempo reale. L'ottemperanza agli standard di legge non comporta la garanzia di disporre della migliore acqua possibile, né la certezza dell'assenza di rischio: Solo il contenimento dell'inquinamento entro determinate soglie e la dimostrazione che gli impianti di potabilizzazione abbiano ben funzionato sono una garanzia rispetto alla salubrità delle acque.

Un'acqua potabile all'uscita di un impianto può trasformarsi nel suo trasporto in rete. Le acque condottate, di conseguenza, necessitano di clorocoperture contro le contaminazioni secondarie. Questi trattamenti chimici incidono sui caratteri organolettici di un'acqua conferendole, quanto meno, un odore di "cloro" che è sgradito alla popolazione che lo recepisce in genere come indizio di pericolo ricorrendo così sempre più all'uso di acqua minerali. Invece l'acqua potabile è controllata molto di più di quella minerale. Quest'ultima è controllata solo dal produttore, mentre l'altra è controllata dal SSN e dagli enti acquedottistici.

Tutte le acque destinate al consumo, in quanto alimento, devono rispondere ai protocolli di *Quality Assessment* (QA) delle norme ISO ed EN.

Le difficoltà che in microbiologia colpiscono la attendibilità del dato analitico sono particolari e diverse da quelle proprie ad altri settori del controllo. Anche in un campione di riferimento:

- Nessuno può conoscere con certezza il numero esatto di microrganismi in esso immesso, neanche il produttore.
- I microrganismi seguono distribuzioni discrete e non di tipo gaussiano.
- Una distribuzione poissoniana non descrive bene l'andamento di omogeneità/disomogeneità caratteristico dei microrganismi all'interno di un campione. Infatti i microrganismi tendono ad aderire e a coalescere, per cui sono, in qualsiasi campione naturale e artificiale, distribuiti disomogeneamente.
- La vitalità di ogni microrganismo presente in ogni campione naturale od artificiale decresce nel tempo ed è influenzata dai modi e dalle temperature di conservazione.
- Le pratiche e le strumentazioni di laboratorio, le tecniche di rilevamento, i substrati utilizzati, la manualità di ogni singolo operatore sono tutti aspetti che interferiscono sull'esito del risultato analitico e che dipendono solo in minima parte dal terreno usato per il rilevamento. Ciò è in contrasto al principio che la comunanza del terreno usato attesti la comparabilità e la veridicità del dato analitico.

La Tabella 4 riporta, a mo' di esempio, alcuni risultati di una serie di analisi di colimetria, eseguite in 10 laboratori o replicate in uno stesso laboratorio a partire da campioni simulati prodotti con uno stesso materiale di riferimento.

I dati esposti dimostrano come l'esito del risultato analitico sia mutevole da laboratorio a laboratorio, ma anche all'interno di una stessa struttura. Manualità e competenza dell'operatore, che esegue materialmente l'analisi, sono rilevanti per avvicinarsi al valore più probabile. Alcune imprecisioni, che possono rappresentare vizi costitutivi di ogni tecnico, sono evidenziabili con analisi ripetute, ma molto spesso gli errori si distribuiscono casualmente sommandosi alla casualità implicita nella distribuzione dei microrganismi all'interno del campione da analizzare. Se questo è vero per analisi storicamente consolidate, come colimetria, streptococcometria, carica microbica, per le quali esiste una standardizzazione di procedure, figurarsi quale potrebbe essere il risultato comparativo di analisi più critiche, quali quelle di patogeni, germi ambientali patogeni occasionali o emergenti o semplicemente di forme indesiderate.

Al di là, quindi, della doverosa attenzione che i cultori della materia debbono avere per la trasformazione del rischio sanitario connesso al deterioramento delle acque sfruttabili e sfruttate come potabili, la colimetria, con tutte le sue limitazioni, rimane l'attuale unica pietra miliare del controllo microbiologico. Il giudizio sulla qualità di un'acqua potabile dovrà basarsi quindi su una serie di analisi ispettive e di laboratorio che, integrandosi a vicenda, indicano la sua vulnerabilità.

**Tabella 4. Enumerazione di Coliformi totali su m Endo Les a 36 °C e di Coliformi fecali su mFC a 44 °C effettuata su campioni simulati ricostituiti con materiali di riferimento contenenti 60 UFC di *Escherichia coli* /100 mL**

Laboratorio	Coliformi totali	Coliformi fecali
1*	61	31
1*	31	14
1*	-	8
2	17	18
3	45	29
4	44	42
5	20	35
6	16	31
7*	22	25
7*	35	-
7*	33	-
8	47	15
9	16	3
10	40	221

\* I laboratori asteriscati sono quelli che hanno ripetuto l'analisi sullo stesso campione ricostituito

Alla fine dell'Ottocento Roster già aveva compreso le difficoltà insite nell'esame batteriologico, infatti, scriveva che (1, 2):

Nello studio dei microrganismi delle acque si debbono cercare e distinguere i batteri patogeni dai non patogeni, nonché le specie che esercitano una azione liquefacente sulla gelatina che indicano i batteri della putrefazione, che sebbene siano innocui nella massima parte, tuttavia fra essi trovano posto alcuni batteri patogeni. La difficoltà di mettere in evidenza i patogeni costituisce un serio appunto contro quelli che vedono nell'esame batterioscopico l'unico o il principale criterio per giudicare un'acqua. Se per i risultati positivi dell'esame batterioscopico si può dichiarare un'acqua sospetta o pericolosa non si può dedurre la conclusione opposta, cioè che l'acqua sia buona e da bersi senza paura quando l'esame riesca negativo.”

“La quantità di batteri esistenti in un'acqua è grandemente oscillante per molte cause, fra cui le principali sono: l'inquinamento primitivo e iniziale contratto nei terreni su cui si raccoglie l'acqua; la natura e la qualità del terreno sottostante che agisce da filtro; le contaminazioni successive ed eventuali che può subire l'acqua uscita dal terreno, durante il suo percorso fino al luogo di distribuzione; la proprietà che hanno i batteri di riprodursi e moltiplicarsi con straordinaria energia e rapidità. La presenza, l'assenza o l'intermittenza di alcune di queste cause, determinano fortissime e saltuarie oscillazioni nel numero di questi microrganismi, ed è appunto questa estrema mutabilità, che toglie gran parte del valore alla enumerazione dei batteri senza aver riguardo alla loro specificazione. Di qui le difficoltà e le incertezze e le contraddizioni dei vari autori nello stabilire il limite di tolleranza dei batteri e le differenze notevoli che si trovano nelle classificazioni delle acque, esprimenti il loro valore igienico in rapporto al numero dei batteri. Infatti secondo alcuni le buone acque sorgive dovrebbero contenere da 4 a 50 batteri/mL, mentre altri Autori ne tollerano 100 e più. Il piccolo numero dei batteri in un'acqua sta solo a dimostrare la efficacia della filtrazione naturale o artificiale. Vari limiti sono stati proposti in passato per la enumerazione dei batteri andando da decine a centinaia di batteri/mL. D'altra parte in pozzi ben costruiti ed ubicati la proporzione dei germi varia da un giorno all'altro e si sarebbe molto imbarazzati se si pretendesse di dichiarare un pozzo cattivo tutte le volte che l'acqua esaminata desse un numero di germi da 200 a 300 a 500, ecc. I batteri dell'acqua si moltiplicano spontaneamente nell'interno del pozzo, le pareti si caricano di batteri che si depositano in fondo e il semplice movimento un poco energico della aspirazione può fare sollevare piccoli vortici. Si è proposto di basare l'apprezzamento della bontà dell'acqua non sul numero dei batteri ma sul numero delle specie batteriche. Da notare che i pozzi contengono sempre questi organismi assai diffusi: *Bacillus fluorescens liquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus ramosus*, *Proteus vulgaris*...

In base a ciò Roster sosteneva l'importanza di eseguire controlli fisici e chimici accanto a quelli microbiologici, ma soprattutto introduceva l'opportunità di effettuare un rilievo microscopico:

– *Analisi fisica*

Una buona acqua potabile non deve mai essere al di sotto di 6 °C, né al di sopra di 16 °C, Una temperatura che oscilla fra gli 11 e i 12 °C è quella da preferirsi. Quando un'acqua si mantenga in tali condizioni, non solo riesce bevanda cercata e gradita, ed esercita benefica azione fisiologica sull'organismo, ma offre garanzie maggiori contro il facile sviluppo e la moltiplicazione dei microrganismi.

– *Analisi chimica*

Soprattutto valutazione dei gas, residuo solido, grado di durezza, cloro, anidride nitrica, materie organiche, ammoniacale, nitriti e altre sostanze estranee all'ordinaria composizione dell'acqua.

La *valutazione dei gas di un'acqua* serve non solo a dichiarare che è aerata in modo da riuscire bevanda utile e gradita, ma a giudicare con prova indiretta della presenza e della proporzione della materia organica. Quanto più un'acqua contiene materie organiche ed esseri organizzati tanto minore è la quantità dell'ossigeno, mentre l'azoto rimane immutato e cresce l'acido carbonico.

La *valutazione del residuo solido* non dovrebbe mai oltrepassare 500 mg/L, ma preferibilmente dovrebbe oscillare tra 150-250 mg/L.

La *valutazione del grado di durezza*. Un'acqua dura si presta male a certi usi e a certi scopi che stanno in relazione con l'igiene, come la cottura degli alimenti, la lavatura dei panni, e alcune operazioni industriali.

La *proporzione tra residuo fisso e grado di durezza totale* di un'acqua è indizio indiretto del grado di contatto con la superficie del suolo. Le acque dure sono tali non solo perché attraversano aree di ricarica calcaree, ma soprattutto perché il calcare si scioglie nell'acqua se in essa è presente anidride carbonica. Questo gas, che in piccola parte è presente nell'atmosfera, è prevalente nel suolo per l'ossidazione e la putrefazione delle sostanze organiche

La *valutazione del cloro, della materia organica, dell'anidride nitrosa e nitrica e dell'ammoniaca* rappresentano i prodotti del processo putrefattivo. L'eccesso di cloro, quando non si trovi altra causa, rappresenta una precedente contaminazione del suolo. L'ammoniaca, che è il prodotto della decomposizione delle materie organiche, passa per una successiva ossidazione allo stato di anidride nitrosa e nitrica. Tanto l'ammoniaca quanto l'anidride nitrosa che sta a rappresentare uno stato di evoluzione, devono essere escluse dalle acqua in un modo assoluto. L'anidride nitrica si può tollerare, ma in piccole parti, come ultimo atto del processo degradativo cui soggiacciono le sostanze organiche.

Per quanto riguarda l'esame microscopico, con esso si possono raggiungere dati molto precisi e interessanti. Si possono evidenziare avanzi e detriti di materie organiche, così come organismi animali e vegetali: uova e embrioni di certi entozoi (*Toenia solium*, *T. mediocanellata*, *Botriocephalus latus*, *Ascaris lumbricoides*, *Oxiurus vermicularis*, *Anchilistoma duodenalis*); uova e embrioni di ematozoi (*Distoma*, *Filaria*, *Haematobium*, *Bilharzia*, ecc.); animali microscopici appartenenti ai gruppi dei Rizopodi, degli Infusori, dei Rotiferi, dei Vermi e degli Artropodi; organismi vegetali, come Diatomee, *Dismidiaceae*, *Protococcaceae* e alghe; Muffe, e alcuni Blastomiceti.

## Bibliografia

1. Roster G. Dei criteri per giudicare la potabilità di un'acqua. *L'Ingegneria Sanitaria (Torino)* 1893;3:14-8.
2. Roster G. Dei criteri per giudicare la potabilità di un'acqua. *L'Ingegneria Sanitaria (Torino)* 1893;4:73-6.
3. Palmer SR. Epidemiology in search of infectious diseases: methods in outbreak investigation. *J Epidemiol Community Health* 1989;43:311-15.
4. Hennekens CH, Buring JE.. *Epidemiology in medicine*. Boston: Little, Brown; 1987.
5. Percival SL, Walzer JT, Hunter PR. Water supply, treatment and distribution. In: Vreeland RH (Ed.). *Microbiological aspects of biofilms and drinking water*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 1-14.
6. Craun GF, Berger PS, Calderon RL. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *J Am Water Works Ass* 1997;89(3):96-104.
7. Payment P, Richardson L, Siemiatycki J, Dewar R, Edwardes M, Franco E. A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to the consumption of drinking water meeting currently accepted microbiological standards. *Am J Publ Health* 1991;81:703-08.
8. Payment P, Siemiatycki J, Richardson L, Renaud G, Franco E, Prévost M. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effect due to the consumption of drinking. *Int J Environm Health Res* 1997;7:5-31.
9. Percival SL, Walzer JT, Hunter PR. Biofilm formation in potable water. In Vreeland RH (Ed.). *Microbiological aspects of biofilms and drinking water*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 85-154.
10. Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell JrHD, Geldreich EE, Payne BJ, Meyer Jr A, Wells JG, Greene KD, Bright M, Bean NH, Blake PA. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death. *Ann Intern Med* 1992;117:812-20.
11. Surveillance of waterborne disease outbreak - United States, 1991-1992. *MMWR Surveillance summaries* 1993;42(SS-05):1-22.
12. Andersson Y, Bohan P. Disease surveillance and waterborne outbreaks. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.) *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO; 2001. p. 115-35.
13. Park SR, Mackay WG, Reid DC. *Helicobacter* sp recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Wat Res* 2001;35(6):1624-6.
14. Payment P, Hunter PR. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.) *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO, 2001. p. 61-88.
15. Huang P. The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. *Ann Intern Med* 1995;123:409-14.
16. Surveillance of waterborne disease outbreak - United States, 1999-2000. *MMWR Surveillance summaries* 2002; 51(SS-08):1-28.
17. Byrd JJ, Hux H-S, Colwell RR. Viable notculturable bacteria in drinking water. *Appl Environm Microbiol* 1991;57(3):875-78.
18. Caro A, Got P, Lesne J, Binard S, Baleux B. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Appl Environm Microbiol* 1999;65(7):3229-32.
19. Rahman I, Shahamat M, Kirchman PA, Russek-Cohen E, Colwell RR. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but notculturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Appl Environm Microbiol* 1994;60(19):3573-8.

20. Rahman I, Shahamat M, Chowdhury MAR, Colwell RR. Potential virulence of viable but not culturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Appl Environm Microbiol* 1995;62(1):115-20.
21. Malara P. Vigilanza delle autorità centrali. In: Rota MC, Castellani Pastoris M (Ed.). *Convegno nazionale. Le infezioni da Legionella: aspetti microbiologici ed epidemiologici. Roma, 1-2 giugno 2000. Atti / Riassunti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Istisan Congressi 66). p. 17-20.
22. Moyer NP. Isolation and enumeration of aeromonads. In: Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph S. (Ed.). *The genus Aeromonas*. London: Wiley and Sons. 1996. p. 39-84.
23. Aulicino FA. La presenza ed il significato degli attinomiceti, funghi e lieviti nelle acque potabili. In: Pollicino G. (Ed.). *Acque potabili - I problemi microbiologici emergenti*. Bologna: Pitagora Editrice; 1995. p. 33-40.
24. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.

## PROTOCOLLO ANALITICO PER LO STUDIO MICROBIOLOGICO DI ACQUE DI FALDA

Laura Volterra, Francesca Anna Aulicino

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

### Premessa

Il 60% dell'approvvigionamento idropotabile italiano deriva da riserve sotterranee, ecosistemi molto poco noti sotto il profilo biologico e microbiologico ed estremamente fragili sotto il profilo sanitario, in diretta conseguenza di carenze gestionali a vari livelli, della vulnerabilità dei suoli, dell'uso improprio del territorio, di emunzioni eccessive e prolungate nel tempo. Le carenze igieniche si manifestano a volte con il rinvenimento di indicatori di inquinamento fecale, ma più spesso con la presenza di organismi che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce "fastidiosi" e "indesiderabili" e di cui si ignora la pericolosità (1). Alcuni di questi organismi (elementi figurati come protozoi, elminti, alghe, funghi) erano elencati tra i parametri del controllo di tipo C4 del DPR 236/88 e sono attualmente ancora considerati tra i controlli esterni che devono essere eseguiti ai sensi dell'art. 8 comma 3 della più recente normativa in tema di controllo delle acque destinate al consumo umano, il Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n 31. (2). Tra gli organismi "fastidiosi" e "indesiderabili" si possono includere:

- alte cariche batteriche mesofile e psicrofile,
- batteri come *Pseudomonas*, *Aeromonas*,
- protozoi e metazoi a vita libera,
- microrganismi correlati a fenomeni di ricrescite batteriche e biocorrosione e che concorrono alla produzione di fanghiglie pigmentate (3, 4).

I microrganismi "indesiderabili" possono essere definiti forme tipicamente ambientali, che, quando divengono numericamente ridondanti, generalmente costituiscono un problema gestionale e organolettico, che, in alcuni casi, può assumere rilievo di ordine igienico-sanitario. In natura essi si concentrano nel biofilm che può essere definito come una pellicola biologica di diversa consistenza e composizione, costituita da microrganismi coesistenti in consorzi "immersi" in materiale polimerico extracellulare, che funge da substrato protettivo e aggregante. Il biofilm si trova posto all'interfaccia acqua/suolo e varia in funzione del flusso, nell'acquifero, delle componenti chimiche (nutrienti e inquinanti) e delle conseguenti migrazioni/colonizzazioni delle componenti biologiche (microbiche, protozoarie e di macroinvertebrati) tra zone insatura e satura (5, 6). La forza di attrito esercitata dal flusso idrico lungo le pareti della bolla satura rappresentata dalla falda causa, infatti, il rilascio di frammenti, più o meno consistenti, di queste pellicole. Di conseguenza germi e altre presenze biologiche microscopiche raggiungono, in elevate concentrazioni anche se discontinuamente, il punto di scaturigine o di captazione e, conseguentemente, giungono fino alle tubazioni di presa e di trasporto dell'acqua. Nell'ambito delle reti idriche i microrganismi provenienti dalle acque di falda possono stabilizzarsi e dar luogo alla formazione di pellicole biologiche colonizzanti la superficie interna delle tubature.

Dal biofilm "naturale" (o "primario"), che si forma nell'ecotono di transizione che confina l'acqua nell'ambiente sotterraneo, si distingue il biofilm "artificiale" (o "secondario") che

colonizza le superfici interne, a contatto con l'acqua, di tubi, vasche, serbatoi, autoclavi. Questo secondo ha un'ampiezza di popolazione e una distribuzione di specie diversa da quello "naturale" e può costituire un rischio sanitario superiore perché in esso possono prevalere in modo sbilanciato forme potenzialmente patogene per l'uomo o che hanno, con il tempo, acquisito requisiti di virulenza.

In entrambi i biofilm sono presenti piramidi trofiche, in cui i batteri psicrotrofi ambientali costituiscono la base su cui proliferano germi mesofili, miceti, alghe facoltativamente eterotrofe, elementi biologici superiori (protozoi e metazoi). In più nel biofilm "artificiale", per effetto della selezione operata dai processi di potabilizzazione e delle possibili migrazioni di germi fecali dovute alla contaminazione dei suoli antropizzati dagli insedimamenti umani e dalla prossimità di condotte fognarie, si generano nicchie in cui batteri enterici indicatori e patogeni occasionali possono installarsi, sopravvivere e ricrescere.

La percezione della presenza/diffusione di forme "indesiderabili" o "fastidiose" in rete è sempre sottostimata, poiché è difficilmente evidenziabile ed enumerabile. In un'indagine condotta su acquedotti comunali italiani alimentati da acque profonde nell'80% dei campioni esaminati sono stati rinvenuti uno o più elementi figurati (microalghe facoltativamente eterotrofe, protozoi e piccoli metazoi) (7). Esperimenti condotti su campioni inseminati artificialmente con concentrati di elementi figurati hanno dimostrato come il metodo di analisi applicato nel monitoraggio sia poco sensibile (8). Quindi i risultati del saggio debbono considerarsi largamente sottostimanti la realtà.

Il fenomeno non è solo italiano. In acquedotti comunali della Gran Bretagna sono state individuate più di 150 specie di metazoi, con infestazioni dovute a crostacei, anfipodi, anellidi, celenterati, plattelminti, insetti, molluschi e nematodi (9). Segnalazioni delle infestazioni sono state fatte un po' in tutto il mondo.

Se oggi si discute sulla sensibilità di metodi analitici riconosciuti internazionalmente, come quelli indirizzati alla ricerca dei coliformi, a maggior ragione si può ritenere che metodiche meno standardizzate siano ancor meno veritiere. Rientrano in questa categoria i protocolli approntabili per la ricerca quali-quantitativa delle forme "indesiderabili" o "fastidiose", le quali non sempre sono coltivabili e la cui presenza nell'acqua è occasionale e dovuta all'accidentale abrasione dei biofilm.

Per studiare più a fondo il problema è necessaria la disponibilità di un protocollo operativo comune da applicare su tutta un'unità territoriale, in modo da ottenere una prima base di confrontabilità dei risultati che, se non altro, potrà fare apprezzare la dimensione quali-quantitativa del fenomeno. Alcuni organismi "indesiderabili" potrebbero assumere il ruolo di indicatori di qualità e di vulnerabilità delle acque di falda. Altri potrebbero dimostrarsi di grande interesse sanitario per la fascia più sensibile della popolazione in relazione all'acquisizione di pluriresistenze ad antibiotici, biocidi, metalli pesanti, capacità citotossiche ed emolitiche.

Qui di seguito si propone una serie di metodiche analitiche che costituisce una proposta di protocollo operativo per la ricerca di forme presenti nelle acque sotterranee e nei biofilm di acque destinate all'approvvigionamento idrico o, dopo potabilizzazione, devolute al consumo umano.

## **Analisi microbiologiche delle acque di falda**

I parametri microbiologici che sono stati selezionati per la caratterizzazione di acque di falda sono elencati nella Tabella 1.

**Tabella 1. Parametri microbiologici previsti dal protocollo analitico per la caratterizzazione di acque di falda**

Gruppo	Parametro
Indicatori di contaminazione fecale <i>coltivabili</i>	Coliformi <i>Escherichia coli</i> Enterococchi
<i>non coltivabili</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>
Conte batteriche su piastra	Germi psicrofili: emolitici streptomicina resistenti streptomicina sensibili non emolitici streptomicina resistenti streptomicina sensibili Germi mesofili: emolitici streptomicina resistenti streptomicina sensibili non emolitici streptomicina resistenti streptomicina sensibili
Conte batteriche al microscopio	
Attinomiceti	
<i>Pseudomonas</i>	
Lieviti e muffe	
Microrganismi filamentosi	
<i>Aeromonas</i>	
<i>Acinetobacter</i>	
Fagi di <i>Escherichia coli</i>	
Biofilm	
Protozoi	
Metazoi	

### Indicatori di contaminazione fecale coltivabili

Per i parametri di riferimento comuni, come gli indicatori di inquinamento fecale (coliformi totali e fecali, *Escherichia coli* ed enterococchi), che è bene ricercare per poter fare un confronto tra il fenomeno della fecalizzazione e quello dell'eccessivo sviluppo di biofilm, si consiglia l'impiego di metodi ufficiali o normati, ad esempio metodi ISO (10).

Nella Tabella 2 sono elencati i terreni colturali e le indicazioni essenziali sulle procedure da seguire. Non si descrivono nei dettagli le procedure delle diverse prove poiché si tratta di saggi descritti esaurientemente in normative e testi a larga diffusione (11-13).

Possono, comunque, essere utilizzati terreni di coltura diversi da quelli elencati.

**Tabella 2. Terreni di coltura, metodi, tempi e temperature di incubazione per il rilevamento degli indicatori di contaminazione fecale**

Parametro	Terreno	Metodo	Incubazione		Colonie da enumerare
			temperatura	tempi (in ore)	
Coliformi	m Endo agar Les	Membrane filtranti	36±1 °C	24 h	Colonie rosso scuro e/o metallizzate (11)
	Lactose TTC agar sodio eptadecilsolfato	Membrane filtranti	36±2 °C	21±3 h	Colonie che mostrano colore giallo nel terreno sotto la membrana e che sono ossidasi negative (12)
<i>E. coli</i>	Nutrient agar + MUG*	Membrane filtranti	36±1 °C	24 h per colonie cresciute su mEndo agar Les	Colonie che, osservate con lampada di Wood (350 nm), abbiano sviluppato sul retro della membrana fluorescenza
	Lactose TTC agar sodio eptadecilsolfato	Membrane filtranti	36±2 °C	21±3 h	Colonie che mostrano colore giallo nel terreno sotto la membrana e che sono ossidasi negative (12) e indolo positive
	TSA ** TBA	Membrane filtranti	36±1 °C → 44±0,5 °C →	4-5 h 19-20 h	Colonie rosse dopo 10-30' di permanenza su carta da filtro imbibita di reattivo per indolo (12)
Enterococchi	Slanetz-Bartley medium Bile aesculin azide agar	Membrane filtranti	36±1 °C	44±4 h	Colonie rosse, marroni o rosa*** (13)

\* Su questo terreno vanno trasferite le membrane provenienti da mEndo agar Les e sulle quali sono presenti colonie presuntive di coliformi.

\*\* Su questo terreno deve essere posta la membrana filtrante (attraverso la quale sono stati filtrati 100 mL di campione) e vi deve essere mantenuta a 36±1 °C per 4-5 ore. Successivamente la membrana deve essere trasferita su TBA e incubata per 19-20 ore a 44±0,5 °C.

\*\*\* Le colonie rosse sviluppatesi su Slanetz Bartley medium vanno sottoposte a test di conferma collocando le membrane, su cui si sono sviluppate, su piastre contenenti su Bile aesculine azide agar, incubando a 44±0,5 °C per 2 ore. Enumerare come enterococchi quelle colonie che sul retro delle membrane evidenziano un alone nero.

### **Indicatori di contaminazione fecale non coltivabili: *Enterococcus faecalis* ed *Escherichia coli***

Devono essere sottoposti a caratterizzazione molecolare in relazione alla presenza di *Enterococcus faecalis* ed *Escherichia coli* campioni di acque di falda caratterizzati da contaminazioni di tipo fecale costanti o intermittenti. Per quanto riguarda il metodo da seguire si rimanda alla bibliografia (14).

## **Conte batteriche su piastra (isolamento di germi emolitici/non emolitici, antibiotico-sensibili/resistenti)**

### **Materiali**

- Agar sangue.
- Antibiotic Medium n. 2 (Oxoid) o altro terreno idoneo distribuito in capsule Petri.
- Streptomicina.
- Membrane filtranti per microbiologia di 0,45 µm di porosità.

Come marcatore dell'antibiotico-resistenza è stata scelta la streptomicina per la larga diffusione che ha avuto in passato.

### **Preparazione dei materiali**

Preparare il terreno (Antibiotic Medium n. 2 o altro terreno) secondo le indicazioni della ditta produttrice e, successivamente, portarlo a 45 °C, quindi aggiungere streptomicina in quantità tale che la concentrazione sia pari a 0,1 e 1 mg /20 mL (20 mL è la quantità di terreno normalmente occorrente per la preparazione di una capsula Petri). Distribuire il terreno in piastre, che vanno lasciate asciugare bene. Le piastre così preparate possono essere conservate alla temperatura di 4 °C per circa una settimana.

### **Procedimento analitico**

1. Filtrare 2 aliquote di 1 e 10 mL di campione di acqua attraverso membrane filtranti, che vanno poste su piastre di Agar Sangue. Incubare una piastra a 22±1 °C per 5-7 giorni per la ricerca di germi psicrofili e un'altra a 30 °C per 3 giorni per la ricerca di germi mesofili.
2. Enumerare le colonie eventualmente sviluppatasi già dopo 24 ore. A fine incubazione verificare sul retro delle membrane la presenza di emolisi.
3. Enumerare le colonie nell'ambito delle categorie seguenti:
  - Psicrofili emolitici
  - Psicrofili non emolitici
  - Mesofili emolitici
  - Mesofili non emolitici.
4. Trasferire le membrane dalle piastre di Agar Sangue su piastre di terreno contenente streptomicina. Con un ago, di volta in volta sterilizzato, forare la membrana al centro di ogni colonia, in modo da trasferire parte della colonia (sviluppatasi sulla membrana) sulla superficie dell'agar contenente l'antibiotico. Tale operazione consentirà anche di risalire all'orientamento della membrana per eseguire eventuali sottoisolamenti. Incubare per 24-48 ore alle temperature di provenienza di ciascuna membrana dalle piastre di Agar Sangue.
5. Verificare la crescita (antibiotico-resistenza) o l'assenza di crescita.
6. Enumerare le colonie streptomicina resistenti alle due concentrazioni usate distinguendo le colonie in:
  - Psicrofili emolitici streptomicina resistenti
  - Psicrofili emolitici streptomicina sensibili
  - Psicrofili non emolitici streptomicina resistenti
  - Psicrofili non emolitici streptomicina sensibili
  - Mesofili emolitici streptomicina resistenti
  - Mesofili emolitici streptomicina sensibili
  - Mesofili non emolitici streptomicina resistenti
  - Mesofili non emolitici streptomicina sensibili.

7. Calcolare la percentuale delle colonie streptomicina resistenti sul totale enumerato su Agar Sangue. Sottoisolare per ulteriori accertamenti le colonie streptomicina resistenti ed emolitiche.

## Conte batteriche al microscopio

Le conte batteriche al microscopio vanno effettuate per verificare la presenza di forme non coltivabili o scarsamente coltivabili che sono la quota prevalente nell'ambiente estremo e particolare quale è quello dell'acqua di falda.

### Materiali

- Tampone fosfato:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13,6g), acqua distillata 1 L).
- Fissativo: glutaraldeide (5 g), tampone fosfato (100 mL).
- Colorante: soluzione di arancio di acridina (1 g), tampone fosfato (100 mL).
- Olio da immersione a bassa fluorescenza.
- Vetreria monouso o in vetro sterilizzato al calore secco.
- Membrane a pori cilindrici da 0,22  $\mu\text{m}$ , preferibilmente in policarbonato.

### Preparazione dei materiali

- Tampone fosfato: sciogliere 13,6 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 L di acqua distillata. Portare il pH a 7,2 e filtrare su MF con pori da 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Fissativo: sciogliere 5 g di glutaraldeide in 100 mL di tampone fosfato. La soluzione di fissativo va preparata giornalmente.
- Colorante: Preparare una soluzione di arancio di acridina 1% (p/v) in tampone fosfato

### Procedimento analitico

1. Fissare preventivamente il campione in glutaraldeide aggiungendo 9 volumi di campione ad 1 volume di glutaraldeide. Il campione fissato può essere mantenuto per 3 settimane a 4-6 °C.
2. Omogeneizzare il campione fissato ed eventualmente eseguire diluizioni 1:10 in tampone fosfato pH 7,2.
3. Colorazione: porre in un recipiente sterilizzato a calore secco 1 mL del campione fissato con 1 mL di colorante. Lasciare in contatto per 2 minuti. Filtrare attraverso membrana filtrante con pori cilindrici da 0,22  $\mu\text{m}$  (preferibilmente in policarbonato). Prima e dopo la filtrazione sciacquare la membrana con 2-3 mL di tampone fosfato. Lasciare asciugare la membrana per qualche minuto controllando che non vi restino tracce di umidità.
4. Tagliare la membrana a metà e disporre le due metà su vetrini portaoggetto. Procedere alla diafanizzazione aggiungendo 2-3 gocce di olio da immersione. Porre vetrini coprioggetto e procedere all'osservazione al microscopio a 1000X con obiettivo ad immersione. Verificare se, in almeno 10 campi casuali, le cellule batteriche sono omogeneamente distribuite (devono essere visibili almeno 10-50 cellule per campo). Contare il numero di cellule in 20-50 campi microscopici e applicare la formula riportata per avere il numero totale delle cellule presenti nel campione di partenza:

$$\text{Cellule totali/mL} = N_i \times A/a \times 1/n_i \times 1/V$$

dove:  $N_i$  = Numero totale di cellule in tutti i campi osservati; A = area della membrana filtrante; A = area del campo microscopico\*;  $n_i$  = numero dei campi; V = volume di campione filtrato

## Enumerazione di Attinomiceti

### Materiali

- Agar Amido: amido solubile (10 g),  $K_2HPO_4$  (1 g),  $MgSO_4$  (2g),  $CaCO_3$  (2 g) solfato di ammonio (2 g), soluzione di elementi in tracce (1 mL), di acqua distillata (1.000 mL), agar (20 g) (11).
- Soluzione di elementi in traccia: solfato di ferro (0,1 g), cloruro (oso) di manganese (0,1 g), solfato di zinco (0,1 g), acqua distillata (1 L).

### Preparazione dei materiali

Agar Amido: sospendere in acqua gli ingredienti e riscaldare fino alla dissoluzione completa che si dovrebbe raggiungere con l'inizio della ebollizione. Autoclavare per 15 minuti a 121 °C. Raffreddare a 55-60 °C e versare in piastra.

### Procedimento analitico

1. Filtrare di quantità di campione variabili da 10 mL ad 1 L e porre le membrane su Agar Amido. Nel caso di analisi di fanghiglie/biofilm spatolare sulla superficie delle piastre di Agar Amido quantità di circa 1 g di materiale prelevato dalle condutture oppure presente in campioni di acque all'origine.
2. Incubare a  $22 \pm 1$  °C per 5-14 giorni, osservando le piastre giornalmente.
3. Le colonie di attinomiceti appaiono crostose o cotonose, a lenta crescita, a volte colorate, con marcato odore di terra. Al microscopio ottico sono Gram + e hanno dimensioni tipiche di procarioti.
4. Enumerare le colonie che rispondano a queste caratteristiche come attinomiceti presuntivi.

## Enumerazione di *Pseudomonas*

### Materiali

- Pseudosel Agar che si prepara seguendo le indicazioni della casa produttrice.
- Membrane filtranti di 0,22µm di porosità (11).

### Procedimento analitico

1. Filtrare 100 mL di campione e porre la membrana su Pseudosel agar. Incubare a 30°C per 48-72 ore. Enumerare tutte le colonie cresciute.

---

\* L'area del campo microscopico si calcola con l'ausilio del micrometro oggetto che è un vetrino sul quale è incisa una scala graduata di 1 o 2 mm e suddivisa in 100 o 200 parti. Sulla base dell'ingradimento utilizzato si centra la scala graduata nel campo visivo e si registra il diametro, che si esprime in millimetri. Nel caso di utilizzo di apparecchiature in grado di effettuare l'analisi di immagine questi conteggi sono effettuati automaticamente.

2. Effettuare nuovamente l'enumerazione illuminando la membrana con lampada Wood (350 nm) per verificare la fluorescenza.
3. Registrare il numero delle colonie fluorescenti come *Pseudomonas* presuntivi.

## Enumerazione lieviti e muffe

### Materiali

- Agar Malto addizionato di acido lattico: estratto di malto(30 g), peptone micologico (5 g), agar (15 g), acqua distillata (1 L). In alternativa può essere utilizzato Sabouraud Dextrose agar (11).
- Membrane filtranti da 0,45 µm di porosità, preferibilmente di colore nero.

### Preparazione dei materiali

Agar Malto: sciogliere gli ingredienti a caldo e portare il pH a 5,4. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti. Per aumentare la selettività del terreno e inibire lo sviluppo batterico portare il pH del terreno a 3,5 aggiungendo acido lattico al 10% sterile. L'aggiunta dell'acido lattico va effettuata quando la temperatura del terreno è intorno a 45-50 °C. Distribuire in piastre.

### Procedimento

1. Filtrare quantità di acqua di 10-100 mL. Porre le membrane su Agar Malto. Incubare a 28-30 °C per 5-8 giorni controllando le piastre ogni 2-3 giorni.
2. Enumerare le colonie di lieviti e di funghi. Le colonie di lieviti si presentano generalmente bianche o colorate (talvolta anche nere) e di consistenza burrosa. Le colonie di funghi si distinguono per il caratteristico micelio.

## Enumerazione di microrganismi filamentosi

Questo sistema dà solo un'indicazione del numero dei batteri filamentosi perché consente l'enumerazione dei filamenti batterici. Nel caso di presenza di quantità elevate di depositi di ferro interferenti con la visualizzazione dei filamenti si può utilizzare HCl, acido ossalico o acido citrico, per dissolvere questi depositi (3).

### Materiali

- Membrane filtranti di 0,45 µm di porosità.
- Olio da immersione.

### Procedimento analitico

1. Filtrare quantità di acqua variabili da 100 mL a 1-2 L, in funzione del contenuto in microrganismi filamentosi. Lasciare asciugare bene la membrana, anche mantenendola in un termostato ad aria a 37-44 °C per il tempo necessario.
2. Tagliare la membrana a metà e disporre le due metà su vetrini portaoggetti. Procedere alla diafanizzazione aggiungendo 2-3 gocce di olio da immersione. Coprire con vetrini coprioggetti.
3. Procedere all'osservazione al microscopio a 100-400X preferibilmente a contrasto di fase. Spesso i batteri filamentosi sono ben visibili anche a più bassi ingrandimenti.

4. Enumerare i filamenti in 7-10 campi microscopici calcolando il n/mL secondo la formula:

$$n/mL^* = N_i \times (A/a) \times (n_i \times V)^{-1}$$

## Enumerazione di *Aeromonas*

### Materiali

- Ampicillina Destrina Agar: triptosio (5 g), destrina (10 g), estratto di lievito (2 g), sodio cloruro (3 g), potassio cloruro (2 g), magnesio solfato eptaidrato (200 mg), ferro cloruro (ico) (100 mg), blu di bromotimolo (80 mg), agar (15 g), sodio desossicolato (100 mg), ampicillina (10 mg), di acqua distillata (1 L).
- Soluzione di desossicolato (10 mg/mL).
- Soluzione di ampicillina (1 mg/mL) preparata al momento dell'uso.
- Membrane filtranti di 0,45 µm di porosità.
- Soluzione di reagente per l'ossidasi: Tetrametil-p-fenilendiamina idrocloruro (0,1 g/10 mL)%. Può essere conservato a 4-8 °C e al buio per una settimana.

### Preparazione dei materiali

Sciogliere gli ingredienti escluso l'agar, l'ampicillina e il sodio desossicolato. Portare il pH a 8,0. Aggiungere l'agar e sciogliere il tutto portando ad ebollizione. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Lasciare raffreddare fino a 55 °C e aggiungere 10 mL di soluzione di ampicillina e 10 mL di soluzione di desossicolato di sodio. Mescolare bene e distribuire in capsule Petri. Il terreno può essere conservato a 4-8 °C per una settimana.

### Procedimento analitico

1. Filtrare 100 mL di acqua e porre la membrana sul terreno Ampicillina Destrina agar. Incubare a 30 °C per 24-48 ore.
2. Enumerare le colonie gialle.
3. Sottoporre tutte le colonie enumerate (o almeno il 10-20% di esse) al test dell'ossidasi, prelevando con un'ansa di platino o un'ansa monouso le singole colonie e operando degli strisci su un cartoncino imbibito della soluzione di reagente per l'ossidasi. La comparsa entro pochi secondi di un colore blu-viola indica positività per la presenza di questo enzima.
4. Considerare come *Aeromonas* presuntive le colonie gialle e ossidasi positive.

## Enumerazione di *Acinetobacter*

### Materiali

- Terreno per l'isolamento di *Acinetobacter* (15).
  - Soluzione A:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 g), acqua distillata (400 mL).
  - Soluzione B:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (16,5 g), acqua distillata (500 mL).
  - Soluzione C:** FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5 mg), acqua distillata (10 mL), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,2 g), NH<sub>4</sub>Cl (2 g), CaCl<sub>2</sub> (10 g), Sodio acetato (2 g).
- Agar sangue o Agar MacConkey.
- Ceppo di riferimento di *Acinetobacter*.

---

\* Vedi "Conte batteriche al microscopio"

**Preparazione dei materiali**

Aggiungere alla soluzione A i seguenti sali,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 g),  $\text{CaCl}_2$  (10 g), 1 mL della soluzione C e sodio acetato (2 g). Aggiungere quindi la Soluzione B. Agitare su agitatore magnetico. Portare a 960 mL, correggere il pH a 7,5 e quindi portare il volume a 1 L. Autoclavare a 118 °C per 15 minuti. Il terreno può essere distribuito in provette (10 mL/provetta)

**Procedimento analitico**

1. Inoculare piccoli volumi di acqua (ad esempio 2 mL) nel terreno distribuito in provette da 10 mL. Incubare in agitazione a 30 °C per 24 h. Usare come controllo un ceppo di riferimento di *Acinetobacter*.
2. Inoculare una ansata delle brodoculture fertili su Agar Sangue o Agar MacConkey. Incubare per altre 24 h a 30 °C.
3. Enumerare le colonie cresciute su questo substrato e morfologicamente simili al ceppo di riferimento come *Acinetobacter* presuntivi.

**Enumerazione di fagi di *Escherichia coli*****Materiali**

- Pac (*Phage agar concentrate*): Lab Lemco Powder (Oxoid) (14 g), NaCl (4 g), peptone (12 g), carbonato di sodio (1 g),  $\text{MgCl}_2$  (1 g), agar (12 g), acqua distillata (1 L).
- Soluzione di  $\text{CaCl}_2$ :  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (13 g), acqua distillata (100 mL). Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti.
- Soluzione di acido nalidixico: Acido nalidixico (0,7 g), acqua distillata (20 mL). Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane filtranti con porosità di 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Ceppo di *Escherichia coli* fago sensibile.

**Preparazione dei materiali**

Solubilizzare al calore gli ingredienti del terreno di coltura PAC, portare il pH a 7,2. Distribuire in bottiglie con tappo a vite da 250 mL in ragione di 100 mL per bottiglia. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti. Il terreno può essere conservato a 4-8 °C per 1 mese.

**Procedimento analitico**

1. Sciogliere il PAC e lasciarlo raffreddare fino a 48 °C, mantenendolo a questa temperatura.
2. Porre 100 mL del campione da saggiare in una bottiglia con tappo a vite da 200 mL. Aggiungere 1 mL della soluzione di  $\text{CaCl}_2$ , 5 mL di una brodocultura di 12 ore di *Escherichia coli* fago sensibile e, nel caso in cui possa esserci interferenza batterica aggiungere 1 mL di soluzione di acido nalidixico. L'aggiunta di acido nalidixico può essere effettuata solo se si utilizza un ceppo di *Escherichia coli* nalidixico-resistente. Portare la mistura a 48 °C e mantenerla per 3 minuti.
3. Versare la mistura nella bottiglia contenente il PAC disciolto e mantenuto a 48 °C.
4. Agitare piano per evitare che si formino bolle e capovolgere la bottiglia lentamente solo una volta.
5. Distribuire in piastre da 10-14 cm. Lasciare le piastre leggermente aperte e una volta solidificate, capovolgerle e porle in termostato a  $36 \pm 1$  °C per una notte.
6. Leggere le placche litiche e riportare il numero a 100 mL.

## Rilevamento di biofilm

### Materiali

- Tampone fosfato sterile 60 mM (pH 7,6).
- Soluzione acetonica di Fluoresceina Diacetato (FDA) (16).

### Preparazione dei materiali

- Tampone fosfato sterile 60 mM (pH 7,6).
  1. Preparare tre soluzioni madre:
    - *Soluzione 1*  
Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,2 M: aggiungere 1 parte di NaOH (reagente che deve contenere meno del 5% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ad 1 parte di acqua distillata. Fare sciogliere accuratamente e tappare con tappo di gomma. Lasciare a riposo 10 giorni fino a che non depositi tutto l' $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Per avere una soluzione della molarità di 0,2 M usare 108 mL della soluzione così preparata di NaOH e portare a 10L con acqua distillata.
    - *Soluzione 2*  
Soluzione di fosfato monopotassico ( $\text{KH}_2\text{P}_0_4$ ) 0,2M: sciogliere 27,232 di prodotto anidro in acqua distillata. Sciogliere bene e portare a 1 L.
    - *Soluzione 3*  
Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 1M: aggiungere 1 parte di NaOH (reagente che deve contenere meno del 5% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ad 1 parte di acqua distillata. Fare sciogliere accuratamente e tappare con tappo di gomma. Lasciare a riposo 10 giorni fino a che non depositi tutto l' $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Prelevare 540 mL della soluzione così preparata e portare a 10L con acqua distillata.
  2. Miscelare 42,74 mL di Soluzione 1 e 50 mL di Soluzione 2.
  3. Controllare il pH, che deve essere 7,6 ed eventualmente correggerlo utilizzando la Soluzione 3.
  4. Aggiungere acqua distillata fino a che si raggiunge il quantitativo di 200 mL (a questo punto si è ottenuto tampone fosfato 0,2 M).
  5. Portare a 1 L con acqua distillata.

Tutte le diluizioni debbono essere fatte a temperatura ambiente e le misure di pH a temperatura controllata, correggendo il valore in funzione di essa.

- Soluzione acetonica di Fluoresceina Diacetato (FDA) (16).  
Preparare 10 mL di soluzione mescolando FDA ad acqua distillata nella proporzione di 2 mg/mL. Una volta preparata, la soluzione va conservata in frigorifero in recipiente sterile e scuro.

### Procedimento analitico

1. Raschiare un quantitativo di biofilm dai tubi di captazione o dalle pareti delle vasche in cui l'acqua captata transita prima della immissione in rete. Omogeneizzare il biofilm.
2. Aggiungere ad aliquote di 1,0 e di 0,1 mL di omogeneizzato 5 mL di tampone fosfato sterile 60 mM (pH 7,6) e 0,1 mL di una soluzione acetonica di FDA (2mg/mL). Porre ad agitare il campione per 1 ora a temperatura di 30 °C.
3. Aggiungere quindi 5 mL di acetone per bloccare l'attività batterica e quindi la ulteriore idrolisi dell'FDA.

4. Filtrare su carta.
5. Misurare l'assorbanza della soluzione a 490 nm.

Il metodo FDA può essere applicato alle fanghiglie di tubazioni, su spezzoni di tubo o su vetrini esposti al contatto con l'acqua per un tempo predefinito, senza procedere, in questi ultimi due casi, ad alcun trattamento di distacco del biofilm dalla superficie dei materiali.

## Enumerazione di protozoi

I protozoi a vita libera sono in genere così diffusi che basta raccogliere campioni di fanghiglie, di sedimenti, di biofilm, ma anche gocce di acqua per poterli vedere al microscopio.

Non fissare mai il preparato.

### Materiali

- Soluzione di Lattofenolo-Blue Cotton
  - Soluzione A: Acido lattico (100 mL), fenolo (100 mL), Glicerolo (100 mL), acqua distillata (100 mL). La soluzione può essere utilizzata nell'arco di tre mesi dalla preparazione.
  - Soluzione B: Blu di anilina solubile (soluzione satura di Blue Cotton) (10 mL), glicerolo (10 mL), acqua distillata (80 mL). La soluzione va conservata in una bottiglia di vetro scuro e può essere utilizzata nell'arco di tre mesi dalla preparazione.

### Preparazione dei materiali

Al momento dell'uso mescolare le soluzioni A e B in parti eguali. L'analisi può essere qualitativa (presenza (più o meno abbondante) - assenza) o quantitativa. In quest'ultimo caso usare camere di Palmer Maloney (0,1 mL) o di Sedwig Rafter (1 mL) o comunque costruire una camera (con vetrino portaoggetti, cera d'api o paraffina e coprioggetti) a volume calibrato.

### Procedimento analitico

Seguire le tecniche della predisposizioni di vetrini a fresco per l'esame al microscopio ottico in luce trasmessa o meglio in contrasto di fase.

Per facilitare l'osservazione può essere opportuno procedere a colorazioni vitali come quella indicata con Lattofenolo-Blue Cotton. Ad una goccia di preparato aggiungerne una di colorante. Adagiare un vetrino coprioggetti evitando la formazione di bolle d'aria.

## Rilevamento di metazoi

### Materiali

- Membrane filtranti a pori cilindrici di 5  $\mu\text{m}$  di diametro
- Soluzione di formalina (ac.propionico o acetico al 10-15% e formalina al 2,5%).

### Procedimento analitico

1. Filtrare a bassa depressione 1-20 litri di acqua attraverso membrane filtranti a pori cilindrici di 5  $\mu\text{m}$  di diametro.
2. Lavare le membrane con alcuni millilitri dell'acqua filtrata in modo da raccogliere il materiale depositatosi sulle superfici. Versare il tutto in un contenitore (ad esempio, una

capsula Petri). Controllare la presenza di eventuali residui sulla membrana. Il materiale può essere osservato al microscopio ottico a fresco o dopo fissazione in soluzione di formalina (ac.propionico o acetico al 10-15% e formalina al 2,5%).

3. In alternativa si può concentrare per sedimentazione in coni posti in camera frigorifera, a partire da 1-2 litri di acqua. Il precipitato può essere ulteriormente concentrato per centrifugazione a bassi regimi di giri (4.000 RPM) usando provette da 50 mL a fondo conico.
4. Esaminare il materiale raccolto al microscopio a luce diretta o meglio in contrasto di fase con ingrandimenti 100-400X. L'osservazione dei microrganismi in vivo consente una più semplice identificazione. Le stime possono essere registrate come: *presenza rara, frequente, abbondante*.

## Bibliografia

1. World Health Organization. *Guidelines for drinking water quality*. Geneva: WHO; 1998.
2. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.
3. Aulicino FA, Contu A, Ramouz E, Meloni P, Deidda A, Pala A. *Studio di un caso di corrosione batterica in un acquedotto di una regione italiana. Rapporto 1991*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1991. (Rapporti ISTISAN 91/4).
4. Aulicino FA, Palin L, Orsini P. Presenza di biofilm in una rete idrica di un acquedotto piemontese. *Ig Mod*.1996; 105:29-40.
5. LeClerc H. Le microbisme des eaux minerales naturelles. *Hydrogèologie* 1990;4:279-85.
6. Marmonier P, Vervier P, Gibert J, Dole-Olivier M.J. Biodiversity in groundwaters. *Tree* 1993;8:392-5.
7. Volterra L, Bertolotti A, Gallo L. Ecosistema rete. *Ingegneria Sanitaria*. 1993;41:29-34.
8. Volterra L, Aulicino FA, Bernabei S, Mancini L. La diffusione del problema dei nematodi in acque italiane destinate al consumo umano. *Inquinamento* 1996;8:60-6.
9. Gray NF (Ed.). *Drinking water quality. Problems and solutions*. New York: J Wiley and Sons; 1994.
10. UNI CEI EN ISO/IEC 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
11. Aulicino FA, Volterra L, Bonadonna L, Floccia M. Tecniche di rilevamento per i controlli microbiologici relativi alle acque potabili. In: Sartorius (Ed.). *Microbiologia delle acque potabili*. Bologna: Pitagora Editrice; 1989. p. 117-63.
12. ISO 9308-1. Water quality-Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.
13. ISO 7899-2. Water quality-Detection and enumeration of intestinal enterococ - Part 2: Membrane filtration method. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.
14. Del Mar Lleò M, Pierobon S, Tafi MC, Brugnoli A. Biologia molecolare applicata alla batteriologia. In: Volterra L, Aulicino FA (Ed.). *Acque di falda: stato dell'arte delle conoscenze in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1999. (Rapporti ISTISAN 99/32). p. 39-43.
15. Austin B, Austin DA. Miscellaneous pathogens. In Austin B, Austin DA (Ed.). *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. Chichester: Ellis Horwood Limited Publishers; 1989. p. 297-304.
16. De Rosa S, Sconza F, Volterra L. A new method for direct biofilm estimation. *Wat Res* 1998;32:2621-6.

# CONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA DI CORPI IDRICI SUPERFICIALI UTILIZZATI COME FONTE DI ACQUE POTABILI

Fabiano Bitonte, Alessandro Micheli

*Impianto di Potabilizzazione, Acquedotto Pugliese Potabilizzazione srl, Montalbano Cronico (Matera)*

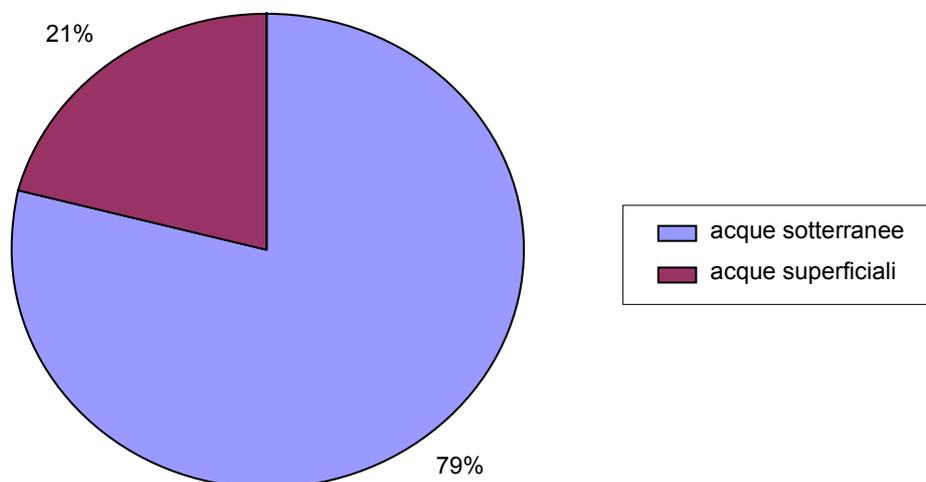
## Introduzione

La crescente richiesta di acqua potabile, in special modo nei paesi industrializzati, si sta sempre di più indirizzando verso le risorse idriche superficiali.

Attualmente in Italia le risorse idriche superficiali utilizzate per il consumo umano costituiscono una percentuale ancora piuttosto limitata rispetto a quelle sotterranee (Figura 1, Tabella 1), ma i problemi connessi al loro uso sono molteplici e soprattutto legati ai trattamenti cui devono essere sottoposte (1).

La legislazione in materia si è evoluta e alla definizione generica di *potabilità* è stata sostituita, a seguito delle normative europee, la *conformità*, che si riferisce al rispetto dei limiti di una serie di parametri.

L'interesse del gestore è oggi rivolto soprattutto a come viene lavorato il *prodotto acqua*, che si comporta come un qualsiasi prodotto alimentare industriale. A riprova di ciò vi è anche da segnalare il grande dibattito, peraltro ancora non esaurito, sulla definizione di *alimentare* o meno dell'acqua destinata al consumo umano.



**Figura 1. Distribuzione percentuale delle acque sotterranee (79%) e superficiali (21%) utilizzate a scopo potabile in Italia nel 1995**

Tabella 1. Acque distribuite in Italia 1995

Regione	Acque superficiali m <sup>3</sup> /anno		Acque sotterranee m <sup>3</sup> /anno	
	n.	%	n.	%
Piemonte	56.724.434	17	276.948.706	83
Valle d'Aosta	0	0	6.865.202	100
Lombardia	11.674.407	1,3	877.549.869	98,7
PA Bolzano	0	0	24.378.000	100
PA Trento	126.001	0,3	37.701.300	99,7
Veneto	54.788.378	10,6	460.596.123	89,4
Friuli-Venezia Giulia	1.500.000	1,1	134.591.795	98,9
Liguria	45.524.103	34,2	87.697.183	65,8
Emilia Romagna	142.000.000	37,4	238.000.000	62,6
Toscana	118.531.000	33	240.655.000	67
Umbria	765.000	1,3	56.684.078	98,7
Marche	20.000.000	15	112.958.020	85
Lazio	1.500.000	0,2	845.500.000	99,8
Abruzzo	0	0	133.000.000	100
Molise	9.000.000	23,7	29.000.000	76,3
Campania	40.997.000	6,6	567.516.000	93,4
Puglia	282.034.000	52,8	251.714.000	47,2
Basilicata	35.973.279	43,4	46.933.498	56,6
Calabria	198.700.000	80,9	47.000.000	19,1
Sicilia	41.788.349	16,8	206.525.649	83,2
Sardegna	169.000.000	94,9	9.000.000	5,1
Totale	1.230.625.950	20,7	4.557.947.423	79,3

PA: Provincia Autonoma

## Definizione di corpi idrici superficiali

Per corpi idrici superficiali vengono generalmente indicati le acque di fiume o le acque invasate (naturalmente o artificialmente) sulla superficie del pianeta.

Le acque dei fiumi sono dotate di una discreta velocità, bassa profondità e l'interfaccia acqua/aria cambia continuamente. Le acque dei laghi hanno bassa velocità e profondità e ciò genera lunghi tempi di ricambio, per cui la superficie di scambio acqua/aria è minima e poco variabile. Dallo scambio acqua/aria scaturisce l'assorbimento dei gas atmosferici (ossigeno, azoto e anidride carbonica) (2).

La composizione chimica delle acque di superficie dipende dalla natura dei terreni interessati, poiché le acque solubilizzano e trasportano i diversi elementi in essi presenti.

Gli elementi che caratterizzano le acque di superficie e che le differenziano da quelle sotterranee sono:

- maggiore presenza di gas disciolti
- concentrazione, talora elevata, di materiale in sospensione.

Il materiale in sospensione ha una composizione molto variabile, potendo essere costituito da un largo *range* di materiale particolato, da particelle di natura colloidale ad elementi biologici figurati.

Nei laghi, il periodo di permanenza e la bassa velocità favoriscono i fenomeni di sedimentazione per cui la torbidità residua è costituita da particolato fine, quindi,

prevalentemente di origine colloidale. La presenza di materiali organici deriva sia dagli apporti dell'affluente sia dai sistemi biologici che si instaurano nel corpo idrico: fitoplancton, zooplancton, vegetali, macrofite, pesci, ecc. Il sistema è sottoposto a variazioni periodiche giornaliere, quali le temperature, l'illuminazione, e a variazioni periodiche stagionali, come le variazioni climatiche. Può, inoltre, essere turbato da eventi aleatori e repentini, la cui ricaduta è anche funzione dell'inerzia dovuta alla grandezza del lago. Questi fenomeni provocano variazioni della composizione delle acque nel tempo.

La composizione delle acque dei laghi e, in particolare, dei laghi artificiali varia anche in senso verticale, cioè dalla superficie al fondo e i profili delle concentrazioni dei vari parametri alle varie quote sono importanti elementi di valutazione. In questi ultimi anni risulta interessante anche l'apporto dato alla composizione delle acque lacustri dai sedimenti, i quali subiscono fenomeni di accumulo e di rilascio continui.

Per le acque dei fiumi la variabilità della composizione è molto più elevata rispetto a quella dei laghi, pertanto ogni ipotesi di utilizzazione di questo tipo di corpi idrici quale fonte di acqua potabile, necessita di più accurati approfondimenti qualitativi. Per limitare i problemi connessi alla variabilità della composizione e anche per evitare trattamenti molto spinti si tende a non utilizzare direttamente tali acque, a meno che non derivino da fiumi di notevole portata. In queste situazioni sempre più spesso si fa ricorso ad attivare opere accessorie, quali la costruzione di bacini di equalizzazione o di pozzi ripariali, che migliorano la costanza delle caratteristiche dell'acqua da potabilizzare.

## Potabilizzazione e normativa

Le acque di superficie non possono essere distribuite senza preventivi trattamenti poiché le loro caratteristiche variano nel tempo e poiché sono caratterizzate dalla presenza di sostanze chimiche e microrganismi che possono risultare patogeni per l'uomo.

I primi esempi di potabilizzazione da acque superficiali si fanno risalire al 1832 in Scozia e nel 1850 a Londra. Le acque del Tamigi erano trattate utilizzando un impianto a filtrazione lenta. In Italia questa pratica si è affermata nel dopo-guerra e, soprattutto a partire dagli anni sessanta, è in continua espansione. Attualmente circa il 20% circa delle acque distribuite in Italia attinge da acque superficiali (1).

Fino agli anni '80 ogni tipo di acqua superficiale poteva essere sottoposto a trattamento di potabilizzazione e il fattore limitante era dato solo dalla tecnologia utilizzata per ottenere un'acqua potabile conforme alle norme. Con la Legge 515/1982 il legislatore poneva dei limiti alla potabilizzazione classificando i corpi idrici in classi di qualità, disponendo nel contempo il tipo di trattamento al quale sottoporle.

L'attuale e recente normativa di riferimento è il DL.vo 152 del 1° maggio 1999 (3), che recepisce le direttive CEE 91/271 e 91/676 ed è diretta conseguenza della Legge 128/98, che demanda al Governo Centrale il riordino della normativa in materia di tutela delle acque dall'inquinamento (4, 5).

L'obiettivo del legislatore, conscio di uno stato più o meno degradato della risorsa, è quello di tutelare e migliorare lo stato delle acque e di proteggere quelle destinate a particolari usi, con priorità per quelle destinate alla potabilizzazione. Tali obiettivi dovranno essere raggiunti in tempi lunghi (entro il 2016) attraverso fasi intermedie (2008) con sub-obiettivi e verifiche. In fase di enunciazione dei principi il legislatore pone all'attenzione il problema del mantenimento della capacità di autodepurazione e quello della biodiversità come valore intrinseco della qualità dell'acqua. La preoccupazione di assicurare per le generazioni future un adeguato patrimonio

idrico unitamente alla qualità dell'acqua trova risposta nell'art. 22, in cui il legislatore mette in relazione elementi di qualità e di quantità.

Il DL.vo 152 del 1° maggio 1999, proseguendo e completando la logica della Legge 515/1982 (6), demanda alle Regioni il compito di classificare i corpi idrici, cosa che deve essere fatta entro il 2001, e individua, sulla base di specifiche caratteristiche, tre classi di qualità di riferimento (A1, A2, A3) per le acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile, indicando anche il tipo di trattamento a cui sottoporle.

Lo stesso Decreto, acquisendo la consapevolezza delle limitate disponibilità idriche, postula la realizzazione di reti duali in nuovi insediamenti, ove accanto a un'acqua di qualità "buona" viene distribuita un'acqua di qualità meno pregiata.

## Problemi principali delle acque di superficie

I problemi relativi alla qualità dell'acqua affluente al bacino vengono gestiti attraverso il controllo di tutti gli scarichi rivenienti nel bacino stesso.

I valori limiti di emissione degli scarichi in acque superficiali sono regolati dal DL.vo 152/1999, che in relazione agli aspetti microbiologici prevede la determinazione dell'*Escherichia coli*, microrganismo indicatore di contaminazione fecale, consigliando un valore, in 100 mL, non superiore a 5.000 UFC (Unità Formanti Colonia). Inoltre, impone il saggio di tossicità su *Daphnia magna* con un massimo del 50% degli organismi immobili.

Queste indicazioni, se da un lato semplificano gli elementi del controllo microbiologico degli scarichi, dall'altro, determinando l'obbligo di ricercare e rimuovere le eventuali cause di tossicità, impongono un difficilissimo percorso analitico.

Relativamente all'accertamento dello stato trofico del bacino, il DL.vo 152/1999 (All.2 Tabella 1/A) impone la determinazione dei coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali e salmonelle, indicando valori guida specifici per ciascuna classe.

La condizione trofica delle acque di un bacino artificiale destinate alla potabilizzazione non può essere individuata solo attraverso indagini microbiologiche e certamente c'è la necessità di altre valutazioni. Infatti la gestione e il controllo di un bacino comporta la necessità di monitorare sia quei parametri, che indicano direttamente la salubrità dell'ecosistema, sia quei parametri che, direttamente o indirettamente, possono portare alterazioni qualitative dell'acqua potabilizzata.

Accanto alla ricerca di indicatori di inquinamento recente, si dovranno affiancare ricerche di indicatori di inquinamento pregresso (spore), patogeni conclamati e opportunisti (7). Pertanto si dovranno monitorare, secondo frequenze da stabilire a seconda dei casi, un insieme di parametri, come, alghe, carica batterica totale, coliformi totali, coliformi fecali, enterobatteri patogeni, protozoi, spore di clostridi solfito riduttori, streptococchi fecali, stafilococchi, *pseudomonas*, ferro e solfo batteri e aeromonadi, elminti. Non meno importanti sono alcune determinazioni di organismi di tipo virale quali i colifagi (8).

Devono essere effettuati studi e controlli sulla tossicità, la mutagenicità e la cancerogenicità delle acque grezze (9).

Recenti studi hanno dimostrato l'interessamento delle acque superficiali alla diffusione nell'ambiente di ceppi batterici antibiotico-resistenti.

L'attenzione maggiore deve essere prestata a quei parametri che pongono le difficoltà maggiori durante le fasi di trattamento. Tra questi parametri sono da considerare le alghe che, indipendentemente dalla loro tossicità, interferiscono sulla qualità dell'acqua potabile. Il controllo della loro qualità e quantità, soprattutto dove si possono verificare fioriture algali, è un parametro fondamentale di gestione. La Commissione Europea, con la Direttiva 76/160/EWG

invita gli enti locali a monitorare la presenza di tossine algali nelle acque, qualora si manifestino fioriture algali imponenti (disco di Secchi inferiore a 2 m e la concentrazione di clorofilla superficiale maggiore di 40 µg per litro) (10, 11).

Uno dei problemi connessi alla presenza delle alghe nelle acque è quello della loro rimozione. Negli impianti tradizionali le difficoltà di rimozione aumentano in funzione della presenza rispettivamente di diatomee, cloroficee e cianoficee, soprattutto se filamentose (12). Un'acqua ricca di fitoplancton può presentare diversi inconvenienti per la potabilizzazione:

1. presenza di sostanze in sospensione che possono superare la barriera dei filtri,
2. elevato contenuto di sostanza organica nell'acqua potabile,
3. inefficienza della disinfezione e eccesso di formazione di organoalogenati,
4. sostegno allo sviluppo di protozoi e metazoi,
5. ricrescita di alghe nei serbatoi,
6. modifica negativa dei caratteri organolettici,
7. elevati contenuti di endotossine, biotossine e/o citotossine, nel caso di presenza di stipiti tossici di cianoficee.

In relazione al problema dei metazoi, ad esempio, è noto come i nematodi si possono trovare comunemente nelle acque di superficie e possono essere presenti in quantità massicce nei fondali dei corpi idrici superficiali o nella corrente fluviale. Essi non vengono rilevati ad occhio nudo, essendo trasparenti e di piccole dimensioni. Un numero considerevole di nematodi nelle fonti di approvvigionamento è la causa della presenza di questi organismi negli impianti di trattamento, in cui, in relazione alla consistenza numerica e alla vitalità, potranno subire una rimozione o riduzione.

Una particolare attenzione dovrà essere posta alla presenza di protozoi patogeni a diffusione idrica, soprattutto *Giardia* e *Cryptosporidium*. La facilità dei loro ritrovamenti unita alla loro bassa dose infettante sono i motivi che inducono a considerare prioritari i trattamenti delle acque mirati alla sicurezza dell'assenza di questi organismi nel prodotto finito. I protozoi possono essere presenti nelle acque a seguito di contaminazione da liquami. Sono organismi resistenti alla clorazione e possono essere adeguatamente rimossi solo attraverso trattamenti fisici quali la filtrazione.

Importante è anche una valutazione di ferro e solfo batteri i quali, in condizioni idonee e con acque aggressive, superando le barriere del trattamento, possono indurre fenomeni di biocorrosione delle reti di distribuzione di acqua potabile (13, 14).

## Conclusioni

La struttura di un corpo idrico è complessa ed è composta da differenti elementi naturali: idrogeologici, termici, biochimici, fisico-chimici, biologici. Ognuno di essi concorre alla formazione dei processi e degli equilibri che governano l'ecosistema. Essi rispondono e reagiscono all'azione antropica.

I carichi inquinanti provenienti dall'azione antropica possono avere una diffusione spaziale e temporale molto variabile e a ogni tipologia di azione vi sarà la ricerca di nuovi equilibri del sistema ecologico.

Lo scompenso di questi equilibri potrebbe compromettere completamente la risorsa anche per tempi lunghi, vanificando ogni tecnica di potabilizzazione.

Gli aspetti biologici rappresentano uno dei fulcri di questi equilibri sia per la sopravvivenza di un sistema biologico e autodepurante del lago e sia sulla salute dell'uomo che utilizza tali acque.

Gli sforzi normativi nazionali ed europei sono rivolti principalmente, attraverso la salvaguardia del territorio, a prevenire ed evitare inquinamenti diffusi, ma per ottenere l'attenzione e il rispetto dovuto a queste grandi risorse il momento legislativo non è sufficiente se non si riuscirà a trasmettere questa cultura a larghi strati della popolazione.

Una corretta politica ambientale è la garanzia più immediata per evitare che trattamenti di potabilizzazione sempre più spinti diventino troppo onerosi e per la comunità.

## Bibliografia

1. Navazio G. La gestione del controllo e dell'utilizzo delle risorse idriche. In: Frigerio A (Ed.). *Qualità dell'acqua: approccio chimico ed ecotossicologico*. Milano: Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche; 1996. p.10-17
2. Italia. Legge 5 gennaio 1994, n. 36. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento ordinario* n. 14, 19 gennaio 1994.
3. Italia. Decreto Legislativo 11 maggio 1999 n. 152. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento ordinario* n. 177, 30 luglio 1999.
4. Italia. DPR 24 maggio 1988 n. 236. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento ordinario* n. 152, 30 giugno 1988.
5. Ottaviani M, Sarti N, Conio O. Applicazione della direttiva 80/778 in Italia. Problematiche qualitative riscontrate nel triennio 1993/1995. In: *Atti del convegno European water policy*. Federgasacqua, Venezia 6-7 maggio, 1998.
6. Italia. DPR 3 luglio 1982 n. 515. *Gazzetta Ufficiale* n. 216, 7 agosto 1982.
7. Volterra L. Processi di potabilizzazione: aspetti microbiologici. In: *Atti del Corso di Aggiornamento Regione Veneto-ULSS n. 30 Rovigo. "Le acque potabili dall'attingimento all'utilizzo"*. Rovigo 18-20 marzo 1992. Padova: Piccin Editore; 1992. p. 127-38.
8. Meucci L, Giacosa D. Principi scientifici che orientano la scelta dei parametri di controllo di qualità per le acque destinate al consumo umano. In: Frigerio A (Ed.). *Qualità dell'acqua: approccio chimico ed ecotossicologico*. Milano: Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche; 1996. p. 18-30.
9. Monarca S, Dalmiglio A, Feretti D, Zanardini A, Manica P, Nardi G. Effetto della disinfezione sull'attività mutagenica in acque lacustri destinate al consumo umano. In: USL n. 11 Pordenonese (Ed.). *Atti del convegno Dalla tossicologia alla ecotossicologia*." Pordenone 16-17 settembre 1994. p. 251-6.
10. Conio O, Palumbo F. Esperienze sul controllo e la rimozione delle alghe da acque destinate alla potabilizzazione. *Biologia ambientale* 1997;11(2):36-41.
11. Fontani N, Spigoni G. Rassegna delle tecnologie applicate alla rimozione delle tossine algali. *Biologia ambientale*. 1997; 11 (2): 30-35.
12. Volterra L. Alghe ed acqua potabile. *Biologia ambientale* 1997;11(3):3-23.
13. Aulicino FA, Contu A, Ranouz E, Meloni P, Deidda A, Pala A. *Studio di un caso di corrosione batterica in un acquedotto di una regione italiana*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1991. (Rapporti ISTISAN 91/4).
14. Deidda A. Acque superficiali e fenomeni di corrosione: la correzione dell'aggressività come prevenzione. In: Azienda Gas Acqua Consorziale (Ed). *Atti del Corso Gli aspetti biologici nella corrosione delle reti di distribuzione di acqua potabile*. Reggio Emilia; 1994: p. 69-88.

# **VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE A MICRORGANISMI AERODISPERSI E COMPOSTI VOLATILI NELLA FILTROPRESSATURA DEI FANGHI BIOLOGICI DI DEPURAZIONE DELLE ACQUE REFLUE URBANE**

Stefano Basilico (a), Gabri Brambilla (b), Antonio Colombi (b)

(a) *Dipartimento di Medicina del Lavoro, Az. Ospedaliera "Istituti Clinici di Perfezionamento", Milano*

(b) *Dipartimento di Medicina del lavoro-Polo Ospedale "S. Paolo", Clinica del Lavoro "Luigi Devoto", Università degli Studi di Milano*

## **Introduzione**

Nel più ampio novero delle questioni legate alle operazioni di trattamento e smaltimento dei rifiuti, un capitolo a parte è rappresentato dalle acque reflue. Risulta, infatti, evidente come l'acqua, pur non essendo in quanto tale classificabile nella categoria dei materiali di risulta, vi possa essere annoverata nel momento in cui abbia subito inquinamento chimico o contaminazione biologica che ne rendano necessario un trattamento di igienizzazione in vista di un suo successivo riutilizzo o reimmissione nell'ambiente.

Le problematiche sanitarie connesse con il funzionamento e la gestione delle strutture fognarie e degli impianti di depurazione delle acque reflue degli agglomerati urbani rientrano storicamente in un'ottica di igiene e sanità pubblica. In epoche passate, le preoccupazioni risultavano principalmente riferite al pericolo di contaminazione ambientale da parte degli inquinanti chimici e biologici presenti negli scarichi fognari, e ai conseguenti rischi per la popolazione generale. Tuttavia il progressivo aumento dei volumi di scarichi fognari e acque reflue da trattare, unitamente alla necessità di ulteriore trattamento e smaltimento dei fanghi biologici di risulta, ha determinato nel corso degli ultimi decenni un aumento delle strutture impiantistiche presenti sul territorio, accompagnato da un progressivo ampliamento della popolazione lavorativa addetta nel settore. Quale conseguenza, risulta parimenti aumentata la rilevanza e attualità delle problematiche di medicina professionale e di igiene e sicurezza del lavoro in questo comparto.

Nell'ambito della gestione dei corsi d'acqua e delle strutture che costituiscono il complesso delle reti fognarie (canali nel sottosuolo, impianti di depurazione, sistemi di chiuse e griglie), i fattori di rischio presenti possono essere classificati, in base alla loro origine, in: chimici, fisici, biologici.

I rischi di natura chimica sono legati alla possibile presenza di contaminanti sia organici che inorganici, quali per esempio metalli, pesticidi e solventi; essi costituiscono di norma eventi accidentali, dovuti a fenomeni estemporanei di inquinamento massivo dei reflui, per esempio da sversamenti dolosi o conseguentemente ad infiltrazione nel terreno quale conseguenza di scorretto smaltimento di rifiuti tossici e nocivi, oppure legati alla fermentazione di materiale organico in condizione di carenza di ossigeno, con conseguente formazione di acido solfidrico (H<sub>2</sub>S).

I rischi di natura fisica sono principalmente connessi con l'esposizione a microclima sfavorevole oppure a sorgenti di rumore, quali pompe o sistemi di sollevamento. I rischi di natura biologica sono da porre in relazione alla presenza in esse di una popolazione di microrganismi variamente rappresentati (batteri, virus, protozoi, ed elminti) e con caratteristiche infettive, allergogene e tossinogeniche rilevanti.

Mentre i rischi di natura fisica e chimica si connotano quali rischi aspecifici, comuni cioè anche ad altre realtà lavorative, i rischi di natura biologica rappresentano, invece, una peculiarità costante delle acque reflue. Inoltre, se per esempio per i rischi di natura chimica esistono conoscenze sufficientemente consolidate per la stima della loro rilevanza e conseguentemente per la messa in atto di misure idonee alla realizzazione di interventi di tipo preventivo, la qualificazione e quantificazione dei rischi conseguenti all'esposizione ad agenti biologici presenta ancora numerose carenze conoscitive. La necessità di un corretto approccio per la valutazione e gestione dei rischi biologici legati al trattamento delle acque reflue urbane e allo smaltimento dei fanghi di depurazione ha trovato un preciso riscontro nella promulgazione a livello nazionale dei più recenti dettati normativi in tema di tutela della salute in ambito professionale, a recepimento di Direttive dell'Unione Europea; proprio nel DL.vo 626/1994 e DL.vo 242/1996 (titolo VIII "Protezione da agenti biologici"), infatti, in Allegato IX le attività negli impianti per la depurazione delle acque di scarico sono espressamente citate a titolo esemplificativo nel novero delle attività comportanti una potenziale esposizione ad agenti biologici.

A titolo di esempio, in Tabella 1 sono riportati una serie di agenti biologici (isolati in diverse indagini attuate in ambito nazionale e internazionale in acque reflue urbane provenienti da differenti aree geografiche) classificati secondo i criteri di pericolosità riportati nel DL.vo 626/1994 e nel DL.vo 242/1996, e successivamente integrati dal Decreto del Ministero del Lavoro del 12 novembre 1999. Come si evince da quanto riportato in tabella, tali microrganismi risultano prevalentemente compresi in classe 2 di pericolosità ai sensi della medesima normativa: tra essi possono distinguersi batteri e loro forme sporigene, virus, protozoi ed elminti; la maggior parte di essi sono di provenienza fecale umana ma alcuni possono essere presenti nelle urine o nelle feci di animali infetti, ad esempio i ratti residenti nelle reti fognarie urbane.

**Tabella 1. Esempio di classificazione di agenti biologici, isolati in diverse indagini in ambito nazionale e internazionale in acque reflue urbane provenienti da differenti aree geografiche, secondo i criteri di pericolosità sanciti dalla vigente normativa**

Agenti biologici	Specie	Classe	Note
Batteri	<i>Clostridium tetani</i>	2	T, V
	<i>Escherichia coli</i>	2	
	<i>Klebsiella</i> spp.	2	
	<i>Streptococcus</i> spp.	2	V
	<i>S. typhi</i>	3 (*)	V
	<i>S. paratyphi</i> A,B,C	2	V
	<i>Shigella dysenteriae</i> (Tipo 1)	3 (*)	T
	<i>Vibrio</i> spp.	2	
Virus	Coxsackievirus	2	
	Echovirus	2	
	Poliovirus	2	V
	Reovirus	2	
	Rotavirus	2	
	Cytomegalovirus	2	
Protozoi	<i>Entamoeba histolytica</i>	2	
	<i>Giardia lamblia</i>	2	
	<i>Toxoplasma</i>	2	
Nematodi	<i>Ascaris suum</i>	2	A
	<i>Toxocara canis</i>	2	
Cestodi	<i>Taenia saginata</i>	2	

A: possibili effetti allergici; T: produzione di tossina; V: disponibile vaccino profilassi efficace.

(\*): limitato rischio di infezione in quanto normalmente non veicolato dall'aria

Per ciò che attiene all'esposizione ad agenti biologici in ambito professionale, rimane non correttamente risolto il quesito circa l'entità dei rischi per la salute legati all'espletamento di mansioni correlate alla depurazione delle acque reflue urbane, in relazione sia alle diverse fasi di lavorazione (per esempio pompaggio, sollevamento, grigliatura, ossidazione delle acque di risulta) sia alle diverse tecnologie utilizzate (per esempio, l'aerazione delle vasche di ossidazione può essere a turbine, a candele sommerse, oppure a diffusori sommersi).

Oggetto dell'indagine di cui si riferisce nella presente nota è la valutazione dei rischi per la salute nei lavoratori addetti alle operazioni di filtropressatura dei fanghi biologici negli impianti di depurazione delle acque reflue urbane, attuata mediante una campagna di monitoraggio ambientale dell'esposizione a contaminanti chimici e microbiologici. Viene di seguito riassunto il complesso delle evidenze ottenute nell'indagine, unitamente alle indicazioni operative volte al miglioramento delle condizioni di igiene e sicurezza del lavoro e alle raccomandazioni per la tutela della salute degli operatori addetti.

## Materiali e metodi

L'indagine ambientale di cui si riferisce nella presente nota è stata attuata nella stazione di filtropressatura dei fanghi di un impianto di depurazione delle acque reflue urbane, ubicato nella provincia di Milano, della capacità nominale di 300.000 ab/eq. La stazione di filtropressatura è situata in un capannone, delle dimensioni di circa 30 x 17,5 m e con un'altezza interna di circa 7 m (per un volume nell'ordine di 3700 m<sup>3</sup>) è ventilato "per spostamento", con una rete di adduzione di aria esterna situata lungo uno dei lati maggiori, e una di aspirazione lungo quello parallelo; un ulteriore ricambio d'aria è fornito dalla circolazione naturale attraverso le numerose ampie aperture, permanenti o chiudibili con serramenti non a tenuta d'aria, presenti nelle quattro pareti perimetrali.

In estrema sintesi, il trattamento dei reflui si articola in "ciclo dei liquami" e "ciclo dei fanghi"; quest'ultimo, che ha una durata nell'ordine dei 40 giorni, prevede che il fango, liquido denso che proviene dalle fasi di sedimentazione e che contiene il 2-3% di sostanza secca (20% di sostanze chimiche, 80% sostanze chimiche putrescibili), sia avviato all'ispessimento (fino al raggiungimento di quote in sostanza secca nell'ordine del 4-5%) e successivamente al trattamento di digestione anaerobia. Il fango in uscita dai digestori subisce un trattamento di condizionamento chimico, a base di calce e cloruro ferrico, e quindi filtropressato. La filtropressa separa le acque residue dal fango, producendo "pannelli" di fango che contengono sostanza secca fino al 50% e acqua che viene riavviata al trattamento. I "pannelli", una volta asportati dai rispettivi filtri sono stoccati temporaneamente all'interno dell'impianto, e successivamente avviati a smaltimento mediante conferimento in discarica controllata di II categoria.

L'indagine si è articolata mediante l'attuazione di due distinte fasi di misurazioni ambientali, concernenti rispettivamente la campagna di monitoraggio ambientale dell'esposizione ad agenti chimici [ammoniaca (NH<sub>3</sub>) e idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S)] e la valutazione della contaminazione microbiologica aerodispersa. Le rilevazioni ambientali sono state precedute da sopralluoghi conoscitivi delle varie strutture dell'impianto e da colloqui-intervista con il personale addetto.

## Agenti chimici

Sono state complessivamente eseguite 6 determinazioni delle concentrazioni ambientali di NH<sub>3</sub> (4 con campionatori statici posti a circa 1,5 m dal suolo, e 2 con campionatori personali

indossati dai lavoratori addetti): nei prelievi in postazione fissa, la determinazione della concentrazione avviene per gorgogliamento attraverso 2 gorgogliatori a setto porosi posti in serie, contenenti acido solforico diluito quale liquido di assorbimento; nei prelievi con campionatori personali, il gorgogliamento avviene attraverso un gorgogliatore a setto poroso. La determinazione quantitativa dei livelli ambientali è eseguita mediante analisi con reattivo di Nessler, con il quale la  $\text{NH}_3$  reagisce formando un complesso misurabile colorimetricamente.

Sono stati eseguiti n. 4 prelievi per la determinazione dei livelli atmosferici di  $\text{H}_2\text{S}$ , mediante l'utilizzo di fiale reattive a lettura immediata.

I punti di campionamento per  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{S}$ , unitamente ad una legenda esplicativa, sono indicati rispettivamente in Tabelle 2 e 3, dove sono riportati i livelli di concentrazione osservati.

## Agenti biologici

Il monitoraggio ambientale della contaminazione microbiologica aerodispersa è avvenuta in 10 punti del capannone che ospita la stazione di filtropressatura dei fanghi, opportunamente selezionati nel corso del sopralluogo preliminare, in relazione alle presunte sorgenti di diffusione ambientale degli aerosol; i punti in cui è stato eseguito il campionamento sono indicati con numerazione progressiva, unitamente ad una legenda esplicativa, in Tabella 4, dove sono riportati i livelli di contaminazione osservati.

La misura quali-quantitativa della diffusione degli aerosol batterici nell'aria presenta una serie di limitazioni tecniche legate alla scelta delle metodiche da impiegare per il campionamento e per l'identificazione delle diverse specie microbiche aerodisperse. Nel presente studio per il campionamento è stato utilizzato lo strumento *Surface Air System*, in grado di veicolare volumi di aria noti sulla superficie di piastre Petri contenenti terreno selettivo per la coltura delle diverse specie batteriche (SAS della Ditta P.B.I. di Milano) e operante per tempi di aspirazione di 60", con un volume di raccolta di 180 L di aria. Per ogni prelievo eseguito nei diversi punti si è monitorata la presenza di 5 diverse tipologie batteriche mediante l'uso di 4 differenti terreni di coltura; i campionamenti sono stati effettuati con apparecchiatura mantenuta ad un'altezza di circa 1,5 metri, con campionatore rivolto in direzione della sorgente di disseminazione degli aerosol batterici.

Le piastre utilizzate per ogni campionamento contenevano i seguenti terreni di coltura:

- a) *Plate Count Agar* (Difco) per la valutazione della conta microbica aerodispersa totale (Carica Batterica Totale, CBT) incubazione a 30 °C per 48 ore;
- b) *Gram negative PMK Agar* (Biolife) per la conta di Gram Negativi Totali (GNT), incubazione a 30 °C per 48 ore;
- c) *Violet red bile Agar* (Biolife) per la conta di Coliformi Totali (CT) e Fecali (CF), incubazione rispettivamente a 37 °C e 44 °C per 48 ore;
- d) *m-Enterococcus Agar* (Difco) per la conta degli Streptococchi Fecali (SF), incubazione a 37 °C per 48 ore.

## Risultati

I risultati dei rilievi ambientali effettuati sono riportati nella Tabella 2 (ammoniaca), Tabella 3 (idrogeno solforato) e Tabella 4 (agenti biologici). Come precedentemente accennato, per ogni campagna di monitoraggio è riportata in sinossi ai risultati l'indicazione dei punti di campionamento prescelti per il monitoraggio, unitamente ad una legenda esplicativa.

Le concentrazioni di idrogeno solforato, in tutti i punti oggetto del monitoraggio, sono risultate inferiori al limite di rilevabilità della metodica utilizzata (1 ppm). Per ciò che attiene all'ammoniaca, durante la filtrazione ordinaria i livelli misurati nella stazione di filtropressatura sono risultati compresi nell'intervallo 0,76-1,19 mg/m<sup>3</sup>. Durante l'apertura e la pulizia dei filtri, il monitoraggio, effettuato con campionatori personali indossati dagli addetti, ha misurato concentrazioni più elevate, pari a 2,09 e 2,61 mg/m<sup>3</sup>.

Per la valutazione delle condizioni igienico-ambientali legate all'esposizione ai due composti in oggetto, si è fatto riferimento ai valori TLV-TWA (*Threshold Limit Value-Time Weighted Average*, valore limite di soglia-media ponderata nel tempo) e TLV-STEL (*Threshold Limit Value-Short Time Exposure*, valore limite di soglia-limite per breve tempo di esposizione) proposti dalla ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) per l'anno 2002, e adottati dalla Associazione Italiana degli Igienisti Industriali (1).

Come si evince dall'analisi dei prospetti sinottici riportati nelle Tabelle 2 e 3, in tutti i punti di campionamento il monitoraggio ha evidenziato livelli ambientali largamente inferiori ai valori limite proposti a livello internazionale per la tutela della salute dei soggetti esposti in ambito professionale. Sia detto per inciso, l'approccio consolidato per la valutazione del rischio da agenti chimici mediante il confronto tra le concentrazioni ambientali rilevate e i rispettivi valori limite di esposizione appare funzionale anche al rispetto degli adempimenti previsti dalla vigente normativa in tema di igiene e sicurezza sul lavoro, fino al più recente DL.vo 25/2002.

**Tabella 2. Concentrazioni ambientali di ammoniaca all'interno di una stazione di filtropressatura dei fanghi biologici di depurazione**

Punto di prelievo	Durata prelievo (in minuti)	Concentrazione (in mg/m <sup>3</sup> )	TLV-TWA	TLV-STEL
1. Campionatore statico sopra il mixer	90	0,76		
2. Campionatore statico su passerella tra 2 filtropresse	82	0,82		
3. Campionatore statico presso pompe caricamento fanghi	90	0,78	17 mg/m <sup>3</sup>	24 mg/m <sup>3</sup>
4. Campionatore statico presso pompe caricamento fanghi al mixer	90	1,19	25 ppm	35 ppm
5. Campionatore personale, durante le operazioni di pulizia dei pannelli della filtropressa	35	2,61		
6. Campionatore personale, durante le operazioni di pulizia dei pannelli della filtropressa	35	2,09		

**TLV-TWA** (*Threshold Limit Value-Time Weighted Average*, valore limite di soglia-media ponderata nel tempo): concentrazione media ponderata nel tempo, su una giornata lavorativa convenzionale di 8 ore e su 40 ore lavorative settimanali, alla quale si ritiene che quasi tutti i lavoratori possano essere ripetutamente esposti, giorno dopo giorno, senza effetti negativi.

**TLV-STEL** (*Threshold Limit Value-Short Time Exposure Limit*, valore limite di soglia-limite per breve tempo di esposizione): concentrazione ambientale media ponderata su un periodo di 15 minuti, che non deve essere mai superata nella giornata lavorativa, anche se la media ponderata su 8 ore è inferiore al TLV. Esposizioni al valore STEL non devono protrarsi oltre 15 minuti e non devono ripetersi più di 4 volte al giorno. Fra esposizioni successive al valore STEL devono intercorrere almeno 60 minuti.

**Tabella 3. Concentrazioni ambientali di idrogeno solforato all'interno e all'esterno di una stazione di filtropressatura dei fanghi biologici di depurazione**

Punto di prelievo	Tipo di prelievo	Concentrazione (ppm)	TLV-TWA	TLV-STEL
1. Passerella tra 2 filtropresse		< 1 <sup>§</sup>		
2. Esterno, presso le vasche di sedimentazione	istantaneo	< 1	14 mg/m <sup>3</sup>	21 mg/m <sup>3</sup>
3. Sopra il mixer		< 1	10 ppm	15 ppm
4. Presso digestore e ispessitore		< 1		

**TLV-TWA** (*Threshold Limit Value-Time Weighted Average*, valore limite di soglia-media ponderata nel tempo): concentrazione media ponderata nel tempo, su una giornata lavorativa convenzionale di 8 ore e su 40 ore lavorative settimanali, alla quale si ritiene che quasi tutti i lavoratori possano essere ripetutamente esposti, giorno dopo giorno, senza effetti negativi.

**TLV-STEL** (*Threshold Limit Value-Short Time Exposure Limit*, valore limite di soglia-limite per breve tempo di esposizione): concentrazione ambientale media ponderata su un periodo di 15 minuti, che non deve essere mai superata nella giornata lavorativa, anche se la media ponderata su 8 ore è inferiore al TLV. Esposizioni al valore STEL non devono protrarsi oltre 15 minuti, e non devono ripetersi più di 4 volte al giorno. Fra esposizioni successive al valore STEL, devono intercorrere almeno 60 minuti.

§: il valore di concentrazione di 1 ppm rappresenta il limite di rilevabilità del metodo

Nella sinossi riportata in Tabella 4, sono riportati i valori di carica batterica aerodispersa riferiti ad ogni singola specie microbica rilevata per i diversi punti di prelievo, con valori di contaminazione espressi come unità formanti colonia (UFC)/m<sup>3</sup>. Come era prevedibile, i valori ottenuti al punto di prelievo n. 1 (all'interno della sala controllo che è isolata dal resto della stazione ed è relativamente distante dalle sorgenti di disseminazione degli aerosol batterici) sono risultati essere i più bassi tra quelli registrati nella presente indagine. I valori più elevati si sono registrati in corrispondenza dei punti di prelievo n. 6, 7, 8, 10: sembra opportuno precisare, a tale proposito, che oltre ad essere stato eseguiti nelle immediate vicinanze delle filtropresse, i campionamenti in questione sono stati effettuati durante le operazioni di apertura dei filtri stessi, e conseguente caduta dei blocchi di fango sul nastro trasportatore sottostante mediante il quale sono veicolati ai cassoni di stoccaggio temporaneo posti all'esterno della stazione di filtropressatura.

**Tabella 4. Valori di contaminazione batterica aerodispersa all'interno della stazione di filtropressatura dei fanghi biologici di depurazione (valori espressi in UFC/m<sup>3</sup>)**

Punto di prelievo	CBT	GNT	CT	CF	SF
1. Sala controllo	240	6	< 6 <sup>§</sup>	< 6	22
2. Di fronte al miscelatore dei fanghi (mixer)	660	6	< 6	< 6	72
3. Sopra il mixer	1200	6	< 6	< 6	16
4. Tra le filtropresse	870	12	< 6	< 6	< 6
5. Tra le filtropresse	906	24	< 6	< 6	< 6
6. Tra le filtropresse	1026	12	< 6	< 6	16
7. Tra le filtropresse	1806	108	12	< 6	16
8. Vicino all'ingresso	1146	16	< 6	< 6	33
9. Tra le filtropresse	858	60	< 6	< 6	< 6
10. Tra le filtropresse e il mixer	1344	78	12	< 6	154

**UFC:** unità formanti colonia

§: il valore di concentrazione di 6 UFC/m<sup>3</sup> rappresenta il limite di rilevabilità del metodo

**CBT:** carica batterica totale; **GNT:** Gram negativi totali; **CT:** coliformi totali; **CF:** coliformi fecali; **SF:** streptococchi fecali.

In termini assoluti, i dati riportati in tabella indicano un grado di contaminazione complessivamente modesto. Va sottolineato che le cariche microbiologiche aerodisperse misurate nella presente indagine all'interno della stazione di filtropressatura dei fanghi sono risultate confrontabili a quelle misurate in precedenti analoghe indagini sia svolte dagli Autori che segnalate a più riprese nella letteratura scientifica internazionale (1-11). La filtro-pressatura dei fanghi, proprio per la sua dinamica operativa, rappresenta una delle operazioni maggiormente implicate nella disseminazione di aerosol contaminati da batteri: nel caso specifico, sembra inoltre ragionevole ipotizzare che il livello di contaminazione batterica risulti più elevato rispetto agli altri punti in quanto le operazioni si svolgono in ambito confinato. Le evidenze riportate confermano quanto riportato in letteratura circa il ruolo svolto dall'azione di organi meccanici in movimento e dalla formazione di spruzzi in occasione di vortici e salti di livello nei condotti nella formazione degli aerosol contaminati da agenti biologici.

Nel complesso, la contaminazione microbiologica aerodispersa valutata è risultata di ordine limitato, e comunque non tale da pregiudicare l'igienicità e la salubrità degli ambienti di lavoro indagati, o da costituire una condizione di pericolo immediato per la salute degli operatori potenzialmente esposti.

## Commento e conclusioni

Da un'analisi globale dei dati ottenuti si possono trarre alcune considerazioni di carattere generale, che vengono di seguito esposte. In analogia a quanto riportato nella letteratura scientifica, le evidenze emerse nella presente indagine confermano che gli impianti di depurazione delle acque reflue rappresentano una sorgente di aerosol batterici, e che nello specifico le operazioni di filtro-pressatura dei fanghi (che avvengono in ambito confinato) rappresentano una delle principali fonti di formazione e diffusione degli stessi aerosol, e possono inoltre comportare una potenziale esposizione ad ammoniaca e idrogeno, composti chimici dalle note proprietà lesive.

Dall'analisi dei valori riscontrati nella presente indagine, si riscontra che le concentrazioni di ammoniaca e di idrogeno solforato rientrano nei valori limite di esposizione proposti per la tutela della salute in ambito professionale. Non si esclude tuttavia che tali concentrazioni, in considerazione della concomitante presenza di sostanze maleodoranti, possano costituire una condizione di molestia per gli occupanti del locale che richieda interventi di miglioramento della qualità dell'aria ambientale.

Per ciò che attiene alla contaminazione microbiologica aerodispersa, le evidenze emerse nella presente indagine confermano che gli impianti di depurazione delle acque reflue rappresentano una sorgente di aerosol batterici, e che le operazioni di filtro-pressatura dei fanghi (che avvengono in ambito confinato) rappresentano una delle principali fonti di formazione e diffusione degli stessi aerosol. È stata riscontrata una certa variabilità nelle misure di CBT nei diversi punti di prelievo, in un intervallo compreso tra 200 e 1800 unità formanti colonia (UFC)/m<sup>3</sup>, così come variabile è risultata la concentrazione delle singole specie batteriche considerate. Le cariche microbiologiche aerodisperse misurate nella presente indagine all'interno della stazione di filtropressatura dei fanghi sono risultate confrontabili a quelle riportate nella letteratura scientifica per analoghi insediamenti lavorativi; nel complesso, la contaminazione microbiologica aerodispersa valutata è risultata di ordine limitato, e comunque non tale da pregiudicare l'igienicità e la salubrità degli ambienti di lavoro indagati, o da costituire una condizione di pericolo immediato per la salute degli operatori potenzialmente esposti. Va tuttavia rimarcato come una più marcata disseminazione di aerosol batterici sia avvenuta in concomitanza di particolari operazioni lavorative, quali l'apertura dei filtri.

In conclusione, il complesso delle evidenze soprariportate suggerisce che, ai fini preventivi, sia raccomandabile ai lavoratori addetti lo scrupoloso utilizzo dei presidi di protezione personale (mascherina naso-bocca e occhiali protettivi) durante le operazioni di apertura dei filtri, allo scopo di evitare, o comunque drasticamente ridurre, l'esposizione oculare accidentale e respiratoria tanto nei confronti degli agenti biologici quanto di agenti chimici, quali l'ammoniaca e l'idrogeno solforato (di cui sono note le proprietà rispettivamente irritanti e tossiche). Ugualmente, si precisa che la medesima raccomandazione va estesa a tutti i compiti lavorativi che prevedano un diretto accesso dei lavoratori ai dispositivi meccanici nella manutenzione degli impianti.

## Bibliografia

1. Associazione Italiana degli Igienisti Industriali (AIDII). Valori limite di soglia. Indici biologici di esposizione. ACGIH 2002. *Giornale degli Igienisti Industriali* 2003;28(1)Suppl.:1-190.
2. Basilico S, Giubileo L, Colombi A, Foà V. Valutazione dei rischi per la salute negli addetti agli impianti fognari municipali: l'esposizione ad agenti biologici. In: SIMLII (Ed.). *Atti del 55° Congresso della Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale*. Torino, 30 settembre-3 ottobre 1992. Bologna: Editore Monduzzi; 1992. p. 1779-86.
3. Block JC, Havelaar AH, L'Hermite P. *Epidemiological studies of risk associated with the agricultural use of sewage sludge: knowledge and needs*. CEC, Commission of The European Communities. Brussels and Luxembourg: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
4. Clark CS. Potential and actual biological related health risks of wastewater industry employment. *J Water Poll Cont Fed* 1987;52(12):999.
5. Colombi A, Basilico S. Gli impianti di depurazione di liquami e sicurezza dei lavoratori. In: Aulicino FA, Volterra L (Ed.). *Liquami di origine domestica: rischio sanitario e metodologie analitiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/17). p. 60-9.
6. Colombi A, Basilico S, Giubileo L. Dispersione ambientale di aerosol batterici negli impianti di trattamento delle acque reflue urbane. *Biol Ital* 1991;21(10):39-40.
7. Colombi A, Giubileo L, Basilico S, Foà V. Valutazione dei rischi per la salute negli addetti agli impianti di depurazione delle acque reflue urbane: l'esposizione ad aerosol contaminati da batteri. In: SIMLII (Ed.). *Atti del 56° Congresso della Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale*. Venezia 20-23 ottobre 1993. Padova: Servizi Grafici Editoriali; 1993. p. 717-20.
8. Fannin KF, Vana SC, Jakubowsky W. Effect of an activated sludge wastewater treatment plant on ambient air densities of aerosols containing bacteria and viruses. *Appl Environ Microbiol* 1985;49(5):1191-6.
9. Garzaroli L, Marossi L, Basilico S, Colombi A. Indagine sulla formazione di aerosol batterici in impianti per il trattamento delle acque reflue. *Acqua e Aria* 1995;8:843-9.
10. Nielsen VC, Voorburg JH, L'Hermite P. *Volatile emissions from livestock farming and sewage operations*. CEC, Commission of The European Communities. Brussels and Luxembourg: Elsevier Applied Science Publishers, 1988.
11. Sekla L, Gemmil D, Manfreda J, Lysyk M, Stackiw W, Kay C, Hopper C, Vanbuckenhout L, Eibish RT. Sewage treatment plant workers and their environment: a health study. In: Pahren H, Jakubowsky W (Ed.). *Proceedings of the Symposium Wastewater Aerosols and Disease, September 19-21, 1979*. Cincinnati OH 45268. United States Environmental Protection Agency, EPA-600/9-80-028.

# ALCUNI CRITERI PER LA VALUTAZIONE DEI PUNTI CRITICI DEGLI ACQUIFERI IN AMBIENTE DOLOMITICO

Fabio Decet

Dipartimento Provinciale di Belluno, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Veneta, Belluno

## Introduzione

Come è possibile garantire acqua di buona qualità per tempi lunghi? Una risposta sembra provenire dalla gestione integrale dei bacini idrologici (1-3). Essa richiede sia il supporto di conoscenze scientifiche (geologiche, idrologiche, analitiche, pedologiche) sia capacità gestionali poiché è necessario il coinvolgimento delle amministrazioni pubbliche e di chi opera e vive sul bacino. Lo scopo è di superare il problema fondamentale delle istituzioni di servizio il quale sembra consistere, più che negli alti costi o nella scarsa efficienza, nella mancanza di efficacia (4). Per quanto riguarda le conoscenze tecnico-scientifiche destinate a fare da supporto alla gestione, in letteratura sono riportate numerose indicazioni riguardo i criteri da adottare per prevenire gli inquinamenti (5). Esse sono basate in genere su valutazioni *a priori* (ad esempio, date certe caratteristiche idrogeologiche dell'acquifero se ne deduce la velocità e direzione dei flussi nello stesso). In questo lavoro gli acquiferi sono considerati, invece, alla stregua di un processo produttivo per il quale sia possibile individuare i punti critici principali; per ciascuno di questi ultimi sono stati individuati degli obiettivi di qualità verificabili, a loro volta, in base a criteri di natura essenzialmente idrogeochimica. In altre parole si cercherà di ricostruire *a posteriori* la storia dell'acqua.

In queste note sono stati considerati come "piccoli acquiferi" quelli con portata inferiore a 10 L/s. Entro tale categoria rientrano la gran parte delle circa 300 sorgenti utilizzate a scopo potabile in Provincia di Belluno.

## Individuazione dei punti critici e obiettivi di qualità

Il ciclo idrologico nelle sue fasi principali viene in genere distinto in: precipitazione atmosferica, infiltrazione, percolazione, accumulo, emergenza.

Si tratta evidentemente di uno schema ultrasemplificato, del quale Black (1) e Baumgartner (6) hanno bene illustrato i luoghi comuni e le trappole. Ne consegue che l'individuazione sul campo delle singole fasi e, ancor di più, il loro controllo non è sempre agevole o possibile. Tuttavia questa schematizzazione offre un criterio operativo per aggredire analiticamente il problema della gestione del bacino idrologico. Su una base empirica, ma sulla scorta di una tradizione antica (si confronti ad esempio Roster) (7, 8) il bacino idrologico è stato suddiviso in tre zone che sono state assunte quali "punti critici":

- a) *zona di infiltrazione* (comprendente la zona di intercettazione costituita dalla vegetazione, il suolo e la zona di infiltrazione);
- b) *zona di accumulo e trasporto dell'acqua* (sono considerate sia le rocce che i terreni di natura granulare che possano fungere da serbatoio);
- c) *zona di emergenza* (indicando con questo termine le opere di presa della sorgente).

Sono stati individuati gli obiettivi di qualità seguenti:

- *Per la zona di infiltrazione*
  - a) individuare apporti da parte del suolo;
  - b) individuare apporti di natura antropica.
- *Per la zona di accumulo e trasporto dell'acqua*
  - c) individuare gli apporti di natura geologica;
  - d) valutare i fattori che controllano la composizione chimica dell'acqua.
- *Per la zona di emergenza:*
  - e) valutare la presenza di flussi preferenziali nell'acquifero che consentano l'eventuale rapido arrivo di contaminanti in sorgente;
  - f) valutare il tempo minimo di arrivo alla sorgente dei flussi preferenziali eventualmente presenti nell'acquifero.

Per il raggiungimento degli obiettivi di qualità sono stati individuati dei criteri di verifica i quali saranno esaminati in dettaglio nel seguito. A questa fase di scomposizione dei fattori è necessario far seguire una sintesi che consenta una visione unitaria delle informazioni disponibili. La necessità di quest'ultima fase diviene evidente se si considera, ad esempio, che la presenza di apporti di natura civile nella zona di infiltrazione non significa di per sé che questi ultimi pervengano alla scaturigine in tempi brevi, essendo decisivo il tempo di trasporto e la presenza di percorsi preferenziali.

## **Criteri di verifica per la zona di infiltrazione**

Alcuni criteri che, in base alla nostra esperienza, consentono di valutare la presenza di apporti antropici e di apporti da parte del suolo sono:

- uso di grafici del tipo pH-pCa;
- valutazione delle concentrazioni di specie chimiche indicatrici di apporti antropici.

È evidente che essi sono da considerare complementari sia ai numerosi criteri idrogeologici riportati in letteratura (come già accennato più sopra) sia alle ispezioni sul territorio. Queste ultime costituiscono un antico e ben consolidato principio, se è vero che già nelle relazioni sulle sorgenti minerali dell'Accademia delle Scienze Francese erano espressamente richieste (9) ma che non sembrano aver goduto nella pratica di molta considerazione, se S. Cannizzaro, sul finire del secolo scorso, non si stancava di raccomandarle (10). Sembra tuttavia opportuno far rilevare che, se l'ispezione permette di individuare eventuali fonti di pericolo (es. discariche, abitazioni, fognature etc.) e se la probabilità che queste ultime diventino una realtà può essere valutata in base alle carte di vulnerabilità del terreno e altri criteri idrogeologici (5), rimane tuttavia da provare in modo indipendente che l'acqua che sgorga alla sorgente provenga in realtà dalla zona di infiltrazione ipotizzata.

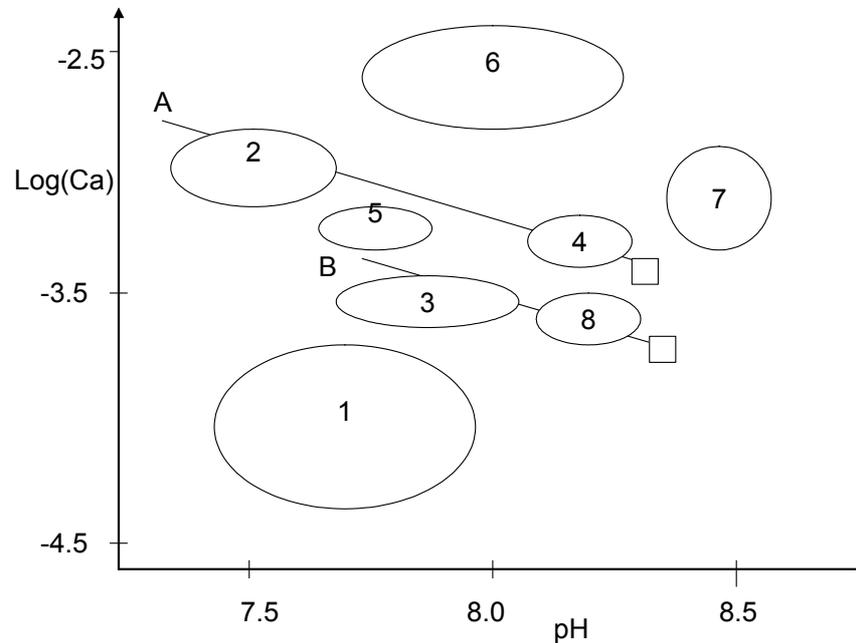
### **Uso di grafici del tipo pH-pCa**

Il diagramma pH/pCa illustrato in Figura 1 (11), una volta noto il pH e la concentrazione dello ione calcio dell'acqua sorgiva, permette di individuare:

- presenza di apporti da parte del suolo;
- provenienza da ambiti geologici diversi (ad esempio tra dolomie e calcari);
- situazione di insaturazione rispetto alla calcite e alla dolomia;

- situazione di insaturazione rispetto alla pressione parziale di anidride carbonica dell'atmosfera.

Inoltre, come illustrato in Figura 1, è possibile riferire differenti aree del grafico a situazioni ambientali diverse.



A e B= rette che rappresentano le condizioni di equilibrio, nel caso di ambiente aperto, per i sistemi calcite/acqua - CO<sub>2</sub> e dolomia/acqua -CO<sub>2</sub>, rispettivamente. I quadrati all'estremità di ciascuna retta indicano le condizioni di equilibrio quando pCO<sub>2</sub> è quella atmosferica (0,0035 atm).  
 1= condizioni di insaturazione rispetto alla calcite e dolomia e di sovrasaturazione rispetto alla CO<sub>2</sub> atmosferica.  
 2 e 3= condizioni di equilibrio con elevate pCO<sub>2</sub> derivanti dal suolo nel caso, rispettivamente, di calcite e dolomia.  
 4 e 8= condizioni di scarsi apporti di pCO<sub>2</sub> dal suolo;  
 5 e 6= condizioni di sovrasaturazione rispetto alla calcite e dolomia.  
 7=condizioni di equilibrio calcite (dolomia) acqua -CO<sub>2</sub> in ambiente chiuso.

**Figura 1. Alcune condizioni tipiche che possono essere individuate mediante un grafico pH/pCa**

### Valutazione delle concentrazioni di specie chimiche indicatrici di apporti antropici

Il criterio sperimentato da Hellmann e Schleyer (12) in Germania considera la distribuzione di una specie chimica indicatrice di apporti civili o industriali (in genere cloruro, solfato, nitrato, piombo, cromo, nichel) in un numero elevato di sorgenti di una data area. Nel caso siano presenti apporti antropici è possibile rilevare di norma una distribuzione binodale. In altre parole, accanto alla distribuzione gaussiana riferibile ai corpi idrici non contaminati è presente, più o meno addossata alla precedente, una “gobba” originata dagli apporti antropogenici. Gli autori citati propongono di adottare, quale criterio di separazione tra i due picchi, il valore del 95° percentile; concentrazioni superiori a questo valore si possono ritenere, con alta probabilità, effetto di contaminazioni. Questo criterio sembra confermato nel caso di 177 sorgenti della

Provincia di Belluno per una specie conservativa come il cloruro (13). La Figura 2 illustra come il 95° percentile, in questo caso, corrisponda a 2,0 mg Cl/L e discrimini alcune sorgenti per le quali sono da sospettare apporti di natura civile. Va ricordato che già Roster (7) affermava che “l’eccesso di cloro, quando non trovi altra causa di spiegazione, rappresenta una precedente contaminazione del suolo”.

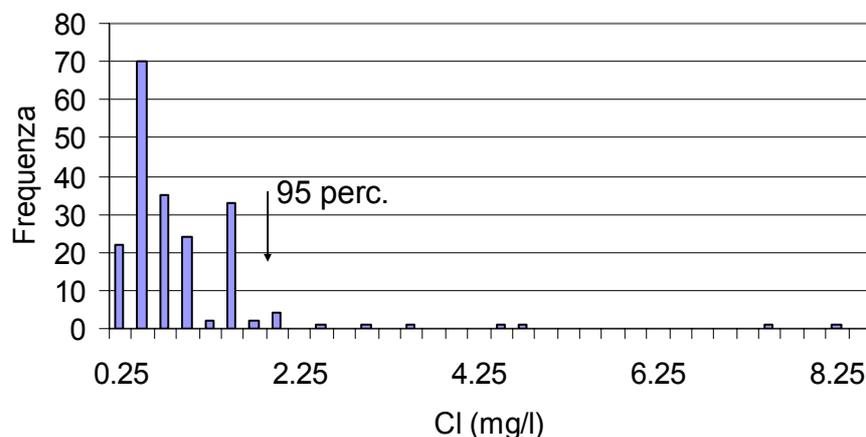


Figura 2. Distribuzione delle concentrazioni dei cloruri nel caso di 177 sorgenti della Provincia di Belluno (è indicata la concentrazione corrispondente al 95° percentile)

## Criteri di verifica per la zona di accumulo

In tale ambito si può ritenere che vengano definite le caratteristiche chimiche dell’acqua principalmente ad opera del substrato roccioso. Conoscere la natura di quest’ultimo è il primo passo per stimare le concentrazioni “naturali” degli elementi in tracce e principali e, quindi, di individuare eventuali casi di contaminazione.

Per risalire dalla composizione chimica dell’acqua alla formazione geologica di origine si possono considerare i criteri riportati nei parametri seguenti.

### Individuazione degli apporti di natura geologica

In relazione a questo criterio possono essere utilizzate diverse applicazioni, quali i rapporti tra ioni (es. Ca/Mg, Rb/Sr etc.), le tecniche di analisi statistica, gli indici di Scholler e i bilanci di massa. Può inoltre essere utilizzato il grafico pH/pCa illustrato nel paragrafo precedente.

#### Rapporti tra ioni

I rapporti tra ioni Ca/Mg consentono la differenziazione degli ambiti geologici a calcari da quelli a dolomie. La loro applicazione in generale è illustrata da Matthes *et al.* (14) e per l’ambito dolomitico da Decet (17). Fin dal 1937 Pfeilsticker (15) utilizzò il rapporto Ba/Sr per individuare lo strato geologico di provenienza di un’acqua. Recentemente il rapporto Rb/Sr è

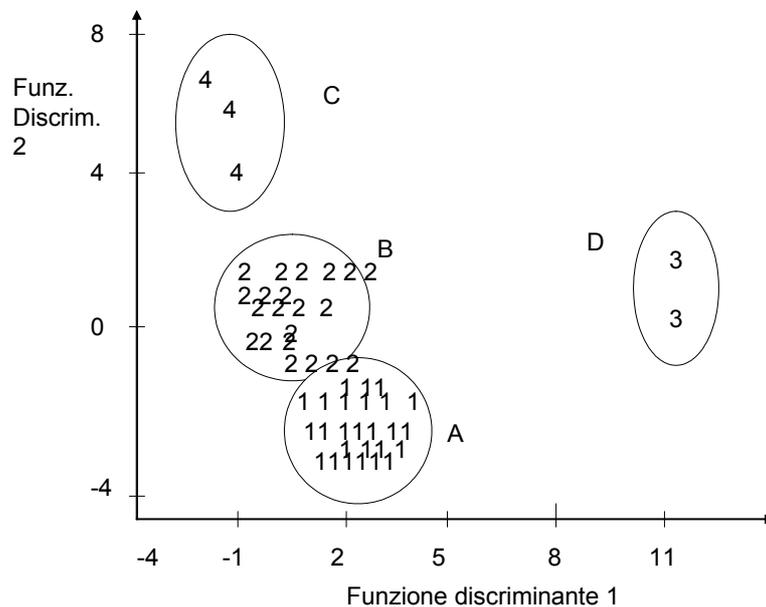
stato proposto (16) per individuare apporti di natura antropica. Nella Tabella 1 sono riportate le concentrazioni caratteristiche di alcune specie chimiche per gli ambiti geologici predominanti della Provincia di Belluno (17). Applicazioni per altri ambiti geologici sono date da Lahl e Lavanchy (18).

**Tabella 1. Valori medi di alcuni parametri chimici rilevati in sorgenti della provincia di Belluno in funzione dell'ambito geologico**

Ambito geologico	pH	Conducibilità (µS)	Rapporto in peso Ca/Mg	Na mg/L	K mg/L	Cl mg/L	Si mg/L	Sr µg/L	Ba mg/L
Dolomie	8,13	180	2,1	0,4	0,2	0,3	0,2	20	7
Calcari cretacei (Scaglia e Biancone)	7,94	253	25	0,6	0,3	0,8	1	100	80
Basamento cristallino (silicati)	7,61	140	2,7	0,6	0,6	0,8	2	-	5
Vulcaniti	8,08	215	5,3	10	0,4	0,7	6	-	4
Gessi	7,94	517	2,9	2,8	1	0,8	-	800	42

### Tecniche di analisi statistica

La Figura 3, che riporta l'analisi discriminante applicata a 40 sorgenti del Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi e relativa agli ioni Ca, Mg, Na, K, SO<sub>4</sub>, consente di identificare correttamente gli ambiti geologici degli acquiferi (rispettivamente calcari, dolomie vulcaniti e gessi).



**Figura 3. Risultato dell'analisi discriminante applicata a 41 sorgenti del Parco nazionale delle Dolomiti Bellunesi. Gli ambiti geologici identificati sono quelli a dolomie (A), calcari (B), gessi (C) e vulcaniti (D)**

### Indici di Scholler

Si rimanda al lavoro di Matthes (19) per i dettagli relativi agli indici consigliati per l'individuazione di reazioni di scambio ionico tra ioni sodio e magnesio che possono aver luogo negli acquiferi.

### Bilanci di massa

La Tabella 2 riporta i dati del bilancio di massa relativo alla sorgente Lasen e relativo all'anno 1992. In base ad esso è possibile evidenziare l'origine dei componenti chimici principali.

**Tabella 2. Bilancia di massa relativo alla sorgente Lasen (Belluno)**

Sostanza	Deflusso (kg/a) dalla sorgente	Afflusso (kg/a)			Differenza % defl./affl.	Origine
		dalle piogge	dalla deposizione secca	totale		
Cl	25	18,4	6,6	25	0	P
NO <sub>3</sub>	124	87	31	118	5	P,S
SO <sub>4</sub>	183	102	37	139	24	P,S,R
HCO <sub>3</sub>	8.618	121	43	164	98	R,S
Ca	2.170	53	19	72	97	R,S
Mg	372	5	2	7	98	R,S
Na	34	11	4	15	56	P,R
K	8,4	11	4	15	-79	P,S

La sigla P indica l'origine meteorica, S il suolo, R le rocce

### Valutazione dei fattori che controllano la composizione chimica delle acque

Si possono impiegare due criteri:

- e) Mediante un grafico del tipo di Figura 6.

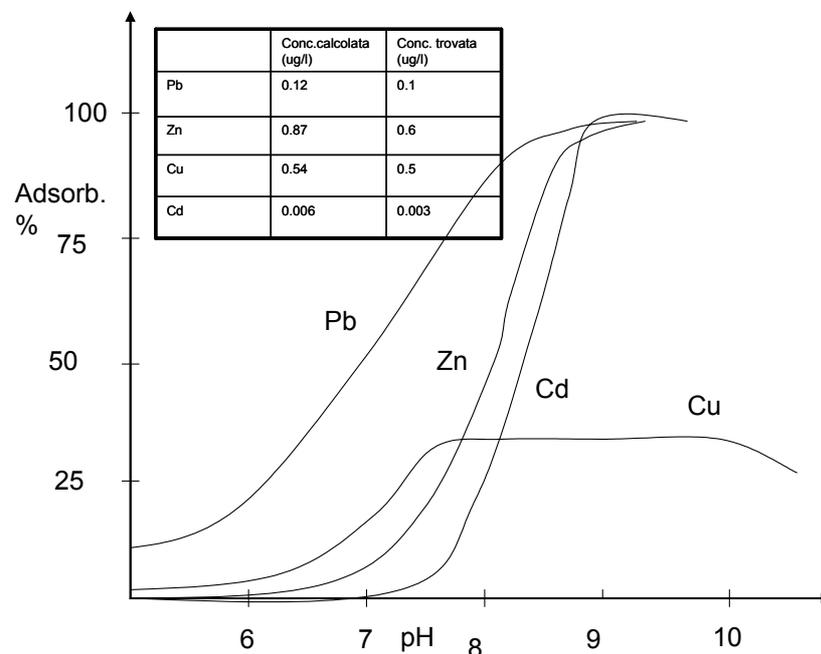
In esso sono riportati i logaritmi delle concentrazioni dei vari elementi rilevati nella roccia interessata e nell'acqua alla sorgente ed è possibile valutare empiricamente, con una incertezza inferiore a circa un ordine di grandezza, le concentrazioni massime rilevabili degli elementi in traccia per le acque naturali di un dato ambito;

- f) Mediante modellamento della composizione tramite programmi computerizzati.

Conoscere i motivi per i quali una data specie chimica si trova presente nell'acqua ad una definita concentrazione permette di valutare i valori "naturali" della stessa, di individuare quindi i casi di possibili contaminazioni e di prevedere le loro conseguenze. Sono attualmente disponibili parecchi programmi per personal computer i quali permettono di stimare agevolmente le concentrazioni dei metalli in una serie di situazioni che possono simulare quelle ambientali. Un esempio riguardo gli elementi in traccia illustrerà meglio l'utilità di questo approccio. Le concentrazioni dello ione piombo rilevate nelle acque naturali della Provincia di Belluno risultano comprese all'incirca nell'ambito 40-100 ngPb/L (20). Le concentrazioni massime attese in base alla composizione delle rocce calcaree dell'area esaminata, supponendo un coefficiente di distribuzione roccia/acqua pari ad uno, sono di circa 3000 ng Pb/L. È evidente allora che sono presenti dei

meccanismi di deplezione quali reazioni di precipitazione e adsorbimento. Le reazioni di precipitazione dei carbonati non sono in grado di spiegare le concentrazioni reali in quanto consentono solubilità dell'ordine di qualche centinaio di  $\mu\text{gPb/L}$ .

Se si ipotizza l'adsorbimento su idrossido di ferro, specie ubiquitaria negli acquiferi si ottengono concentrazioni di molto inferiori e pienamente compatibili con i valori rilevati (il calcolo è stato effettuato col programma MINEQL+plus (21) adottando il modello di Dzombak e Morel (22) il quale considera un triplo strato all'interfase acqua-solido e due forme di siti attivi sulla superficie dell'ossido; la concentrazione iniziale di Pb è stata supposta pari a  $3 \mu\text{g Pb}$ ). Adottando la concentrazione di idrossido di ferro ( $10^{-6} \text{ M}$ ) quale fase adsorbente anche nel caso di Cu, Cd, Zn (le concentrazioni iniziali dei quali sono state considerate pari a quelle massime ottenibili in base ad un rapporto di ripartizione acqua/calcare considerato come unitario e per una concentrazione finale di calcio di circa  $50 \text{ mg Ca/L}$ ) si ottengono valori assai vicini a quelli reali come si può verificare dall'esame della tabella inscritta in Figura 4 la quale riporta i dati medi determinati in 5 sorgenti dell'area bellunese.



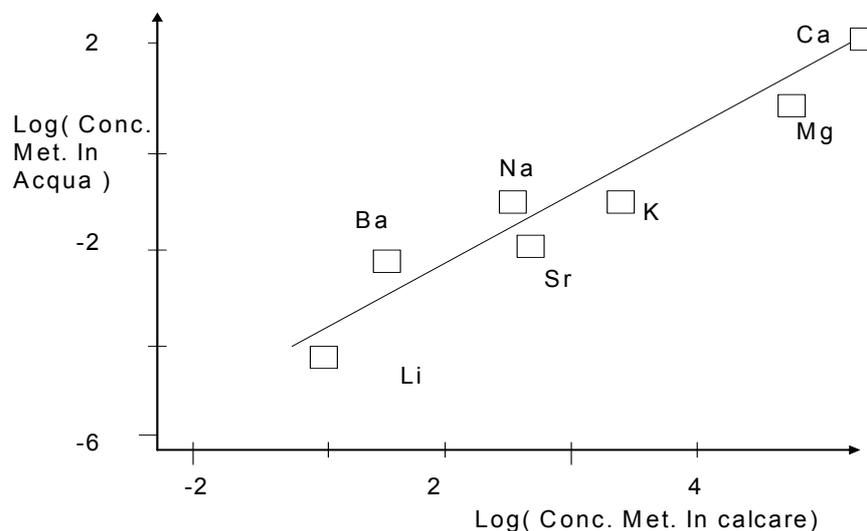
**Figura 4. Curve di adsorbimento di Pb, Cd, Cu, Zn in presenza di idrossido di ferro ( $10^{-6} \text{ M}$ )**  
[in tabella le concentrazioni calcolate dopo adsorbimento e quelle reali per la sorgente Orsera (BL)]

### Composizione delle acque in relazione a quella della roccia serbatoio

La Figura 5 è stata ricavata sulla base di un procedimento empirico. Grafici simili sono stati riportati in letteratura ma per ambienti oceanici (23). Il principio su cui è costruito si riduce sostanzialmente al calcolo del coefficiente di distribuzione  $K_d$  tra acqua e roccia per ciascuna specie chimica:  $K_d = \text{Conc (mg/L) in acqua} / \text{Conc (mg/kg) nella roccia}$ .

Per la costruzione della Figura 5 sono state utilizzate le concentrazioni degli elementi nei calcari riportate da Matthes (19); le concentrazioni di Ca, Mg, Sr, Ba e Li in acqua sono il

frutto di indagini effettuate nel Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi nel corso del 1994-1996 dall'autore. La correlazione tra i valori delle specie in roccia e quelle nelle acque è elevata ( $r=0,983$ ) e la pendenza ( $0,985$ ) non differisce significativamente da 1 con ciò indicando che per tali specie il valore del coefficiente di ripartizione acqua/roccia è praticamente unitario. La situazione non muta sostanzialmente se si considerano anche le concentrazioni di Na e K i quali tuttavia risultano provenire in buona parte dalle precipitazioni atmosferiche e risultano quindi arricchiti.

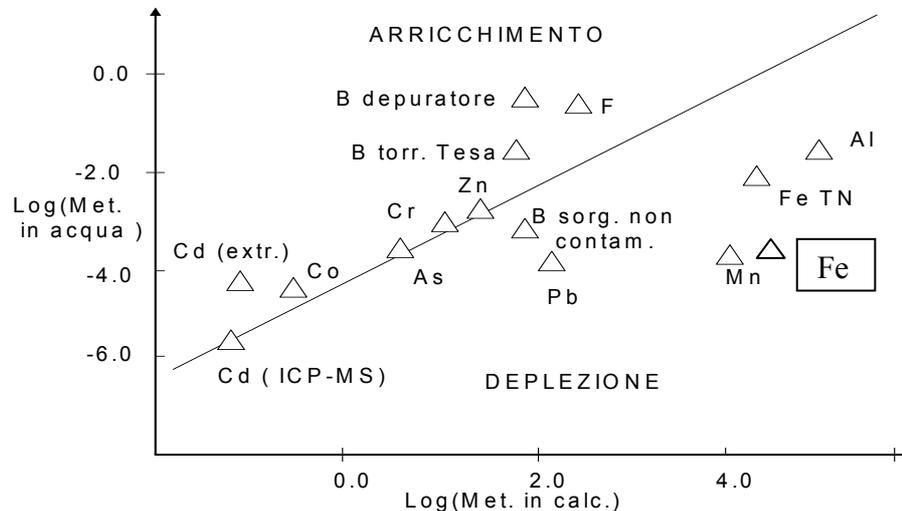


**Figura 5. Logaritmi delle concentrazioni (in mg/L) di alcuni elementi principali rilevati nelle acque superficiali e sorgive bellunesi in relazione alla composizione delle rocce calcaree (logaritmo delle concentrazioni espresse in mg/kg) (la retta indica le concentrazioni che si dovrebbero rilevare nel caso di una distribuzione unitaria degli elementi tra la fase acqua e la fase calcare)**

Considerando altri elementi in traccia si rileva come per Zn, Cr, As, Co, Cd si abbia ancora un fattore di distribuzione molto prossimo all'unità mentre per Fe, Mn, Al, Pb si rileva un forte deplezione nella fase acqua; per il fluoruro si nota un marcato arricchimento dovuto ad apporti atmosferici (Figura 6). Gli elementi che mostrano elevata mobilità geochimica (14) giacciono all'incirca sulla retta mentre quelli con scarsa mobilità risultano depleti. I primi sono assimilabili agli elementi di tipo A o "hard" (26,27), i secondi agli elementi di tipo B o "soft" per i quali è necessario considerare la elevata insolubilità degli idrossidi (si deve ricordare che anche all'interno di una stessa formazione geologica le concentrazioni degli elementi possono differire a causa di tempi di contatto diversi o di flussi che interessano strati diversi [come potrebbe essere il caso di flussi rapidi in rocce fessurate (28)].

Il grafico può essere utilizzato per individuare i "valori naturali" di concentrazione per un dato ambito geologico oltre che per controllare la giustezza delle analisi chimiche e delle ipotesi circa la geologia e gli apporti del suolo. Ad esempio se le concentrazioni misurate nell'acqua concordano sostanzialmente con quelle previste dal grafico di Figura 6. allora non ci sono motivi di sospettare errori analitici, apporti antropici o presenza di formazioni geologiche e condizioni chimiche dell'acqua (riguardo ad esempio pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ) anomale. In caso contrario tutti questi punti sono da verificare. Ad esempio in Figura 6 è evidente la correlazione tra le concentrazioni di boro e gli apporti da scarichi civili in corsi d'acqua tributari del Lago di S Croce (Veneto); la presenza anomala di ferro (24) è da porre in relazione a elevati valori di

pCO<sub>2</sub> e di ioni idrogeno tipici di rocce acide; elevatissime concentrazioni di Cd in numerosi corsi d'acqua della Provincia di Belluno, tra l'altro mai più confermati in seguito e in presenza di valori "normali" di ioni nitrato, cloruro e conducibilità (25) sono, con ogni probabilità, il frutto di errori analitici.



**Fe (TN)** si riferisce alla concentrazione dello ione ferro rilevata nell'acqua minerale di Pejo (TN) (24);  
**Cd (extr.)** è il valore medio dello ione Cd determinato in alcuni torrenti bellunesi nel 1989 mediante estrazione del complesso con ditizone e lettura di assorbimento molecolare (25);  
**Cd (ICP-MS)** è la concentrazione media dello ione Cd misurato in 5 sorgenti da Gerotto e Decet mediante tecnica ICP-MS (dati non pubblicati);  
**B torr. Tesa** e **B dep.** sono le concentrazioni del boro rilevate in due corpi idrici bellunesi

**Figura 6. Logaritmi delle concentrazioni (in mg/L) di alcuni elementi in traccia rilevati nelle acque superficiali e sorgive bellunesi in relazione alla composizione delle rocce calcaree (logaritmo delle concentrazioni espresse in mg/kg)**

## Criteri di verifica per la zona di emergenza

I criteri che in base alla nostra esperienza sembrano dare buoni risultati per valutare la presenza di apporti di acque superficiali sono sostanzialmente due:

1. Indicatori di apporti superficiali (foglie, aghi di conifere, suolo, metazoi, ecc.);
2. Valutazione del tempo minimo di arrivo dei flussi preferenziali.

### Definizione dei criteri

In relazione agli indicatori di apporti superficiali ci si riferisce a foglie, aghi di coniferi, metazoi, ecc. Per quanto riguarda questo argomento si rimanda ai lavori di Gaiter *et al.* (29, 30) nei quali il metodo descritto è, a nostro parere, rapido, poco costoso ed efficace.

## Valutazione del tempo minimo di arrivo dei flussi preferenziali

In sostanza si tratta di individuare la presenza di picchi di ioni cloruro e la loro distanza temporale dai rispettivi picchi di precipitazione umida; tanto più essi saranno ravvicinati e tanto maggiore sarà la vulnerabilità dell'acquifero (Figura 7) (11, 31, 32). In prima approssimazione si può ritenere che la costanza nel tempo dei componenti chimici principali (nel nostro caso si può considerare una variazione inferiore a -10% per la conducibilità quale criterio di costanza) indichi la pratica assenza di apporti superficiali.

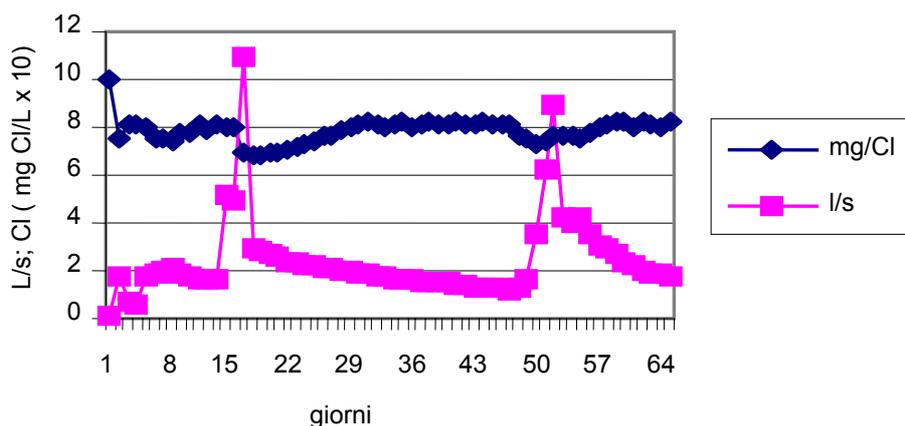


Figura 7. Andamento delle concentrazioni dello ione cloruro in funzione dei picchi di portata nella sorgente Lasen A (Belluno)

## Valutazioni sintetiche e finali

Un controllo integrato di un bacino richiede sia la valutazione della funzionalità delle parti costituenti (e non solo un controllo basato su tabelle di legge le quali sono di necessità generalissime e di quasi nessun aiuto nei casi particolari) sia la collaborazione con chi opera sui bacini.

Una valutazione basata unicamente sulle migliori conoscenze scientifiche disponibili ma senza interazione con gli enti e gli interessi coinvolti può comportare una eccessiva "laboratorizzazione" delle indagini ed è frequente in strutture che vivono in torri d'avorio e che in genere mancano della forza per rendere operative le loro scelte. D'altra parte una valutazione che consideri solo le tabelle di legge porta ad una situazione del tipo di "ordini ed editti" (33). La forza applicativa in questo caso c'è ma non per questo si crea una situazione di reale adempimento dello spirito delle norme. Se si vuole non solo descrivere la situazione o sanzionarla ma cambiarla è necessario coinvolgere le parti sociali che hanno interessi sul territorio dell'acquifero.

Poiché si tratta di risolvere il quasi irresolubile (vale a dire l'uguaglianza di soggetti differenti fra di loro) questo è più propriamente il campo di un'arte, del management appunto, col quale le strutture laboratoristiche devono di necessità interagire (pena la loro inefficacia) ma senza pretendere di sostituirlo.

## Conclusioni

Le attuali norme di legge riguardo le acque potabili hanno un potere predittivo assai scarso nel caso delle sorgenti di ambito montano e questo deriva probabilmente dal fatto che i criteri basati sui limiti igienici non sono una spia né efficace né tempestiva nell'indicare la compromissione degli acquiferi (19). Le norme inoltre consentono solo una verifica della igienicità di un'acqua in un dato preciso momento.

È sembrato quindi necessario individuare dei criteri alternativi per la valutazione degli acquiferi. Quelli adottati in questo lavoro sono in parte ispirati alla proposta avanzata molto tempo fa da Garrels e Christ (34).

In sintesi il procedimento può essere sintetizzato nel modo seguente: l'acquifero viene suddiviso in alcuni punti critici; per ciascuno di essi, in base alla tipologia geologica e pedologica, si individuano gli apporti possibili; si cerca infine di confermare le ipotesi effettuate confrontando i dati ipotizzati con quelli derivanti dall'analisi chimica delle acque. Si può effettuare il percorso inverso: dai dati chimici si può ipotizzare la presenza o meno di certi ambiti geologici e di apporti da parte del suolo e procedere poi alla conferma sul campo. Occorre tuttavia considerare che questi processi di astrazione comportano necessariamente riduzioni e semplificazioni della complessa situazione reale da cui conseguono inevitabili imprecisioni.

Infine per rendere l'intero processo efficace è necessario portare i risultati a conoscenza delle parti sociali che esercitano potere od abbiano interessi sul bacino idrologico.

## Bibliografia

1. Black PE. *Watershed hydrology*. 2nd ed. New York: Ann Arbor Press; 1996.
2. Greco N. Ordinamento, politica e governo delle acque: dimensione italiana ed integrazione europea. *In Amb* 1998;27(3):74-82.
3. Newson M. Catchment-scale solute modelling in a management context. In: Trudgill ST (Ed.). *Solute modelling in catchment system*. New York: J. Wiley; 1995. p. 445-60.
4. Drucker PF. *Manuale di management*. Milano: ETAS Libri; 1991.
5. Berretta GP. *Idrogeologia per il disinquinamento delle acque sotterranee*. Bologna: Pitagora; 1992.
6. Baumgartner A, Liebscher HJ. *Lehrbuch der Hydrogeologie*. Band 1, 2 Auflage. Berlin: Gebr. Boertrager; 1994.
7. Roster G. Dei criteri per giudicare la potabilità di un'acqua. *L'Ingegneria Sanitaria (Torino)* 1893;3:14-8.
8. Roster G. Dei criteri per giudicare la potabilità di un'acqua. *L'Ingegneria Sanitaria (Torino)* 1893;4: 73-6.
9. Du Clos D. *Observationes de Aquis Mineralibus Galliae*. Lugduni Batavorum; 1677.
10. Guareschi I. *Nuova Enciclopedia di chimica*. Torino: UTET; 1925.
11. Decet F. Un test di qualità delle sorgenti delle Dolomiti (Alpi Orientali) basato sugli equilibri calcite-CO<sub>2</sub>-acqua e dolomia-CO<sub>2</sub>-acqua. *Boll Chim Ig* 1999;50:105-19.
12. Schleyer R, Kerndorff H. *Die Grundwasserqualität westdeutschen Trinkwasserressourcen*. Weinheim: VCH Verlag; 1991.
13. Drever JI. *The Geochemistry of natural waters*. 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall; 1988.
14. Matthes G, Pekdeger A. Chemisch-biochemische Umsetzungen bei der Grundwasserneubildung. *Wasser-Abwasser* 1980;121:214-9.
15. Pfeilsticker K. Die Spektralanalyse in der Wasserchemie. *Vom Wasser* 1937;11:238-50.

16. Nirel PM, Revaclier R. Assesment of sewage treatment plant effluent impact on river water quality using dissolved Rb/Sr ratio. *Environ Sc Techn* 1999;33:1996-2000.
17. Decet F. Materiali per l'idrochimica delle sorgenti in area dolomitica. *Boll Chim Ig* 1993;43:331-48.
18. Lahl H, Lavanchy Y. Hydrogeological application of trace elements analysis with ICP -AES for the characterisation of groundwater categories of the Swiss Jura. *Fresenius Zeit Anal Chemie* 1991;341:559-63.
19. Matthes G. *Die Beschaffenheit des Grundwasser*. 3 Aufl. Berlin: Gebruder Borntrager; 1994.
20. Brondi M, Dell'Aglio M, Ghiara E, Gagnoni R. Distribuzione degli elementi minori ed in traccia di interesse tossicologico e nutrizionale nelle acque italiane. *Acqua e Aria* 1986;10:1043-61.
21. Schlecher WD, Mc Avoy DC. *MINEQL +. A chemical equilibrium modeling system, Version 4.0*. Hallowell (ME): Environmental Research Software; 1999.
22. Dzombach DA, Morel FMM. *Surface complexation modeling: hydrous ferric oxide*. J.Wiley; 1990.
23. Yuan-Hui Li. Distribution patterns of the elements in the ocean: a synthesis. *Geochim Cosmoch Acta* 1991;55:3223-40.
24. Fuganti A, Morteani G, De Francesco F, Preinfalk C. Tettonica ed acque minerali ricche di anidride carbonica a Pejo (TN) ed aree limintrofe. *Studi Trentini Scienze Naturali - Acta Geologica* 1996;25:135-66.
25. Provincia di Belluno. *Ambiente in Provincia di Belluno*. Belluno: Tip. Somavilla; 1989.
26. Schnoor JL. *Environmental modeling*. New York: J.Wiley; 1996.
27. Stumm W, Morgan JJ. *Aquatic chemistry*, New York: J. Wiley; 1981.
28. Rank D, Volkl G, Maloszewski P, Stichler W. Flow dynamics in an alpine karst massif studied by means of environmental isotopes. In: *Isotope Techniques in water resources development. Proceedings of an International Symposium on Isotopes*. Vienna: IAEA; 1991. p.327-40.
29. Gaiter S, Baldini I. Metodi investigativi e analitici atti a valutare lo stato di protezione ed i rischi igienici di piccoli acquedotti approvvigionati da acquiferi montani nell'Appennino ligure: impostazione e criteri operativi. In: *Atti del 2° Convegno Nazionale sulla Protezione e Gestione delle acque sotterranee*. Nonantola, Modena, 17-19 maggio 1995. Bologna: Pitagora Editrice; 1996. p. 369-83. (Quaderni di Geologia applicata).
30. Bodon M, Gaiter S. Nuovi criteri di valutazione, basati sulla componente biologica, per le captazioni di acque destinate al consumo umano. *Biologia Ambientale* 1995;9:5-17.
31. Pearce AJ, Stewart MK, Sklash MG. Storm runoff generation in humid head water catchments. 1: Where does the water come from? *Water Res Res* 1986;22:1263-72.
32. Peters NE, Ratcliffe EB, Tranter M. Tracing solute mobility at the Panola Mountain Research watershed, Georgia (USA): variations in Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrations. In: *IAHS Publ.n.248. Proceedings of the Headwater 1998 Conference*. Merano, Italy; 1998. p. 483-90.
33. Hint DT. *Management in action*. Columbus (Ohio): Battelle Press; 1988.
34. Garrels RM, Christ CL. *Solutions, minerals and equilibria*. S. Francisco: Freeman; 1965.

## SETTORE AMBIENTE: TERMINOLOGIA NELLA RICERCA PER SOGGETTO NEL RECUPERO DELL'INFORMAZIONE

Maria Cristina Calicchia  
Ufficio Relazioni Esterne, Istituto Superiore di Sanità, Roma

In occasione del Workshop “La contaminazione microbiologica degli ambienti idrici e le fonti di contaminazione: aspetti igienico-sanitari e metodologici”, organizzato dall’Istituto Superiore di Sanità (ISS) nell’ottobre del 1998, mi era stato affidato l’incarico di trattare una rassegna di strumenti di informazione e di aggiornamento bibliografico e il lavoro presentato partendo da un accenno generale sui sistemi di recupero dell’informazione tendeva, tra l’altro, a focalizzare il criterio dell’affidabilità dei mezzi di comunicazione nell’informazione scientifica, in tal senso i dati presentati facevano riferimento ad importanti istituzioni nazionali, comunitarie e internazionali, gruppi editoriali accreditati, ecc.

In questa occasione mi è stato richiesto di affrontare il problema della terminologia, nella ricerca per soggetto, connessa all’utilizzazione di sistemi elettronici quali: CD-ROM, floppy disk, basi e banche di dati in linea e remote e, Internet\*, escludendo dunque i sistemi cartacei (1). Una parte del presente lavoro è dedicata all’ampliamento e/o all’aggiornamento dei dati pubblicati nella serie dei rapporti tecnici dell’ISS (2) in materia di ambiente, in generale, e di contaminazione microbiologica degli ambienti idrici, in particolare.

Nel prosieguo del lavoro citerò indifferentemente soggetti, intestazioni di soggetto, voci, termini di ricerca, descrittori, parole chiavi, *key word* solo per indicare l’espressione linguistica utilizzata per descrivere il documento.

Le fonti utilizzate sono quelle disponibili presso la Biblioteca e la Documentazione dell’Istituto Superiore di Sanità, da sempre impegnate nel supporto tecnico-scientifico allo sviluppo delle conoscenze, in ambito biomedico e di sanità pubblica.

### Ordine tematico-concettuale della conoscenza

Il problema di dare un ordine tematico-concettuale alla massa di conoscenze è un problema antico e attuale allo stesso tempo. Se però lo circoscriviamo allo scenario dell’informazione scientifica, a partire dalla nascita dei periodici scientifici, nel diciassettesimo secolo, tre eventi hanno determinato la necessità di affrontare detto problema per adottare un sistema universale di organizzazione delle conoscenze: la cosiddetta era dell’esplosione delle informazioni, lo sviluppo dei sistemi elettronici per una archiviazione sempre più massiccia delle informazioni, e oggi Internet.

Le regole, le procedure, e la forma che dovevano avere le intestazioni di soggetto furono oggetto di discussione a partire dall’opera di A. Crestadoro, del 1856, *The art of making*

---

\* Si riporta qui, per completezza, la distinzione presente in letteratura tra *online information* e *networked information*. Per *online information* (informazione online) si intendono fonti informative statiche o di base, con il termine *networked information* (informazione in rete) si intendono fonti informative dinamiche o di attualità (3).

*catalogues* (4). Non è qui il caso di citare la cospicua bibliografia sull'argomento, tuttavia appare utile far riferimento ai lavori della Library of Congress a partire dalla prima edizione della *List of subject headings used in the dictionary catalogues of the Library of Congress*, pubblicata in due volumi, nel 1900-1914. Solo nel 1975, la lista dei soggetti utilizzati nel Catalogo dizionario della Library of Congress fu pubblicata, nell'8ª edizione, sotto il titolo più familiare di *Library of Congress Subject Headings* (LCSH). Tale opera costituisce ancora oggi la più importante lista generale di soggetti periodicamente aggiornata e largamente utilizzata, in ambito tecnico-scientifico, resa disponibile anche in Internet.

La crescita esponenziale delle conoscenze e quindi delle informazioni, in campo tecnico-scientifico, può essere inquadrata, nel tempo, in differenti orientamenti:

– *Orientamento alla disciplina*

Indica un orientamento che è durato dall'invenzione della stampa fino a circa i primi decenni del '900 ed è stato caratterizzato dalla divisione della conoscenza in compartimenti più o meno stagni, ovvero discipline che riflettevano il metodo e i criteri con cui le stesse venivano insegnate/studiate. Ne costituisce un esempio anche questo stesso Istituto. L'ISS, infatti, fin dalla sua creazione nel 1934, fu costituito in Laboratori che riflettevano le divisioni disciplinari: Fisica, Microbiologia, Chimica Biologica, Chimica Terapeutica, ecc. e, solo successivamente, per effetto della Legge 519/1973, fu riorganizzato nelle sue strutture scientifico-organizzative in Laboratori e Servizi non più monodisciplinari ma interdisciplinari e intersettoriali.

– *Orientamento al problema*

Tale orientamento assume importanza a partire dalla seconda guerra mondiale ed è caratterizzato dalla necessità di affrontare problemi particolari da risolvere o nuove discipline per cui si dimostravano utili le innovazioni, le idee, i metodi portati avanti in più aree disciplinari. Un noto esempio è rappresentato dall'ingegneria genetica che coinvolge discipline quali la biologia, la chimica, la fisica e l'ingegneria che tradizionalmente sono studiate separatamente. Per tornare alle strutture scientifico-organizzative dell'ISS, successivamente alla sopra menzionata Legge 519/1973, nel 1976 vennero istituiti Laboratori quali: Malattie batteriche e virali, Igiene del lavoro, Igiene del territorio, Radiazioni, ecc., proprio seguendo un approccio di ricerca di soluzioni orientate al problema.

– *Orientamento alla missione o al mandato*

Per affrontare tale orientamento la domanda di informazione si estende e abbraccia una serie di aree disciplinari. L'esempio dato da Foskett (5) è la medicina spaziale ma, volendo indicare settori affini a questo contesto, ci si può riferire all'educazione ambientale, per le cui attività progettuali occorre tener conto di un'ampia serie di discipline e di settori quali: biologia, tossicologia ed ecotossicologia, sociologia, antropologia, scienza della comunicazione, politiche sanitarie, politiche ambientali, ecc.

È evidente come tali orientamenti, nella loro attuazione pratica, abbiano determinato anche la creazione e l'utilizzazione di nuovi termini di ricerca e, soprattutto, nello sgretolarsi dei cosiddetti compartimenti stagni, abbiano fatto sì che molti termini possano oggi connotare differenti ambiti di utilizzazione (6, 7).

Non si può non accennare qui anche ai supporti e agli strumenti informatici e telematici che fanno sì che, oltre all'aspetto dei contenuti, occorra affrontare due altri aspetti, quello relativo alla conoscenza degli strumenti e dei sistemi informatici e quello della selezione delle fonti. A quest'ultimo aspetto, tuttavia, già ora, sta dando una risposta la diffusione di servizi

bibliografici integrati su Internet: le enormi potenzialità della logica ipertestuale fa sì che da una lista di citazioni si possa accedere alla visualizzazione di informazioni correlate, in taluni casi presenti su altre basi o banche di dati.

Se la selezione delle fonti rimane un'operazione cruciale e indispensabile per arrivare al risultato, il problema della ricerca dell'informazione per soggetto è, e rimane, certamente critico. Tuttavia, è il caso di ricordare che se in alcuni archivi elettronici i campi di accesso sono generalmente costituiti da autore, soggetto e titolo, ne esistono altri che permettono di effettuare ricerche più sofisticate, per la particolare strutturazione dell'archivio stesso che è costituito, come si sa, da record a loro volta suddivisi in campi, per esempio se facciamo riferimento ai campi adottati, anche dai vari fornitori, nel record MEDLINE è possibile indirizzare la ricerca su un totale di 46 campi per ottenere, dunque, risposte più accurate e pertinenti.

## **Strumenti per la ricerca delle voci di soggetto**

Strumenti e contenuti sono due aspetti critici della problematica inerente alla ricerca delle informazioni e, per quanto riguarda i primi, sia che si tratti di prodotti a stampa sia che ci si riferisca a prodotti elettronici, gli strumenti per la ricerca delle voci di soggetto risultano identificati da: cataloghi, thesauri, indici o liste per soggetto o per intestazioni di soggetto, soggettari, glossari, liste d'autorità.

### **Cataloghi e soggettari**

Senza addentrarsi in trattazioni più ampie che andrebbero ben al di là degli obiettivi di questo lavoro, nei riguardi di termini quali: catalogo, catalogo per soggetti, catalogo dizionario, è utile rammentare che: "Occorre precisare la terminologia per chiarire i problemi della soggettazione e per permettere la costituzione di cataloghi formati da reti omogenee di segnalazioni" (8).

Con l'affermarsi delle tecnologie informatiche il soggettario costruito tramite calcolatore, prende il posto dello stesso strumento per il quale era stato ideato: il catalogo per soggetti. Nell'attualità, la maggior parte delle biblioteche ha trasferito o sta trasferendo i propri cataloghi in banche dati digitali disponibili via Internet, i più noti OPAC (*Online Public Access Catalogue*), mentre un ulteriore passo avanti della realtà bibliotecaria è costituito dai cataloghi collettivi. Infatti, se più biblioteche mettono in connessione le proprie risorse documentarie ciò consente all'utente di sapere, attraverso una singola ricerca, se e dove esiste l'informazione che interessa, all'interno delle biblioteche che aderiscono al progetto.

### **Intestazioni di soggetto e thesauri**

L'attuale maggiore distinzione tra liste di intestazioni di soggetto e thesauri è strettamente legata all'introduzione e all'uso dei sistemi elettronici da cui origina, sostanzialmente, la forma tesaurale di dette liste; gli esempi più noti sono i tre volumi del MeSH (*Medical Subject Headings*): *Tree Structures*, *Annotated Alphabetic List*, *Permuted MeSH* della National Library of Medicine e il citato *Library of Congress Subject Headings*.

Il termine thesaurus, in ambito italiano, ha una lunga storia che parte dall'antichità, ma il thesaurus più largamente presente nell'esperienza anglo-americana, che ha dato vita ai moderni thesauri documentari è certamente il *Thesaurus of English Words and Phrases*, di P.M. Roget, edito nel 1852, più volte aggiornato e ancora oggi diffusissimo, creato con lo scopo di favorire la ricerca del termine più pertinente rispetto al concetto da esprimere. Intorno al 1950 verrà affrontato tale aspetto, nell'utilizzazione del computer, per registrare un sistema di parole

autorizzate, da usare nell'indicizzazione per soggetti, con una struttura di relazioni meglio note come *cross reference*.

La definizione odierna di thesaurus è quella fornita dalle *Guidelines for the establishment and development of monolingual thesauri dell'International Standard Organisation (ISO)*, nella seconda edizione pubblicata nel 1986: "il thesaurus è un vocabolario di un linguaggio di indicizzazione controllato, organizzato formalmente in modo da rendere esplicite le relazioni a priori tra concetti"; tale definizione, a differenza delle precedenti, individua nelle relazioni semantiche tra concetti, costruite *a priori*, la condizione necessaria per costituire la struttura di tale strumento.

Per quanto è argomento del presente lavoro, occorre rimarcare che, a tutt'oggi, nella costruzione di *thesauri*, pur in presenza di standardizzazioni internazionali che comprendono per esempio quelle relative alle relazioni tra concetti generali e concetti specifici (ISO 2788/1986), il concetto di strutturazione/contextualizzazione dell'informazione mantiene, nel contesto operativo, interpretazioni restrittive o estensive più o meno eterodosse. A parte i thesauri pubblicati che rigorosamente applicano gli standard, un notevole sperimentalismo continua a caratterizzare tale strumento che, spesso, passa attraverso la reinterpretazione di soggetti o classificazioni tradizionali, in applicazioni che, di fatto, rispecchiano la varietà dei contesti bibliotecari esistenti (9).

Occorre, infine, aggiungere che l'aspetto legato alla corretta decodifica e al miglior uso dei termini viene ancor più reso problematico quando si vogliono tradurre e utilizzare i termini in uso in paesi con lingua diversa dalla nostra, per esempio qual è la traduzione corrente per "waterborne diseases"? Ma, in taluni casi, quando non appare chiara l'uniformità di utilizzazione dei termini, all'interno di una pubblicazione, qual è il campo di applicazione per esempio di concetti quali: "acque contaminate" o, "acque inquinate"?

## **Linguaggio e sistema di relazioni tra i termini utilizzati nei sistemi di recupero dell'informazione**

Per semplificare la trattazione si è ritenuto opportuno unire all'argomento linguaggio quello relativo al sistema di relazioni tra termini utilizzati, giacché, per certi aspetti, non risultano disgiunti nella pratica operativa.

I sistemi di recupero dell'informazione usano dei linguaggi che vengono normalmente distinti in:

- linguaggio controllato;
- linguaggio naturale;
- combinazione di termini del linguaggio controllato e linguaggio naturale.

### **Linguaggio controllato**

Il linguaggio controllato è quello rintracciabile in un vocabolario di parole. Tale vocabolario instaura un sistema di relazioni (*cross reference*) di tipo semantico tra le parole utilizzate e solitamente tali relazioni sono di tre tipi: di equivalenza, gerarchiche e associative. Per quanto riguarda le relazioni di equivalenza, oltre alle relazioni tra sinonimi spesso abbiamo anche quelle tra quasi-sinonimi e di preferenza. Tra i vantaggi del linguaggio controllato abbiamo il controllo dei rinvii e dei richiami, ovvero:

1. la possibilità che ad ogni concetto corrisponda in modo univoco un solo termine, fornendo le relazioni (*see references*) tra termini sinonimi, o quasi-sinonimi o di preferenza, attraverso le relazioni del tipo "vedi", per indicare il termine preferito e del

tipo “*visto da*”, per indicare il termine non preferito. La possibilità della corrispondenza univoca tra termine e contenuto può essere garantita anche dalla presenza di *scope note*\*;

2. la selezione di gruppi di termini concettualmente correlati, fornendo le basi delle relazioni del tipo “*vedi anche*” “*visto anche da*” (*see also references*).

Il linguaggio controllato aumenta dunque il recupero attraverso il controllo dei sinonimi e, in un certo senso fornisce una memoria aggiuntiva per quanto riguarda i termini correlati così come può anche aumentare la precisione attraverso l’uso di termini composti, il controllo degli omografi, dei polisemi, ecc.

Il maggiore svantaggio è la necessità di un aggiornamento periodico, in particolare, per la verifica dell’attualità d’uso dei termini utilizzati.

### Linguaggio naturale

Per linguaggio naturale si intende il linguaggio utilizzato nel documento stesso, che tiene in considerazione i termini compresi nel titolo, nel riassunto o abstract e nel testo pieno. Il suo maggiore vantaggio è la possibilità di fornire l’attualità e la specificità di parole in uso corrente nella comunità degli esperti, aumentandone la precisione, con l’abilità di escludere l’informazione irrilevante.

Lo sviluppo dei sistemi informatici ha fatto sì che molte basi di dati aggiungano automaticamente ai soggetti inseriti dall’utente i sinonimi e, in alcuni casi, i termini con forte grado di sinonimia, mentre in modalità di ricerca avanza possono consentire di recuperare i soggetti richiesti unitamente alle varianti morfologiche.

Generalmente, infine, identificano le *stopword*: un insieme di termini che, avendo un’alta frequenza d’uso nella lingua naturale, sono ritenuti non significativi e, quindi, vengono automaticamente esclusi dalla ricerca.

### Combinazione di termini del linguaggio controllato e linguaggio naturale

La combinazione di termini del linguaggio controllato e di parole libere si è ottenuta, sostanzialmente, con lo sviluppo di sistemi di informazione online che usano, in combinazione con soggetti presenti nel linguaggio controllato, i cosiddetti termini *free text*, ovvero il linguaggio naturale di parole, come già detto, presenti nel titolo, nell’abstract e nel testo del documento.

In particolare, per quanto riguarda il sistema di relazioni, oltre quelle di equivalenza e preferenza sopra menzionate e le relazioni gerarchiche e associative che usano *cross reference* del tipo: *vedi/visto da, usa/usato per, vedi anche/visto anche da*, i termini convenzionali utilizzati nella forma tesaurale, cui si fa accenno sopra, sono contraddistinti da relazioni che riproducono uno schema ad albero (per intendersi il famoso “Tree Structures” del MeSH, sopra citato). Tali termini convenzionali, che anche in thesauri in lingua italiana mantengono utilizzando la sigla in lingua inglese, sono i seguenti: BT-NT (*Broader Term - Narrower Term*) oppure BH-NH (*Broader Heading - Narrower Heading*), mentre RT o RH stanno per Related term o Related heading. Una nota a parte potrebbe essere fatta per i cosiddetti “orfani”, termini cioè che non presentando collegamenti di alcun tipo rischiano di non essere rintracciati anche da utilizzatori esperti.

### Recupero e precisione dei risultati

Dopo aver selezionato le fonti di informazione, il problema che si pone in una ricerca per soggetto è proprio quello di trovare il giusto soggetto o meglio i vari soggetti collegati relativi

\* La presenza di *scope note*, indirizzate all’utente, ci è utile per capire per un dato termine, quale sia il significato adottato e/o il suo ambito di utilizzazione.

ad un argomento complesso. Ma non è tutto qui, perchè i risultati che si ottengono spesso richiedono un ulteriore intervento sulla scelta della terminologia utilizzata e/o sull'implementazione di modalità più avanzate di ricerca, al fine di incrementare o diminuire il recupero dei risultati. Infatti, successivamente ad ogni possibile recupero, spesso si pone il problema di effettuare una selezione tra l'informazione che è utile e quella che non serve, dal momento che il concetto di precisione, valutato in termini di pertinenza e/o di utilità dell'informazione stessa, è comunque dipendente dal giudizio individuale e quindi dal bisogno del singolo ricercatore.

Indagini presenti in letteratura affermano che il concetto di utilità, assegnato dall'utente finale, può non coincidere con il concetto di rilevanza, che può essere assegnato da esperti o dagli intermediari della ricerca (5, 10).

### **Incrementare il recupero dei risultati**

Se a fronte di una ricerca otteniamo un basso recupero di informazioni, rispetto a quelle che ci attendevamo o ne otteniamo zero, possiamo tentare di incrementare il recupero dei risultati utilizzando i cosiddetti dispositivi di recupero dei risultati (*recall device*) che includono:

- il controllo di forma delle parole, attraverso il controllo della forma grammaticale o l'uso di forme morfologiche varianti di uno stesso termine, per alcune basi di dati anche il controllo dell'ordine delle parole, ecc.
- la ricerca per troncamento dei termini o frammento di parola, che prevede solitamente l'aggiunta di un asterisco (\*) o del simbolo \$, alla fine o all'interno della parola tronca o radice di parola
- l'utilizzazione dei sinonimi, quasi sinonimi, termini preferenziali\* (*vedi/ visto da – see/seen from, usa/usato per – use/use for*)
- l'uso, ove siano presenti, delle relazioni semantiche (*vedi anche/visto anche da – see related/seen also from*)
- il recupero da termini specifici a termini generali
- le combinazioni di più termini con l'operatore logico OR. L'operatore OR corrisponde alla somma logica di due o più termini, e permette di recuperare tutte le citazioni che contengono almeno uno dei termini della combinazione
- l'uso della funzione *explode*, che è legata alla struttura ad albero del thesaurus. Tale funzione è prevista in molti sistemi di ricerca e quindi potrà essere utilizzata solo in quei sistemi che non la applicano automaticamente.

### **Diminuire il recupero dei risultati**

Al contrario di quanto sopra detto, se otteniamo un numero esuberante di informazioni, per prevenire il recupero di documenti irrilevanti, possiamo diminuire il recupero dei risultati stessi utilizzando i dispositivi di precisione (*precision device*) che includono:

- il restringimento della ricerca per: anno di pubblicazione, lingua, ambito dello studio, ecc.;
- la verifica delle *scope note* e di termini omografi;
- l'uso di indicatori "di prossimità" tra più termini rilevanti, utilizzando l'operatore NEAR (vicino) o ADJ (adiacente). Il primo relaziona due termini collocati nella stessa frase,

---

\* La definizione di termine preferenziale (detto anche "descrittore") nello Standard ISO 2788/1986 è: "Termine usato di norma nell'indicizzazione per esprimere un determinato concetto".

indipendentemente dal loro ordine o dal numero di termini interposti; il secondo relaziona due termini immediatamente adiacenti, nell'ambito della stessa frase;

- per alcune basi di dati, l'uso dell'indicatore di frequenza. Si utilizza l'operatore **FREQ**, quando la ricerca avviene sul testo pieno/full text, in tal caso occorre specificare il numero atteso di frequenza/presenza di un certo termine;
- il recupero da termini generali a termini specifici;
- le combinazioni di più termini con gli operatori logici booleani: **AND**, **NOT**.

L'operatore **AND** consente di recuperare soltanto i record che contengono contemporaneamente tutti i termini collegati, mentre l'uso di **NOT** esclude quei record che contengono un certo termine.

Se la ricerca e il recupero delle informazioni richiedono esperienza nell'uso dei vari sistemi di recupero le ricerche in modalità avanzata richiedono abilità nell'uso della logica booleana. Infatti, l'utilizzazione degli operatori logici booleani sopra menzionati: **AND**, **OR**, **NOT**, è necessaria quando abbiamo bisogno di correlare i nostri termini ad altri o di escludere alcuni aspetti di un argomento, in tal senso c'è la necessità di "gestire le precedenze": la possibilità di utilizzare le parentesi per modulare l'ordine con il quale il sistema deve eseguire le operazioni booleane sui termini da noi indicati.

Per tornare al problema dei soggetti si può citare la possibilità offerta dalla base dati *Current Contents*, sicuramente nota a tutti, che sia nella versione su floppy disk che su CD-ROM, prevede due campi per le parole chiave: *key word* e *key word plus*; il primo contiene le parole chiave proposte dagli autori, il secondo quelle definite dagli esperti indicizzatori.

## **Individuazione di dati in ambito italiano, europeo e internazionale nel settore ambiente**

Quanto segue costituisce un arricchimento e/o un aggiornamento dei dati già pubblicati nella serie dei Rapporti ISTISAN dell'ISS, sopra richiamata (2), ed è basata sulle risorse disponibili in Internet.

Nella Tabella 1 si forniscono gli indirizzi di alcuni siti giudicati interessanti per gli argomenti trattati. Oltre ai siti elencati grande importanza assume la possibilità di accesso alle riviste online, versione elettronica delle più importanti riviste scientifiche internazionali, nonché la possibilità di accesso alle versioni gratuite di *MEDLINE PubMed*: <http://pubmed.gov> e ad altri archivi *MEDLARS* al sito: [www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov), sotto la voce *Health Information*. In particolare per l'ambiente e le sostanze tossiche c'è la rete *TOXNET* <http://toxnet.nlm.nih.gov/> sempre della *National Library of Medicine* (NLM).

Per quanto riguarda i giornali elettronici nella Tabella 2 si presenta una selezione aggiornata, per editore, di riviste disponibili in Internet, relativamente al settore ambiente, citando in alcuni casi la disponibilità del pregresso con l'anno di inizio, anche se trattasi, in generale, di dati che possono subire variazioni.

Nella Tabella 3 si presenta una Selezione di repertori di periodici anch'essi disponibili gratuitamente in Internet (Fonte: Biblioteca, Istituto Superiore di Sanità).

**Tabella1. Selezione di siti interessanti in ambito italiano, europeo e internazionale, del settore ambiente (aggiornamento al novembre 2003)**

Organizzazione	Sito web
<b>Ambito italiano</b>	
ENEA (Ente per le nuove tecnologie, l'energia e l'ambiente)	<a href="http://www.enea.it">http://www.enea.it</a>
Istituto Superiore di Sanità	<a href="http://www.iss.it">http://www.iss.it</a>
Ministero dell'Ambiente e della Tutela del territorio	<a href="http://www.minambiente.it/Sito/home.asp">http://www.minambiente.it/Sito/home.asp</a>
Italian OPAC directory	<a href="http://www.nis.garr.it/lopac-dir/opac.html">http://www.nis.garr.it/lopac-dir/opac.html</a>
OPAC italiani/AIB (Associazione Italiana Biblioteche)	<a href="http://www.aib.it/aib/lis/opac1.htm">http://www.aib.it/aib/lis/opac1.htm</a>
Repertorio degli OPAC italiani	<a href="http://www.aib.it/aib/opac/repertorio.htm">http://www.aib.it/aib/opac/repertorio.htm</a>
ACNP (Archivio Collettivo Nazionale dei Periodici)	<a href="http://acnp.cib.unibo.it/cgi-ser/start/it/cnr/fp.html">http://acnp.cib.unibo.it/cgi-ser/start/it/cnr/fp.html</a>
SBN (Servizio Bibliografico Nazionale)	<a href="http://www.sbn.it">http://www.sbn.it</a>
<b>Ambito europeo</b>	
CORDIS (Community Research & Development Information Service)	<a href="http://www.cordis.lu">http://www.cordis.lu</a>
EEA (European Environmental Agency), Information for improving Europe's environment	<a href="http://www.eea.eu.int">http://www.eea.eu.int</a> <i>Si possono reperire informazioni per tema e per paese. I principali temi ambientali individuati sono 32</i>
Unione europea:	
<i>tutto sull'Europa</i>	<a href="http://europa.eu.int">http://europa.eu.int</a>
<i>In particolare sull'ambiente i relativi link</i>	<a href="http://europa.eu.int/pol/env/index_it.htm">http://europa.eu.int/pol/env/index_it.htm</a>
Best Environmental Resources Directories	<a href="http://www.ulb.ac.be/ceese/meta/cds.htm1">http://www.ulb.ac.be/ceese/meta/cds.htm1</a>
CEED (Central and Eastern European Environmental Expert Database)	<a href="http://www.rec.org/REC/Databases/databases.html">http://www.rec.org/REC/Databases/databases.html</a> <i>Directory delle organizzazioni governative dell'Europa centrale e orientale che si occupano dell'ambiente</i>
Environmental Organization Web Directory	<a href="http://www.webdirectory.com">http://www.webdirectory.com</a>
ELIOS (Environmental Legal Information Observatory System)	<a href="http://www.ittig.cnr.it/BancheDatiGuide/elios//ELIO.htm">http://www.ittig.cnr.it/BancheDatiGuide/elios//ELIO.htm</a> <i>Repertorio internazionale-osservatorio telematico dei principali sistemi informativi contenenti informazioni, realizzato dall'Istituto di Teoria e Tecniche dell'Informazione Giuridica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR). Per la ricerca esistono due Indici: per nome e per paese. giuridico-ambientali</i>
OPAC in Europa - Biblioteche Nazionali	<a href="http://www.bl.uk/gabriel/services/lists_generated/opac_en.html">http://www.bl.uk/gabriel/services/lists_generated/opac_en.html</a>
<b>Ambito internazionale</b>	
International Office for Water	<a href="http://www.oieau.fr">http://www.oieau.fr</a>
International Water Association	<a href="http://www.iwahq.org.uk">www.iwahq.org.uk</a>
United Nation Environment Programme (UNEP)	<a href="http://www.unep.org">http://www.unep.org</a>
United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO)	<a href="http://www.unesco.org">http://www.unesco.org</a>
Organizzazione mondiale della sanità (WHO)	<a href="http://www.who.int">http://www.who.int</a>
International Federation of Library Associations and Institutions (IFLA) Directory of Union Catalogues	<a href="http://www.ifla.org/VI/2/duc/index.htm">http://www.ifla.org/VI/2/duc/index.htm</a>
Library Catalogues on the Web/Peter Scott	<a href="http://www.libdex.com/">http://www.libdex.com/</a>
National Library Catalogues Worldwide/John W. East	<a href="http://www.library.uq.edu.au/natlibs/">http://www.library.uq.edu.au/natlibs/</a>

**Tabella 2. Selezione di giornali elettronici di interesse per il settore ambiente, elencati per editore con l'indicazione del sito web e, per alcuni, dell'anno di disponibilità del progresso per la consultazione online (aggiornamento gennaio 2004)**

<b>Editore</b> <i>Rivista – anno disponibilità progresso</i>	<b>Sito web</b>
<b>IWA Publishing</b> <i>Journal of Water and Health - 2003</i> <i>Journal of Water Supply: Research &amp; Technology – Aqua – 1998</i> <i>Water Science &amp; Technology - 1994</i>	<a href="http://www.iwaponline.com">http://www.iwaponline.com</a>
<b>(The) Lancet</b> <i>Lancet - 1996</i>	<a href="http://www.thelancet.com">http://www.thelancet.com</a>
<b>Nature</b> <i>Nature - 1997</i> <i>Nature Reviews Microbiology - 2003</i>	<a href="http://www.nature.com">http://www.nature.com</a>
<b>National Academy of Sciences</b> <i>Proceedings of the National Academy of Sciences - 1990</i>	<a href="http://www.pnas.org">http://www.pnas.org</a>
<b>Royal Society of Chemistry</b> <i>Chemical Communications - 1996</i> <i>Chemical Society Reviews - 1996</i>	<a href="http://www.rsc.org">http://www.rsc.org</a>
<b>Royal Society of London</b> <i>Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences - 1997</i>	<a href="http://www.pubs.royalsoc.ac.uk">http://www.pubs.royalsoc.ac.uk</a>
<b>Society for General Microbiology</b> <i>Journal of General Virology - 1997</i>	<a href="http://vir.sgmjournals.org">http://vir.sgmjournals.org</a>
<b>Springer</b> <i>Accreditation and Quality Assurance - 1996</i> <i>Applied Microbiology and Biotechnology - 1994</i> <i>Archives of Environmental Contamination and Toxicology - 1996</i> <i>Archives of Microbiology - 1994</i> <i>Archives of Toxicology - 1994</i> <i>Archives of Virology - 1997</i> <i>Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology - 1996</i> <i>Current Microbiology - 1996</i> <i>Environmental Management - 1996</i> <i>International Archives of Occupational and Environmental Health - 1996</i> <i>Microbial Ecology - 1996</i> <i>Oecologia - 1996</i> <i>Radiation and Environmental Biophysics - 1996</i>	<a href="http://link.springer.de">http://link.springer.de</a>
<b>Taylor &amp; Francis</b> <i>Annals of Science - 1999</i> <i>Biomarkers - 1997</i> <i>International Journal of Environmental Studies - 2002</i> <i>International Journal of Toxicology - 1997</i> <i>Journal of Toxicology and Environmental Health Part A – 1996</i> <i>Part B: Critical Reviews - 1999</i> <i>Microbial Ecology in Health and Disease</i>	<a href="http://www.tandf.co.uk/">http://www.tandf.co.uk/</a>
<b>Wiley</b> <i>Environmental Toxicology and Water Quality - 1995</i> <i>Journal of Applied Toxicology 1997-</i> <i>Journal of Biochemical and Molecular Toxicology - 1997</i> <i>Pest Management Science (ex Pesticide Science) - 1999</i>	<a href="http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/home">http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/home</a>

**Tabella 3. Selezione di repertori di periodici disponibili gratuitamente in Internet.**  
**Fonte: Biblioteca Istituto Superiore di Sanità (aggiornamento al dicembre 2003)**

Repertorio	Sito web
Directory of Open Access Journals <i>a cura delle Lund University Libraries</i>	<a href="http://www.doaj.org/">http://www.doaj.org/</a>
Elenco di periodici con accesso gratuito da un mese ad un anno <i>dalla pubblicazione di Bernard Sebastian Kamps</i>	<a href="http://www.freemedicaljournals.com/">http://www.freemedicaljournals.com/</a>
Elenco dei periodici a testo pieno (full-text) <i>a cura della Biblioteca Medica Statale di Roma</i>	<a href="http://biblioroma.sbn.it/medica/ejnl/fulltext.htm">http://biblioroma.sbn.it/medica/ejnl/fulltext.htm</a>
Riviste con accesso libero alle annate pregresse <i>a cura della Biblioteca Centrale dell'Area Biomedica dell'Università di Cagliari</i>	<a href="http://pacs.unica.it/biblio/free.htm">http://pacs.unica.it/biblio/free.htm</a>

## Conclusioni

Si è lungi dal pensare che questo breve lavoro possa essere considerato esaustivo della trattazione del problema che solleva, ovvero quello della terminologia nella ricerca per soggetto nel recupero dell'informazione.

Oltre alla necessità di una padronanza di tecniche e strumenti per questo tipo di ricerca, su cui ci si è soffermati sopra, occorre anche considerare che quando si esplicita il bisogno di trovare fatti e informazioni su determinati soggetti, ciò di cui si ha necessità non riguarda la ricerca di puri e semplici dati e informazioni ma, solitamente, la loro valutazione per una possibile e immediata assimilazione all'interno di un quadro di riferimento. In tal senso, proprio perché l'informazione è strettamente correlata a tale bisogno e, perciò, sottoposta ad un giudizio soggettivo, alcune fonti sostengono che difficilmente si riesce ad affermare di aver portato a termine la ricerca di informazioni in modo conclusivo (11). Ciò, ovviamente, non rende meno necessaria l'esigenza di rendere omogenea l'interpretazione, il significato, l'applicabilità di un termine, ponendo il problema della corretta divulgazione del messaggio non solo al di fuori della cerchia degli addetti ai lavori ma, altresì, anche tra gli stessi esperti del settore.

Un intervento di questo tipo, dunque, è apparso utile all'interno di una pubblicazione che ospita lavori di specialisti e di operatori del Servizio Sanitario Nazionale, soprattutto quale spunto per una più approfondita riflessione sull'argomento, oggi ancora più attuale, visto il continuo ampliamento delle superstrade dell'informazione e con un immediato risvolto pratico: l'invito ad approfondire l'individuazione di precisi soggetti e/o *key word*, qualora richiesti, relativi ad un lavoro da pubblicare.

## Riferimenti bibliografici

1. Calicchia M.C, Aulicino F.A, Volterra L. Proposte di aggiornamento bibliografico. In: *La contaminazione microbiologica degli ambienti idrici e le fonti di contaminazione: aspetti igienico-sanitari e metodologici, Workshop organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità, Riassunti*. Roma, 26-27 ottobre 1998. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1998. (ISTISAN Congressi 56).
2. Calicchia MC, Aulicino FA, Volterra L. Proposte di aggiornamento bibliografico. In: Volterra L, Aulicino FA (Ed.). *Acque di falda: stato dell'arte delle conoscenze in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1999. (Rapporti ISTISAN 99/32).
3. Basili C, Pettenati C. *La biblioteca virtuale*. Milano: Edizione Bibliografica; 1994.

4. Kent A, *et al.* (Ed.). *Encyclopedia of Library and Information Science* (ELIS). New York: Dekker; 1980.
5. Foskett AC. *The subject approach to information*. 5th edition. London: Library Association Publishing; 1996.
6. *Encyclopedia of Environmental Biology*. 3 voll. W.A. Nierenberg (Ed.). San Diego, California: Academic Press; 1995.
7. Paenson I. *Environment in key words. A multilingual handbook of the environment*. Oxford: Pergamon Press; 1990.
8. Aschero B. *Manuale pratico di soggettazione. Esercizi graduati per l'apprendimento*. Milano: Editrice Bibliografica; 1982.
9. Trigari M. *Come costruire un thesaurus*. Modena: F.C. Panini; 1992.
10. Ridi R. *Internet in Biblioteca*. Milano: Editrice Bibliografica; 1998.
11. Oddy P. *Future libraries future catalogues*. London: Library Association Publishing; 1997.

# **ACQUE DI FALDA DELLA PROVINCIA DI CATANIA: ESPERIENZE SU NUOVI PARAMETRI DI CARATTERIZZAZIONE DELLA QUALITÀ**

Marta Finocchiaro, Maria Rita Pinizzotto

*Dipartimento Provinciale di Catania, Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Sicilia, Catania*

## **Introduzione**

Le indagini microbiologiche sulle acque destinate al consumo umano sono, ancora oggi rivolte esclusivamente alla definizione della sicurezza igienica dell'acqua e quindi alla prevenzione del rischio sanitario. Questo tipo di approccio appare particolarmente riduttivo per le acque di falda, dove il solo accertamento dell'assenza di contaminazione fecale non assicura che non vi sia un possibile successivo scadimento dell'acqua condottata, che potrebbe anche essere imputabile a forme autoctone in grado di colonizzare le reti di distribuzione. Inoltre, gli effetti di un tale deterioramento, che in ambito strutturale e gestionale possono avere gravi conseguenze economiche, sono più subdoli perché procrastinati nel tempo (1).

Il fatto è che nel settore specifico delle acque di falda, più che in altri ambienti idrici, le conoscenze sono carenti e soprattutto mancano riferimenti normativi che specificino i parametri indicatori da controllare, quando ricercarli e come indagarli.

A questo scopo l'Istituto Superiore di Sanità ha definito un Programma Triennale di ricerca dal titolo "Acque di falda: nuovi indicatori di qualità e rischio sanitario" (2), che ha avuto fra i suoi obiettivi la definizione e l'applicazione di nuovi protocolli analitici per la verifica della presenza e consistenza della componente biologica e microbiologica di falda.

In particolare, è stato previsto che la determinazione dei parametri classici del controllo routinario venisse affiancata alla ricerca di parametri non inclusi nelle normative vigenti nel settore e per questi ultimi sono state impiegate nuove metodologie approntate attingendo sia alla letteratura di settore che all'esperienza concreta dei collaboratori al progetto stesso. Lo scopo finale è stato, in questo caso, quello di provare materiali e procedure analitiche innovativi rispetto a quelli normalmente utilizzati nella biologia e microbiologia dell'acqua, per poter meglio definire metodi di campionamento e di analisi volti ad una caratterizzazione più particolareggiata delle acque di falda.

## **Materiali e metodi**

### **Fonti di approvvigionamento e punti di prelievo**

Per l'applicazione del protocollo sono state selezionate due fonti di approvvigionamento che attingono acqua dal sottosuolo (oltre 100 m di profondità) in due diversi versanti del massiccio vulcanico dell'Etna, precisamente:

- Galleria Tavolone (versante SE), con le sue stazioni di pompaggio sotterranee Stazzone e Odigitria;
- Pozzo Poggio del Monaco (versante NW).

Le ragioni della scelta risiedono nella constatazione che nell'acqua di reti idriche alimentate da queste acque, da qualche anno viene costantemente registrata la presenza di elementi figurati.

Galleria Tavolone fa parte di un complesso sistema di opere idrauliche, costituito primariamente da alcune gallerie drenanti, con uno sviluppo lineare di diversi chilometri, realizzate oltre un secolo fa sul versante sudorientale dell'Etna a bassa quota. In seguito allo sviluppo urbanistico dell'area le opere hanno però perduto nel tempo la loro funzione drenante a causa del proliferare di pozzi a monte che, con il loro esercizio, hanno contribuito ad abbassare notevolmente il livello della falda. Negli anni '60 sono state pertanto effettuate dall'Ente gestore del servizio idrico (oggi S.Idr.A) delle modifiche sostanziali che hanno trasformato queste opere in semplici canali sotterranei di eduazione delle acque emunte da pozzi perforati a notevole profondità a partire dal piano delle gallerie stesse, pozzi che rappresentano le sole opere produttive del sistema. In particolare, all'interno della Galleria Tavolone sono stati realizzati complessivamente 19 pozzi verticali trivellati a partire dal piano galleria: 12 di essi realizzati in località Stazzone e 7 ubicati in località Odigitria ad una profondità media di -120 m rispetto al piano galleria e perciò di circa -200 m dal piano di campagna.

Dai pozzi l'acqua viene immessa nel canale sotterraneo dove scorre ben visibile sul fondo, con una portata media di circa 600 L/s e una profondità di 70-80 cm. Galleria Tavolone è in gran parte percorribile poiché a 20-50 cm dal pelo dell'acqua delle traversine metalliche ancorate lateralmente sostengono una corsia centrale calpestabile e binari per il transito dei carrelli di trasporto del materiale di manutenzione. Poco prima della fine del cunicolo un dislivello di 70-80 cm provoca la caduta dell'acqua in una sorta di vasca di colma lunga e stretta che finisce ad imbuto nel punto in cui inizia la canalizzazione dell'acquedotto quando l'acqua scompare alla vista. Questa, dopo una fase di clorazione, entra nella rete idrica di Catania e di altri comuni dell'hinterland.

Pozzo Poggio Monaco è un pozzo trivellato circa 18 anni or sono in un'area ricadente nel territorio comunale di Maletto (località Poggio del Monaco) in zona B del parco dell'Etna, sul versante Nord-ovest del massiccio vulcanico, ad un'altitudine di circa 1200 m s.l.m. La profondità totale della trivellazione è di -210 m dal piano di campagna, ma l'acqua viene captata a -195 m; in anni recenti la pompa è stata infatti sollevata allo scopo di ottenere un'acqua più limpida e priva di residui. Il personale addetto ha però riferito che, nonostante questo accorgimento, dopo ogni pioggia di rilievo si manifestano fenomeni di intorbidamento.

Nelle vicinanze l'area è coperta da una vegetazione spontanea boschiva (querce e lecci) e non sono visibili costruzioni di alcun tipo se si eccettua il casotto degli attrezzi a pochi metri dal pozzo, che ospita anche il gruppo elettrogeno per l'alimentazione elettrica della pompa di sollevamento (la zona non è servita dalla rete elettrica) con relativo serbatoio di accumulo carburante che è interrato e impermeabilizzato. Al momento del prelievo sono in atto lavori di recinzione dell'area di tutela assoluta che, attualmente, è invasa da vegetazione erbacea spontanea. A circa 300 m dal pozzo si intravede, coperto dagli alberi, un conetto vulcanico non più attivo. L'acqua viene emunta dal pozzo in maniera discontinua: nella stagione invernale la pompa funziona in continuo per 24-48 h e rimane poi ferma per 2-3 giorni, mentre in estate, per sopperire alla maggiore richiesta idrica, viene allungato il periodo di emunzione.

L'acqua viene stivata in un serbatoio ubicato a valle e distante dal pozzo alcuni chilometri, previo trattamento chimico per l'abbattimento del ferro e del manganese (ossidazione con ipoclorito e permanganato e filtrazione). Considerato che la vecchia tubazione, visibile in superficie perché non interrata, mostrava vistose manifestazioni di corrosione passante che causavano notevoli perdite idriche e un grave scadimento dell'acqua, la condotta di collegamento fra pozzo e serbatoio è stata recentemente sostituita.

I punti di prelievo sono stati i seguenti:

- Galleria Tavolone – acqua del canale (ove confluiscono le acque di tutte le 19 trivellazioni)
- Galleria Tavolone – stazione di pompaggio Stazzone, pozzo n. 3
- Galleria Tavolone – stazione di pompaggio Odigitria, pozzo n. 2
- Pozzo Poggio Monaco.

## Parametri analitici e metodi

Le analisi hanno riguardato la ricerca dei microrganismi elencati nella Tabella 1.

**Tabella 1. Gruppi di microrganismi rilevati**

Gruppo	Specifiche dei gruppi	
Conta batterica totale	Germi psicrofili emolitici	<i>streptomicina resistenti</i> <i>streptomicina sensibili</i>
	Germi psicrofili non emolitici	<i>streptomicina resistenti</i> <i>streptomicina sensibili</i>
	Germi mesofili emolitici	<i>streptomicina resistenti</i> <i>streptomicina sensibili</i>
	Germi mesofili non emolitici	<i>streptomicina resistenti</i> <i>streptomicina sensibili</i>
Conta batterica al microscopio		
Microrganismi filamentosi		
Metazoi		
Batteri presenti in metazoi		

### Conta batterica totale

Per la valutazione della Conta Batterica Totale (CBT) ai sensi del DPR 236/1988 (3), i campioni sono stati seminati per inclusione di aliquote di 1 mL di acqua in *Plate Count Agar* (PCA), con incubazione a 36 °C e a 22 °C rispettivamente per 48 h e per 72 h e successiva conta delle colonie sviluppate.

Parallelamente il Programma Triennale di ricerca ha previsto l'applicazione di un metodo innovativo, idoneo sia alla enumerazione che alla differenziazione dei germi ambientali che, in funzione dei contatti che il mondo sotterraneo ha avuto con l'ambiente esterno, hanno potuto acquisire eventualmente resistenza agli antibiotici e/o capacità emolitiche.

A tale scopo, 2 aliquote da 1 e 10 mL di campione sono state filtrate attraverso membrane filtranti in nitrato di cellulosa (porosità 0,45 µm), successivamente poste su piastre di Agar Sangue (AS) e incubate rispettivamente a 22±1 °C per 5-7 giorni (per il rilevamento di psicrofili) e a 30±1 °C per 72 h (per il rilevamento di mesofili). Sono state enumerate le colonie eventualmente sviluppatesi già dopo 24 h e a fine incubazione sono state differenziate quelle emolitiche da quelle non emolitiche, verificando sul retro delle membrane la presenza o meno di aloni di emolisi.

Per il saggio di antibiotico-resistenza è stato proposto l'impiego della streptomicina scelto come marcatore, in quanto esempio di antibiotico non più in uso ma che ha avuto in passato una larga diffusione. A tale scopo, le membrane con le colonie sviluppatesi su AS sono state trasferite su piastre contenenti Antibiotic Medium n. 2 contenente streptomicina alle concentrazioni finali di 0,1 e 1 mg/piastra (20 mL di terreno). Quindi, con un ago sterilizzato di

volta in volta è stata forata la membrana al centro di ogni colonia per portare le colonie a contatto con l'agar contenente l'antibiotico. Le piastre sono state incubate per 24-48 ore alle temperature di provenienza delle rispettive membrane. È stata verificata, quindi, la crescita (o l'assenza di crescita) sul terreno contenente l'antibiotico. Le colonie resistenti alla streptomina e quelle emolitiche sono state isolate e conservate per ulteriori accertamenti.

### Conta batterica diretta al microscopio

Per ottenere una stima del numero totale dei microrganismi presenti nell'acqua, comprese le forme non coltivabili o scarsamente coltivabili (che sono la quota prevalente nell'ambiente estremo e particolare quale è quello dell'acqua di falda), il protocollo di lavoro ha previsto l'effettuazione delle conte batteriche al microscopio.

Il metodo proposto prevedeva la fissazione del campione con glutaraldeide (5 g di glutaraldeide in 100 mL di tampone fosfato), la colorazione dei batteri con arancio di acridina (1% p/v in tampone fosfato), la filtrazione dello stesso su membrane in policarbonato a pori cilindrici 0,22 µm che, dopo diafanizzazione con olio da immersione, venivano esaminate in epifluorescenza a 1000X con obiettivo ad immersione.

Tuttavia, poiché il nostro Laboratorio risulta in atto sfornito di microscopio a fluorescenza, si è voluto sperimentare una modifica del metodo proposto, come di seguito specificato:

#### – *Materiali*

Tampone fosfato, fissativo, colorante, olio da immersione, vetreria monouso o in vetro sterilizzato al calore secco

#### – *Preparazione dei materiali*

- Tampone fosfato: sciogliere 13,6 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 litro di acqua distillata. Portare il pH a 7,2 e filtrare su MF con pori da 0,22 micron.
- Fissativo: sciogliere 5 g di glutaraldeide in 100 mL di tampone fosfato
- Colorante: sciogliere 0,1 g di blu di metilene in 100 mL di tampone fosfato pH 7,2. Filtrare la soluzione attraverso membrane di 0,22 µm, per eliminare eventuali residui solidi e rendere perciò più agevole l'osservazione.

#### – *Procedimento*

1. Fissare preventivamente il campione in glutaraldeide (9 volumi di campione + 1 volume di glutaraldeide). Il campione fissato può essere mantenuto per 3 settimane a +4 °C.
2. Omogeneizzare il campione fissato ed eventualmente eseguire diluizioni 1:10 in tampone fosfato pH 7,2. Colorare, in un recipiente sterilizzato al calore secco, 1 mL di campione fissato con 1 mL di colorante. Lasciare in contatto per 8 minuti e filtrare attraverso membrane filtranti con pori cilindrici da 0,22 µm (preferibilmente in policarbonato), sciacquando con 2-3 mL di tampone fosfato prima e dopo la filtrazione. Lasciare asciugare la membrana per qualche minuto controllando che non vi restino tracce di umidità.
3. Montare la membrana o una sua parte su vetrino diafanizzandola con l'aggiunta di olio da immersione. Esaminare a 1000X con obiettivo ad immersione, (olio di cedro BDH), verificando se in almeno 10 campi casuali le cellule batteriche, che appaiono colorate in blu scuro, siano omogeneamente distribuite (almeno 10-50 cellule per campo). Contare il numero di cellule in almeno 20 (meglio se 50) quadrati di una griglia predisposta nell'oculare, con area definibile in base all'ingrandimento e applicare la formula riportata:

$$\text{Cellule totali/mL} = N_i \times A/a \times 1/n_i \times 1/V$$

dove:  $N_i$  = Numero totale di cellule in tutti i campi osservati  
 $A$  = area della membrana filtrante  
 $a$  = area del campo microscopico  
 $n_i$  = numero dei campi  
 $V$  = volume di campione filtrato

### Microrganismi filamentosi

I microrganismi filamentosi sono fra i principali responsabili della formazione, all'interno delle strutture in cui l'acqua transita, di masse biofilmanti che generano problemi sia di ordine tecnologico, ad esempio biocorrosione dei manufatti idraulici (4), che igienico sanitario, quali il rilascio nell'acqua di porzioni più o meno estese di biofilm (5, 6) che può potenzialmente includere anche patogeni opportunisti e forme di vita superiore protozoaria e metazoaria (7), alterazioni organolettiche dell'acqua, inefficienza dei processi disinfettivi, ecc. Per quanto detto, una caratterizzazione in questo senso dell'acqua alla captazione può fornire preziose indicazioni sulle probabili conseguenze in rete e perciò orientare eventualmente verso opportuni processi di trattamento.

#### – Procedimento

1. Filtrare diverse quantità di acqua in funzione del contenuto in microrganismi filamentosi (da pochi mL fino ad 1 litro) attraverso membrane filtranti da 0,45  $\mu\text{m}$ . Lasciare asciugare bene, porre metà delle membrane su vetrino portaoggetti e diafanizzare con olio da immersione.
2. Osservare a diversi ingrandimenti in campo chiaro o, preferibilmente, in contrasto di fase.
3. Enumerare i filamenti in 5-7 campi microscopici calcolando il n/mL secondo la formula:

$$n/mL = N_i \times (A/a) \times (n_i \times V)^{-1}$$

dove:  $N_i$  = Numero totale di cellule in tutti i campi osservati  
 $A$  = area della membrana filtrante  
 $a$  = area del campo microscopico  
 $n_i$  = numero dei campi  
 $V$  = volume di campione filtrato

### Metazoi

La ricerca e caratterizzazione dei metazoi eventualmente presenti nelle acque di falda è importante ai fini di utilizzare questi organismi superiori sia come indicatori di qualità ambientale (8-10) sia per valutare i possibili rischi igienico-sanitari connessi alla loro presenza in acque destinate al consumo umano (11-13).

#### – Procedimento

1. Filtrare a bassa depressione 1-20 litri di acqua attraverso membrane filtranti a pori cilindrici di 5  $\mu\text{m}$  di diametro.
2. Lavare le membrane con alcuni millilitri dell'acqua filtrata in modo da trasportare il materiale trattenuto su di esse entro un contenitore (pozzetto, capsula Petri). Controllare la presenza di eventuali residui sulla membrana.
3. Il materiale, eventualmente concentrato centrifugando a bassa velocità l'acqua di lavaggio, può essere osservato al microscopio ottico, a fresco o dopo fissazione in soluzione di formalina (ac.propionico o acetico al 10-15% e formalina al 2,5%).

4. In alternativa si può concentrare per sedimentazione in coni posti in camera frigorifera, a partire da 1-2 litri di acqua. Il precipitato può essere ulteriormente concentrato per centrifugazione a bassi regimi di giri usando provette da 50 mL a fondo conico.
5. Esaminare il materiale raccolto al microscopio a luce diretta con ingrandimenti 100-400X.

L'osservazione dei microrganismi in vivo consente una più semplice identificazione. Le stime possono essere registrate come: *presenza rara, frequente, abbondante*.

### Batteri presenti nei metazoi

Il rischio sanitario imputabile alla presenza di metazoi potrebbe essere correlato al possibile ruolo di vettori che queste forme di vita superiore possono svolgere nei confronti di microrganismi di interesse sanitario, in virtù della loro capacità di inglobare o trasportare microrganismi adesi al loro corpo proteggendoli dai processi disinfettivi (14, 15). Se questi trattamenti rallentano l'attività metabolica del vettore, possono d'altro canto far sopravvivere più a lungo i batteri ingeriti come nutrimento che invece, in condizioni normali, verrebbero digeriti in poche ore.

Si tratta di una procedura da eseguire solo su forme vive.

#### – Procedimento

1. Raccogliere in una piastra Petri il numero di metazoi che si vuole analizzare in pochi mL d'acqua sterile e disinfettarli con NaClO in concentrazione tale da avere un cloro residuo di 10-15 ppm. Dopo 30 minuti di contatto interrompere l'azione del cloro con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dosato stechiometricamente.
2. Verificare l'effetto della disinfezione mediante semina di 1 mL di liquido in PCA o altro terreno idoneo per la conta degli eterotrofi. Se la carica è uguale a zero, la disinfezione è stata efficace.
3. Distruggere il corpo dei metazoi omogeneizzandoli sterilmente e mantenendo la temperatura inferiore a 30 °C. L'omogenato è quindi pronto per le successive analisi microbiologiche.

## Risultati

Nelle Tabelle 1, 2, 3, 4a e 4b sono riportati i risultati ottenuti nell'ambito dei quattro campionamenti eseguiti nel corso del primo anno di lavoro, in relazione alla presenza di microrganismi psicrofili e mesofili, emolitici/non emolitici, antibiotico resistenti/sensibili.

Per quanto attiene l'antibiotico-resistenza, in una prima fase il metodo è stato provato utilizzando una concentrazione di streptomina di 0,5 mg/piastra; avendo però riscontrato la crescita e perciò la resistenza di gran parte delle colonie sviluppatesi su AS (Tabella 3), nelle prove su campioni successivi è stata raddoppiata la concentrazione a 1 mg/piastra.

**Tabella 1. Galleria Tivolone - Pozzo Stazzone n. 3: CBT su AS e differenziazione in base alle caratteristiche emolitiche e di antibiotico-resistenza**

Conte batteriche totali		Emolitici		Non emolitici	
		<i>sensibili</i>	<i>resistenti *</i>	<i>sensibili</i>	<i>resistenti*</i>
Psicrofili (UFC/1 mL)	3	0	1	0	2
Mesofili (UFC/10 mL)	5	0	0	5	0

\*Antibiotico-resistenza su Antibiotic Medium n. 2 Oxoid+Streptomina 1 mg/piastra (50 mg/litro)

**Tabella 2. Galleria Tavolone - Pozzo Odigitria n. 2: CBT su AS e differenziazione in base alle caratteristiche emolitiche e di antibiotico-resistenza**

Conte batteriche totali		Emolitici		Non emolitici	
		sensibili	resistenti *	sensibili	resistenti*
Psicrofilii (UFC/1 mL)	10	0	1	5	4
Mesofili (UFC/10 mL)	11	0	0	5	6

\*Antibiotico-resistenza su Antibiotic Medium n. 2 Oxoid+Streptomicina 1 mg/piastra (50 mg/litro)

**Tabella 3. Galleria Tavolone - Galleria drenante:CBT su AS e differenziazione in base alle caratteristiche emolitiche e di antibiotico-resistenza**

Conte batteriche totali		Emolitici	Antibiotico-resistenti *
Psicrofilii (UFC/1 mL)	120	11	46
Mesofili (UFC/10 mL)	53	0	53

\* Antibiotic Medium n. 2 + di Streptomicina 0,5 mg/piastra (25 mg/litro)

**Tabella 4a. Pozzo Poggio Monaco: CBT su AS e differenziazione in base alle caratteristiche emolitiche e di antibiotico-resistenza**

Conte batteriche totali		Emolitici	Antibiotico-resistenti *
Psicrofilii (UFC/1 mL)	162	0	-
(UFC/10 mL)	1500	8	2
Mesofili (UFC/1 mL)	114	0	-
(UFC/10 mL)	990	6	3

\*Antibiotico-resistenza su Antibiotic Medium n. 2 Oxoid + Streptomicina 1 mg/piastra (50 mg/litro)

**Tabella 4b. Pozzo Poggio del Monaco: morfologia e antibiotico-resistenza delle colonie (UFC) non emolitiche**

Membrane di provenienza	Caratteristica delle colonie	N. Colonie cresciute dopo trapianto su Antibiotic Medium n. 2 + streptomicina*	Colonie antibiotico-resistenti
Mesofili da AS (1 mL)	2 grandi arancio	2	0
	2 medie giallo limone	2	1
	110 puntiformi gialle	4	0
Mesofili da AS (10 mL)	10 grandi arancio	2	1
	52 medie varie tipologie	3	0
	Circa 900 puntiformi gialle	4	0
	1 verdastra	1	
Psicrofilii da AS (1 mL)	161 di 6 differenti tipologie	6	6
Psicrofilii da AS (10 mL)	10 arancio grosse	3	1
	132 medie gialle	3	0
	1300 puntiformi	6	0

\*Antibiotic Medium n.2 + Streptomicina 1 mg/piastra (50 mg/litro)

Relativamente a questo metodo si segnalano le seguenti difficoltà:

- I tempi di incubazione proposti sono risultati troppo lunghi; se rispettati, da una parte non hanno portato a sviluppo di nuove colonie, dall'altra hanno favorito una crescita eccessiva che ha creato sovrapposizioni e confluenze degli aloni emolitici con problemi al momento della classificazione delle colonie secondo lo schema indicato dal metodo. Si propone

quindi di ridurre i tempi di incubazione a non oltre 4 giorni per le piastre incubate a 22 °C e non oltre 2 giorni per quelle a 30 °C. Tempi più lunghi sarebbero proponibili solo per i casi di crescita ridotta o addirittura assente.

- L'AS, essendo un terreno molto ricco, consente lo sviluppo di un maggior numero di microrganismi di quanto permetta il PCA, utilizzato nella routine per la valutazione della carica microbica. La superficie delle membrane è ridotta rispetto a quella delle comuni piastre utilizzate nella semina per inclusione. Laddove la crescita è avvenuta in misura limitata (Tabelle 1 e 2) non si creano particolari problemi. Nei casi in cui le colonie sviluppate su AS superano il centinaio (Tabelle 3, 4a e 4b), è facile che si creino delle confluenze di colonie che possono rendere complicato, se non il semplice conteggio, la distinzione tra quelle che danno luogo ad emolisi e il loro inoculo sul terreno all'antibiotico. Tuttavia, riducendo i volumi filtrati si corre il rischio che le aliquote esaminate non siano più rappresentative del campione, almeno nel caso in cui, piuttosto che verificare il rispetto di limiti di legge, si voglia avere una caratterizzazione "fine" dell'acqua analizzata. Ad esempio, nel campione "Poggio Monaco" con il metodo descritto sono state contate, con l'ausilio di uno stereomicroscopio, 1500 colonie di psicofili/10 mL, di cui 8 emolitiche (Tabella 4a). Nessuna colonia emolitica è invece comparsa sulla membrana proveniente dalla filtrazione di 1mL, sulla quale sono comunque cresciute 162 UFC. In questo caso, essendosi verificata una crescita totale ridondante nel volume risultato maggiormente rappresentativo, non si è potuto procedere come previsto dal protocollo, ma si è dovuti ricorrere all'alternativa di sottoisolare le colonie su piastre diverse di Antibiotic Medium n. 2 + streptomina. Le colonie emolitiche, provenienti dalle MF della filtrazione di 10 mL, sono state tutte sottoposte alla prova, mentre le non emolitiche sono state prima contate e suddivise per tipologia e poi ne sono state trapiantate solo alcune rappresentative di ogni gruppo (Tabella 4/b). Questo sistema, pur non essendo statisticamente significativo, ha comunque fornito importanti indicazioni senza, però, portare alla classificazione prevista dal protocollo.

Con questo esempio si è voluto sottolineare come la scelta dei volumi da esaminare debba soddisfare sia requisiti di ordine qualitativo che quantitativo delle colonie e come la valutazione debba essere fatta di volta in volta secondo la tipologia del campione. In casi come quello appena descritto, una possibilità, abbastanza onerosa dal punto di vista pratico, potrebbe essere quella di analizzare il volume ritenuto e/o risultato più rappresentativo suddividendone la filtrazione su più MF da seminare su altrettante piastre di AS ed elaborare in seguito i risultati per riferirli al volume di partenza. Nei casi in cui si ipotizza invece una carica microbica relativamente bassa sarebbe opportuno esaminare contemporaneamente volumi diversi, scegliendo successivamente, per l'espressione del risultato, la MF che meglio soddisfi i requisiti di rappresentatività sopra esposti.

Una modifica che renderebbe, comunque, più facile incrociare i dati relativi alla capacità emolitica e all'antibiotico-resistenza, potrebbe essere infine quella di inoculare su piastre differenti di Antibiotic Medium n. 2 + streptomina le colonie emolitiche e quelle non emolitiche. Con questo sistema potrebbero essere superate alcune difficoltà di ordine pratico legate alla ricostruzione della posizione delle colonie sulla membrana.

Dati interessanti vengono altresì forniti dal metodo per l'enumerazione diretta di cellule batteriche al microscopio. Utilizzato di norma in studi di idrobiologia, il protocollo adottato per il triennale è risultato inapplicabile nel nostro laboratorio in atto sprovvisto dell'apparecchiatura specifica per l'osservazione in epifluorescenza (16-18). Pertanto, si è pensato di sostituire il colorante arancio di acridina con il blu di metilene, che ha consentito un'osservazione sufficientemente chiara delle cellule batteriche anche alla luce ordinaria di un normale microscopio ottico.

Al fine di valutare l'efficienza del metodo è stato approntato un campione artificiale, costituito da una sospensione di un ceppo da collezione di *Pseudomonas fluorescens* (P17) in tampone fosfato a pH 7,2 preventivamente filtrato su MF con pori da 0,22 µm. Questo è stato suddiviso in due aliquote: 9 mL sono stati fissati con 1 mL di glutaraldeide al 5% mentre, con la parte rimanente, sono state eseguite delle diluizioni e seminati 0,1 mL di ognuna su piastre di PCA, in triplicato. È stato anche allestito un controllo negativo costituito dallo stesso tampone fosfato non inoculato. Eguali volumi (1 mL) di campione e della soluzione di controllo sono stati colorati per 8 minuti con 1 mL di blu di metilene 0,1% e successivamente filtrati su membrane in policarbonato a pori cilindrici da 0.22 µm.

Sulla membrana del controllo negativo non si sono osservate cellule batteriche. Il conteggio dei batteri eseguito su 20 campi microscopici (area del campo 0.029 mm<sup>2</sup>) della membrana relativa al campione ha dato come risultato un valore di 4.4 x 10<sup>6</sup> cellule/mL.

I dati relativi alla crescita su PCA, opportunamente elaborati, hanno portato a stimare una carica batterica di 4,7 x 10<sup>6</sup> UFC/mL (Figura 1).

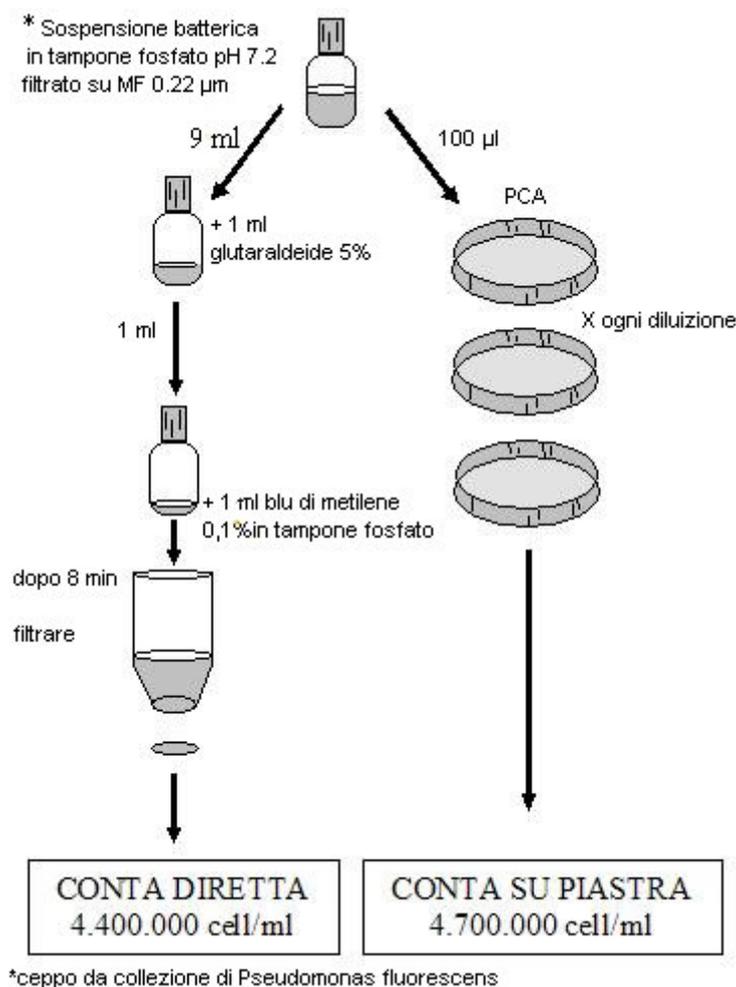


Figura 1. Verifica metodo Conta diretta

I due risultati sono abbastanza sovrapponibili, specie se si tiene conto delle diluizioni eseguite; c'è però da considerare che essi si riferiscono ad un campione artificiale in cui gli elementi di disturbo ottico erano ridotti al minimo.

Diversa è la situazione quando ci si trova di fronte ad un campione reale che può spesso avere impurezze di vario genere che disturbano l'osservazione e la conta. È importante ridurre al minimo queste interferenze.

Anche sul controllo negativo della prova citata era presente materiale solido, anche se in quantità abbastanza contenuta, che aveva assorbito il colorante. In questo caso lo stesso materiale non può che provenire dalla vetreria utilizzata; a tal proposito sarebbe probabilmente opportuno prevedere, alla fine del lavaggio della stessa, un risciacquo finale con acqua filtrata o una insufflazione di aria compressa filtrata, prima della sterilizzazione al calore secco. Un'alternativa potrebbe essere costituita dall'utilizzo di sola vetreria sterile monouso.

Il confronto dei risultati ottenuti con il metodo modificato di conteggio diretto al microscopio con la conta delle UFC enumerate su AS e PCA, viene riportato in Tabella 5, che evidenzia l'enorme divario tra le cellule effettivamente presenti nei campioni e quelle dotate di capacità di crescita, rilevabili con i comuni metodi colturali.

**Tabella 5. Confronto fra tre metodi per la determinazione della carica batterica**

Terreni/ metodi	Gruppi microbici	Stazione pozzo n. 3	Odigitria pozzo n. 2	Poggio Monaco
PCA	Psicrofili	0 UFC/mL	0 UFC/mL	60 UFC/mL
	Mesofili	0 UFC/mL	0 UFC/mL	114 UFC/mL
AS	Psicrofili	3 UFC/mL	10 UFC/10 mL	162 UFC/mL
	Mesofili	5 UFC/10 mL	11 UFC/10 mL	114 UFC/mL
Conta diretta		35x10 <sup>4</sup> cellule/mL	35x10 <sup>4</sup> cellule/mL	1x10 <sup>6</sup> cellule/mL

Per quanto riguarda i microrganismi filamentosi, si deve rilevare che non tutti quelli presenti nei campioni esaminati erano ben evidenziabili sulle membrane filtranti. Infatti l'osservazione microscopica diretta di preparati fresco, eseguita in parallelo su materiale proveniente da una sedimentazione degli stessi campioni, consentiva di evidenziare anche altri microrganismi, non apprezzabili con il metodo proposto. Ad esempio nei preparati a fresco, relativi ai campioni prelevati in Galleria Tavolone, sono stati osservati, oltre a *Gallionella ferruginea*, altri ferrobatteri filamentosi provvisti di guaina (probabilmente ascrivibili al genere *Chrenotrix*), che erano invece scarsamente evidenziabili sulla membrana di filtrazione. Per questi ultimi microrganismi, allo stato attuale dei lavori, potrebbero risultare più indicati sistemi di conteggio di tipo statistico, sulla falsariga di quelli utilizzati per la stima dei microrganismi filamentosi nei campioni di fanghi attivi dei depuratori, applicati su campioni concentrati (19).

Il metodo proposto è risultato invece di semplice applicazione per la conta dei filamenti prodotti da *Gallionella ferruginea*, in quanto facilmente individuabili sulla membrana di filtrazione. Vista però la tendenza dei filamenti ad aggregarsi in strutture reticolate individuabili anche ad occhio nudo sul fondo del contenitore, la precisione nel conteggio è subordinata all'effettuazione di una prolungata omogeneizzazione del campione, volta a disperdere il più possibile i filamenti nel mezzo acquoso (Tabella 6).

**Tabella 6. Numero di filamenti di *Gallionella ferruginea* evidenziati nei campioni esaminati**

Punto di prelievo	Campioni	Volume filtrato	N. filamenti/mL <i>Gallionella ferruginea</i>
Galleria Tavolone	25/01/99	300 mL	289
Odigitria Pozzo n. 2	07/06/99	1000 mL	87
Stazzone Pozzo n. 3	01/07/99	1000 mL	18

Per quanto riguarda la ricerca e l'identificazione dei Metazoi, è stato osservato che i due sistemi proposti per la concentrazione devono essere utilizzati alternativamente secondo la tipologia del campione. Nel caso in questione, infatti, mentre il metodo della filtrazione è risultato idoneo per i campioni provenienti dalla Galleria Tavolone, ha creato invece qualche problema quando applicato a quelli del pozzo Poggio Monaco, a causa di un intasamento dei pori della MF già dopo il passaggio dei primi 100 mL. In questo caso si è fatto ricorso all'alternativa della concentrazione per sedimentazione e centrifugazione; la ricerca dei metazoi ha comunque dato esito negativo.

Per quanto riguarda la filtrazione, le difficoltà sono connesse al possibile intasamento dei pori della membrana e alla successiva rimozione del materiale che può attaccarsi anche tenacemente alla stessa. La concentrazione per sedimentazione e centrifugazione è un buon sistema, da adottare però solo nei casi in cui il materiale solido, Metazoi compresi, sia apprezzabile in quantità d'acqua relativamente basse (max 5 litri); questo metodo non è quindi proponibile per acque molto "pulite", che richiedono la concentrazione di volumi ancora più grandi di quelli qui utilizzati, e perciò l'adozione di materiali ingombranti e di tempi lunghi nella preparazione del campione. Ambedue i metodi proposti dal protocollo implicano, comunque, il trasporto di grossi quantitativi d'acqua, cosa che mal si concilia con l'esigenza di praticità di cui bisogna in ogni caso tenere conto.

Per ovviare alle difficoltà sopra esposte si propone un metodo alternativo, che prevede l'isolamento del materiale da esaminare mediante filtrazione su reti di nylon con apertura di maglia 10-50  $\mu\text{m}$ . Data la elevata porosità non è necessario applicare pressioni negative, che potrebbero danneggiare gli animali, ritenendo la sola gravità sufficiente a garantire una filtrazione veloce con basso rischio di intasamento.

Questo sistema, a nostro avviso, presenta i seguenti vantaggi:

- *Economia di tempi*  
grandi volumi di acqua potrebbero essere concentrati in un tempo relativamente breve;
- *Praticità*  
il materiale necessario alla filtrazione si ridurrebbe al solo bicchiere con la rete adeguatamente attaccata al fondo, rete che verrebbe successivamente rimossa e trasportata in un piccolo contenitore con poca acqua filtrata; questo sistema consentirebbe di effettuare la concentrazione direttamente sul campo eliminando il trasporto di materiale ingombrante;
- *Velocità dell'esame microscopico*  
il materiale solido, durante la filtrazione, verrebbe sottoposto ad un continuo lavaggio, con la conseguente riduzione della componente limo argillosa; ciò comporterebbe la riduzione del volume alle sue parti più significative e, conseguentemente, una più semplice individuazione dei Metazoi nei preparati microscopici.

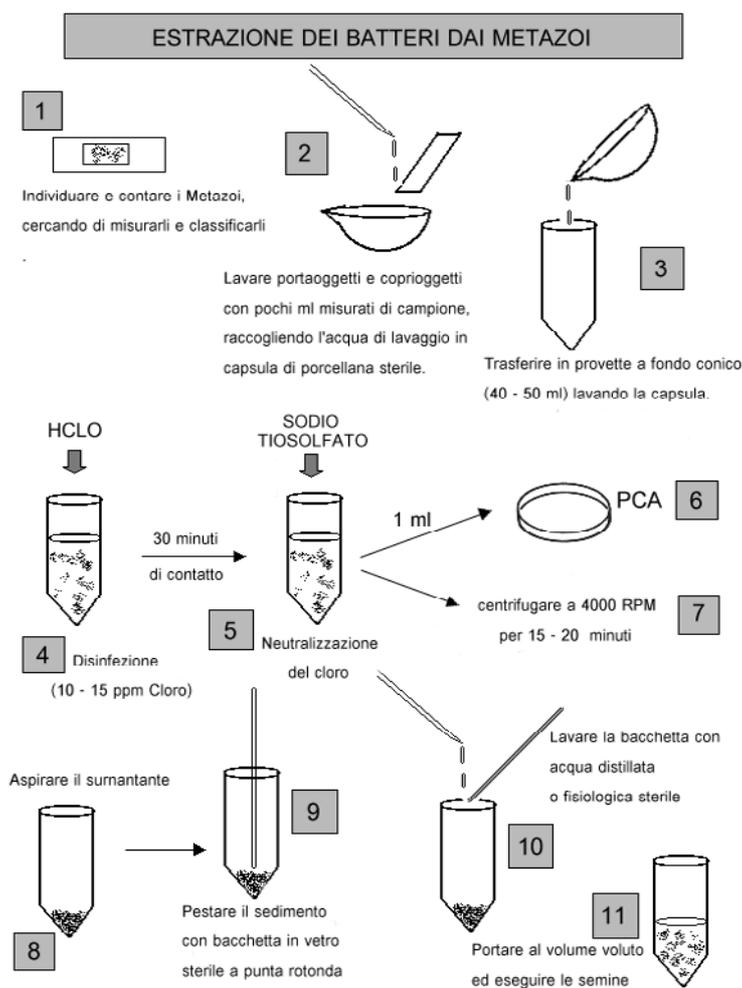
Infine, per quanto attiene all'estrazione dei batteri dall'intestino dei Metazoi, il metodo proposto è stato applicato sull'unico campione dove questi ultimi sono stati rinvenuti, e cioè

dalla Galleria Tavolone. Le dimensioni (lunghezza massima 1 mm) dei piccoli invertebrati presenti (Nematodi, Rotiferi, Turbellari, Crostacei, Anellidi Oligocheti), comportando micromanipolazioni, hanno richiesto piccole modifiche al protocollo di lavoro.

I metazoi preliminarmente individuati e contati al microscopio (Tabella 7) sono stati esaminati così come schematizzato in dettaglio in Figura 2.

**Tabella 7. Presenza di metazoi nei campioni esaminati**

Punto di prelievo	Metazoi osservati/10 litri
Galleria Tavolone – Galleria drenante	22 Rotiferi 3 Nematodi 3 larve di Copepodi 1 Platelminite Turbellare
Galleria Tavolone – Pozzo Odigitria n. 2	assenti
Galleria Tavolone– Pozzo Stazione n. 3	assenti
Pozzo Poggio Monaco	assenti



**Figura 2. Estrazione dei batteri dai Metazoi**

Subito dopo l'osservazione dei preparati, coprioggetto e portaoggetti sono stati lavati con pochi mL della stessa acqua campione, facendola defluire in una capsula di porcellana sterile dove si è così raccolta la fanghiglia diluita isolata per filtrazione da 10 litri d'acqua e contenente i Metazoi (n. 22 Rotiferi, n. 3 Nematodi, n. 1 Turbellare, n. 3 larve di Crostacei Copepodi) (20). La sospensione con gli animali è stata successivamente trasferita in una provetta da centrifuga a fondo conico da 35-40 mL, lavando la capsula con altra acqua per essere certi di aver trasferito tutti i Metazoi presenti. Misurando di volta in volta l'acqua utilizzata per tutti i lavaggi, è stato facile calcolare il volume finale della sospensione. La stessa è stata trattata con opportune quantità di NaClO al 7% opportunamente diluito, in modo da avere nel volume considerato una concentrazione di cloro compresa fra 13 e 14 ppm. Dopo 30 minuti di contatto si è neutralizzato il cloro con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dosato stechiometricamente e si è seminato 1 mL della sospensione in PCA per verificare l'efficacia della disinfezione. La sospensione rimanente è stata poi centrifugata a 4000 RPM per 20 min; successivamente è stato eliminato il surnatante fino a lasciare 3 mL di concentrato.

Con una bacchetta di vetro sterile a punta arrotondata (che aderisce perciò perfettamente al fondo della provetta) è stato omogeneizzato il materiale raccolto. Infine l'omogenato è stato portato ad un volume di 15 mL con acqua distillata sterile e sulla sospensione così ottenuta sono state eseguite le stesse analisi microbiologiche effettuate sull'acqua di provenienza. Alcuni risultati significativi ottenuti nella prova descritta sono riportati in Tabella 8 e confrontati con i valori di carica microbica determinati nell'acqua dove gli stessi metazoi sono stati rinvenuti.

**Tabella 8. Carica batterica sull'acqua della Galleria Tavolone e sull' omogenato di Metazoi isolati dalla stessa (n. 22 Rotiferi, n. 3 Nematodi, n. 1 Turbellare, n. 3 Crostacei Copepodi)**

Campione	Parametro	UFC/mL	Emolisi
Sospensione metazoi dopo trattamento con HClO e Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Verifica disinfezione (PCA 36 °C)	8	–
Omogenato	psicrofilii (AS)	500	Diffuse aree emolitiche
	mesofili (AS)	180	Diverse colonie emolitiche
Acqua	psicrofilii (AS)	120	11 colonie emolitiche
Galleria Tavolone	mesofili (AS)	53	Nessuna colonia emolitica

## Conclusioni

I risultati preliminari emersi in questa prima fase applicativa del progetto, consentono già alcune interessanti considerazioni.

Relativamente al parametro “colonie in agar a 36 °C e 22 °C”, così come proposto dal DPR 236/1988 per le acque destinate al consumo umano si è evidenziata la limitatezza del terreno di coltura previsto dalla normativa vigente per quanto concerne sia la quantificazione che la caratterizzazione della *facies* microbica di un campione di acqua. Già l'utilizzo di un terreno più ricco, quale l'AS, ha consentito di enumerare, in diversi casi, un numero significativamente più alto di UFC rispetto al comunemente usato PCA e ha inoltre fornito importanti informazioni su una interessante caratteristica di tali microrganismi, quale è la capacità emolitica, certamente inattesa in gruppi microbici il cui habitat è costituito da un ambiente apparentemente molto protetto come un'acqua di falda che, nei casi esaminati, viene attinta ad oltre 100 metri di profondità. La prova che tali microrganismi abbiano avuto dei “contatti”, anche se indiretti,

recenti o remoti, con specie di provenienza umana e/o animale, è altresì confermata dalla presenza di un numero consistente di colonie streptomicina-resistenti. Tali riscontri pongono una serie di interrogativi sul loro significato igienico-sanitario e perciò sul rischio potenziale conseguente al consumo di quest'acqua da parte di fasce deboli della popolazione.

Una valutazione globale dei dati ottenuti da tutti i collaboratori al progetto, relativamente a questo parametro, potrebbe forse dare consistenza a questi interrogativi e consentirebbe forse anche valutazioni sul rapporto costi/benefici dell'applicazione nella routine di questo metodo, sicuramente più costoso sia sul piano delle risorse umane che finanziarie ma più efficace nella caratterizzazione "fine" di un'acqua da destinare all'uso potabile.

Per quanto riguarda il metodo in sé, è emerso come il volume di acqua da filtrare rappresenti un fattore cruciale nella valutazione delle caratteristiche qualitative dell'acqua; un volume troppo ridotto può portare, in certi casi, alla "perdita" di quelle colonie con i caratteri particolari ricercati e pertanto diventerebbe necessario scegliere per ogni tipologia di campione le condizioni (volumi e tempi di incubazione) più idonee ad ottenere dati significativi per la sua caratterizzazione.

Inoltre, appurata l'effettiva circolazione della resistenza alla streptomicina e considerato che la stessa non è più in uso da tempo, potrebbe risultare interessante allargare la ricerca ad altri antibiotici di uso più recente o addirittura attuale.

Altra considerazione interessante è emersa dall'applicazione del metodo della "Conta diretta dei microrganismi", secondo il protocollo modificato proposto nel presente lavoro, che consente una stima, a nostro avviso sufficientemente fedele alla realtà, dei microrganismi totali anche a quei laboratori non attrezzati per l'esame in epifluorescenza. Il numero delle forme batteriche non coltivabili risulta essere di gran lunga preponderante rispetto a quello dei microrganismi enumerati con il metodo colturale (vedi Tabella 5); ciò dimostra che la vita esiste anche in ambienti "estremi" e che tuttavia viene vistosamente sottovalutata dai comuni metodi analitici, inadeguati al fine di una valutazione quantitativa globale. Utilizzando l'AS parallelamente al terreno previsto dal metodo ufficiale è stato possibile constatare come il numero dei germi coltivabili venga sottostimato, almeno nel caso in cui la matrice sia costituita da acque di falda dove si realizzano condizioni di particolare oligotrofia. Addirittura macroscopica è invece la differenza con i valori di carica totale ottenuti con il sistema della conta diretta che però, vale la pena sottolinearlo, oltre alle cellule batteriche coltivabili e difficilmente o per nulla coltivabili, evidenzia anche quelle non vitali.

Circa l'utilità pratica di quest'ultima informazione, ci si chiede se sia possibile e ragionevole associare i valori di carica ottenuti con questo metodo a quelli derivanti dalla enumerazione dei microrganismi filamentosi e correlare il dato globale alla velocità di formazione del biofilm sulle strutture in cui l'acqua transita; ciò allo scopo eventuale di verificare se il risultato integrato delle due determinazioni possa essere utilizzato come strumento previsionale delle trasformazioni dell'acqua in rete.

Resta comunque da stabilire quale sia il significato igienico-sanitario da attribuire a questa insospettata consistente presenza di microrganismi.

Per quanto riguarda la ricerca dei Metazoi si è evidenziata la necessità di scegliere di volta in volta il metodo più idoneo, fra i due proposti dal protocollo di lavoro, secondo la tipologia del campione da esaminare.

Un'ultima considerazione va fatta a proposito del tentativo compiuto con l'analisi dell'omogenato di Metazoi. Il metodo prevede, infatti, che la verifica dell'efficacia della disinfezione debba dare come risultato l'assenza di crescita. Nel nostro caso tale prova ha dato invece luogo allo sviluppo di alcune colonie per mL di sospensione; nonostante questa evidente anomalia nel risultato, inquadrando il dato nel contesto di tutti gli esiti analitici, è possibile considerare l'esperienza estremamente positiva. Difatti il valore citato risulta certamente piccolo

se confrontato sia con l'entità della carica presente nella sospensione prima della disinfezione (sospensione che, si ricorda, proveniva dalla concentrazione di ben 10 litri d'acqua anche se su membrana a grossi pori), sia con il numero di microrganismi cresciuti dopo l'omogeneizzazione dei Metazoi. Lo stesso valore è sembrato comunque grande, in relazione alla massiccia quantità di disinfettante usato. La sopravvivenza di questi pochi batteri potrebbe essere spiegata con le seguenti ipotesi:

- si potrebbe trattare di microrganismi inclusi nella fanghiglia o inglobati nelle sostanze mucose che rivestono il corpo dei metazoi e perciò ben protetti da queste barriere fisiche nei confronti del disinfettante; è ipotizzabile che questi batteri ritrovati dopo la disinfezione siano stati liberati nell'acqua, per l'azione disgregante del cloro, solo verso fine del trattamento e perciò in condizioni di vitalità a causa della minimizzazione del tempo di contatto diretto. Se si accetta questa ipotesi, ci si deve porre anche l'interrogativo di quale possa essere l'efficacia di trattamenti disinfettivi effettuati, con dosi di cloro certamente più basse di quella qui utilizzata, su acque di falda che però scorrono entro reti vetuste e affette da formazione e rilascio di fanghiglie;
- è anche possibile che l'ipoclorito utilizzato sia stato insufficiente per una completa disinfezione; è nota infatti la concentrazione di cloro aggiunto ma non quale fosse la clorazione originaria della sospensione. Non si è perciò in grado di valutare se la clorazione eseguita ha portato il sistema oltre il break point o se, insieme al cloro libero attivo, fosse presente e in che proporzioni anche cloro legato (clorammine), ipotesi quest'ultima che avrebbe richiesto tempi di contatto più lunghi di quelli impiegati o un dosaggio più elevato di ipoclorito.

In conclusione, questo primo anno di sperimentazione è servito principalmente allo studio di nuove tipologie di indagini, normalmente escluse dai controlli di routine e a cimentarsi con metodi poco o per nulla collaudati. Occorrerebbe adesso fare il punto della situazione generale, valutando tutte le considerazioni fatte dai vari collaboratori, integrando o modificando ove occorra il protocollo analitico e raffinandolo, al fine sia di indirizzare le risorse verso obiettivi più precisi che di consentire a tutti i partecipanti di procedere nelle stesse condizioni sperimentali, ottenendo perciò risultati comparabili.

## Bibliografia

1. Volterra L, Bertolotti A, Gallo L. Ecosistema rete. *Ingegneria Sanitaria Ambientale* 1993;41:29-34.
2. Volterra L. Acque di falda: nuovi indicatori di qualità e rischio sanitario (Progetto di ricerca triennale ISS). In: *Relazione dell'Istituto Superiore di Sanità sui risultati dell'attività svolta nell'esercizio finanziario 2000 e programma per l'esercizio 2002*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2001. p.57-8. (Rapporti ISTISAN 01/36).
3. Italia. DPR 24 maggio 1988, n. 236 Attuazione della Direttiva CEE 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art.15 della L. 16 aprile 1987, n.183. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 152, 30 giugno 1988.
4. Aulicino FA, Contu A, Ramouz E, Meloni P, Deidda A, Pala A. *Studio di un caso di corrosione batterica in un acquedotto di una regione italiana*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1991. (Rapporto ISTISAN 91/4).
5. Fontani N, Pedroni M. I batteri implicati nei fenomeni di corrosione. *Biologia Ambientale* 1994;6:13-21.
6. Pagano A, Paggi D, Pasargiklian L. Il ruolo dei ferrobatteri nella contaminazione ambientale: Isolamento ed identificazione. *L'Igiene Moderna* 1993;79:619-34.
7. Volterra L, Bernabei S. Macroinvertebrati colonizzanti i biofilm. *Biologia Ambientale* 1994;6:22-7.

8. Finocchiaro M, Volterra L. Alghe, protozoi, nematodi in acque destinati al consumo umano (prov. di Catania). *Biologi Italiani* 2000;1:23-7.
9. Feletti M, Gaiter S. Appunti sulle comunità biologiche delle acque sotterranee. *Biologia Ambientale* 1996;4:5-20.
10. Gaiter S, Bodon M. Nuovi criteri di valutazione basati sulla componente biologica per le captazioni di acque destinate al consumo umano. *Biologia Ambientale* 1995;1:5-17.
11. Levy RV, Hart FL, Cheethman RD. Occurrence and public health significance of invertebrates in drinking water system. *Journal of American Water Works Association* 1986;9:105-10.
12. Italia. Decreto Ministero della Sanità 26 marzo 1991. Norme tecniche di prima attuazione del Decreto del Presidente della Repubblica del 24 maggio 1988, n. 236, relativo all'attuazione della Direttiva CEE concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art.15 della Legge 16 aprile 1987, n. 183. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 84, 10 aprile 1991.
13. Volterra L, Aulicino FA, Bernabei S. Diffusione del problema dei Nematodi in acquedotti italiani. *Inquinamento* 1996;38 (8):60-6.
14. Lupi E, Ricci V, Burrini D. Recovery of bacteria in nematodes isolated from a drinking water supply. *Journal Water SRT Aqua* 1995;44(5):212-8.
15. Smerda SM, Jensen HJ, Anderson AW. Escape of Salmonella from chlorination during ingestion by *Prestionchus cheritieri* (Nematode: Diplogasterinae). *Journal of Nematology* 1971;3:201-4.
16. Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied Environmental Microbiology* 1977;33:1225-8.
17. Maki JS, Remsen CC. Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater. *Applied Environmental Microbiology* 1981;41:1132-8.
18. Zimmermann R, Iturriaga R, Becker-Birck J. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied Environmental Microbiology* 1978;52:926-35.
19. Spigoni G, Davoli D, Davoli C. I principali microrganismi filamentosi del fango attivo: caratteristiche ecologiche e metodi di identificazione. *Quaderni tecnici dell'AGAC* 1992;5:102.
20. Sansoni G. *Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani*. Provincia Autonoma di Trento: 1988.

# INDICATORI ED ENTEROPATOGENI NELLE ACQUE AD USO UMANO IN UNA ULSS DELL'ARCO ALPINO ORIENTALE

Domenico Grazioli (a), Rosanna Burigo (b)

(a) Dipartimento di Prevenzione, ULSS n. 2, Feltre (Belluno)

(b) Sezione Biotossicologica, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Veneta, Belluno

## Premessa

Sia il DPR 236/1988 che il Decreto Legislativo n. 31 del 2 febbraio 2002 prevedono per le acque destinate al consumo umano diretto, accanto alla ricerca degli indicatori microbiologici di inquinamento fecale, la ricerca di enteropatogeni batterici, virali e protozoari (1, 2). L'ampliamento della caratterizzazione microbiologica delle acque deve essere effettuato nei casi in cui le indagini pregresse evidenzino condizioni "anomale", cioè condizioni di questo comparto idrico che favoriscono la possibilità per la popolazione di contrarre malattie infettive ad andamento epidemico.

Le analisi condotte nell'ultimo decennio sulle acque della provincia di Belluno al fine di stabilirne la potabilità hanno evidenziato che le acque sorgive, in particolare quelle della parte meridionale della provincia (Feltrino), erano caratterizzate da un basso indice di potabilità (3).

Al fine di prevenire il rischio per la popolazione e per i numerosi ospiti turisti della stagione estiva si è deciso di effettuare una verifica microbiologica più approfondita e specialistica. Pertanto, sulle acque prelevate dalle sorgenti captate ad uso umano, oltre ai consueti batteri indicatori di contaminazione fecale, è stata effettuata la rilevazione di enteropatogeni.

## Dati epidemiologici sugli enteropatogeni

Al fine di avere un quadro più chiaro possibile della diffusione nella popolazione della regione degli enterobatteri patogeni e poter fare le opportune considerazioni sulla loro presenza nelle acque sono stati presi in esame i risultati degli isolamenti di questi microrganismi effettuati dal Centro Enterobatteri Patogeni della Regione Veneto (CEPVE), attivo presso la sede dell'Ospedale di Treviso.

Sono stati presi in considerazione i risultati degli isolamenti di batteri enterici patogeni riferiti all'anno 1998.

Nel riepilogo stilato dal CEPVE per questo anno si evidenziano 5.136 isolamenti complessivi, dei quali, 4.854 sono da attribuirsi a *Salmonelle* e 282 *Campylobacter jejuni*, un patogeno enterico emergente. Tra le specie di *Salmonella* sono risultate presenti nella popolazione per gran parte *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium*, seguite da *Salmonella blokley* e *S. anatum*. La Figura 1 riporta la distribuzione delle specie di enterobatteri patogeni isolati dal CEPVE nel 1998.

I risultati relativi all'isolamento di enterobatteri patogeni nelle acque (acque superficiali e di scarico, pozzi e piscine) nello stesso anno confermano gli andamenti registrati con gli isolamenti nella popolazione.

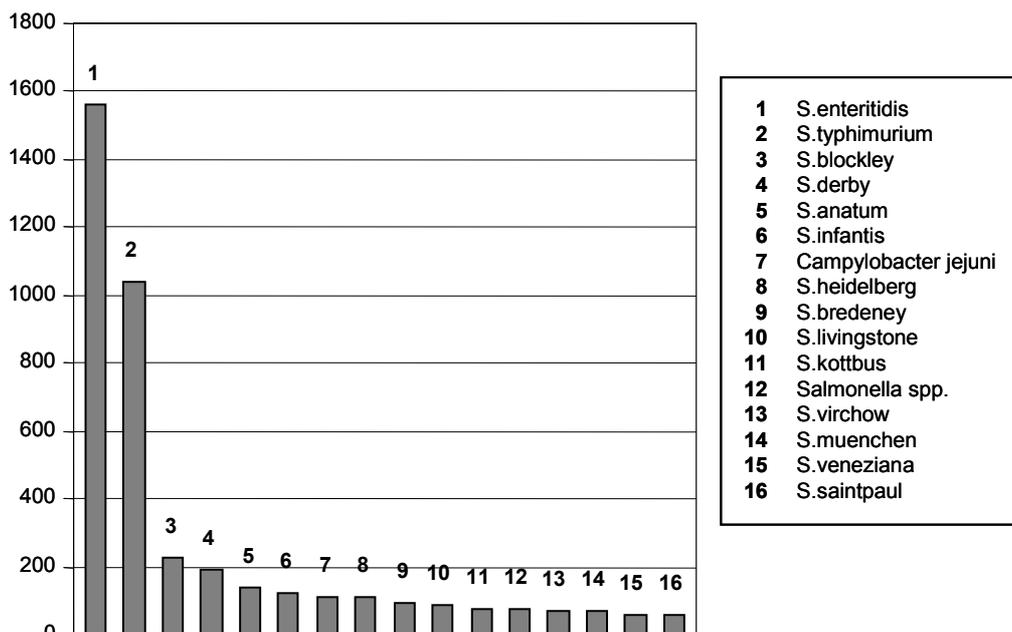


Figura 1. Principali isolamenti di Enteropatogeni anno 1998: riepilogo regionale del CEPVE

La Figura 2 riporta la distribuzione delle diverse specie di Salmonelle isolate dagli ambienti idrici nel 1998. Le analisi sulle acque non hanno evidenziato presenza di *Campylobacter jejuni*. Ciò, probabilmente, in conseguenza di difficoltà connesse all'applicazione di metodi di laboratorio idonei ad isolare questa specie microbica. Per quanto riguarda Salmonelle, si evidenzia la preponderanza di *Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis*.

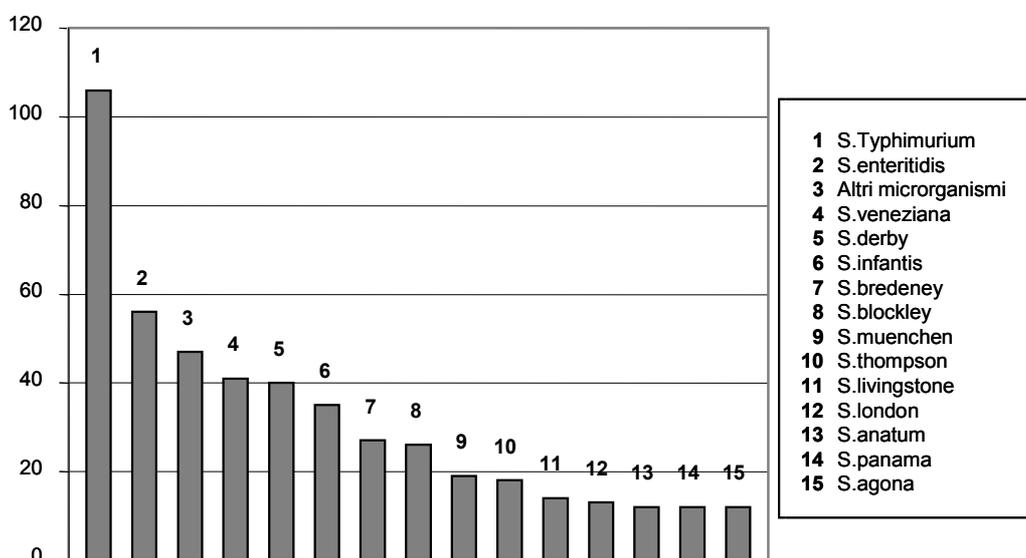


Figura 2. Principali isolamenti di Enteropatogeni da acque anno 1998: riepilogo regionale del CEPVE

Nelle acque si è resa evidente la presenza di:

- *Salmonella veneziana* (patogeno enterico causa di malattie infettive che mimano il morbo di Chron), in terza posizione e settima negli isolamenti complessivi,
- *Salmonella derby*, in quinta posizione,
- sierotipo S III b non considerato separatamente tra gli isolamenti totali a causa della sua modesta prevalenza.

Analizzando in dettaglio i casi totali attribuiti a *Salmonella veneziana*, si evidenzia la seguente distribuzione:

- 11 isolamenti umani sporadici;
- 9 (81%) da malati e 2 (18%) da portatori;
- 48 isolamenti non umani, dei quali 41 (85%) isolati da acqua, 5 (10%) da liquame, 1 (2%) da animali e 1 (2%) da alimenti.

La Figura 3 riporta gli isolamenti di *Salmonella veneziana* in ambito regionale dal 1993 al 1998 che sembrano in leggero aumento (Figura 3). In provincia di Belluno, gli isolamenti di enteropatogeni nel 1998 confermavano la situazione regionale, mentre gli isolamenti complessivi dell'ULSS n. 2 Feltre erano discreti e piuttosto costanti (Figura 4).

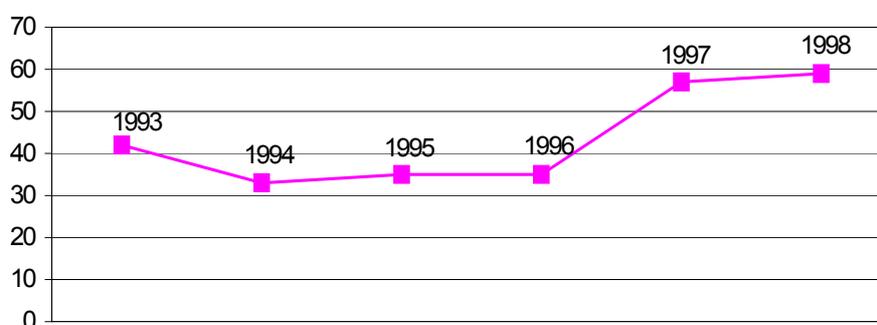


Figura 3. Riepilogo annuale di *Salmonella veneziana* isolata nella Regione Veneto dal 1993 al 1998

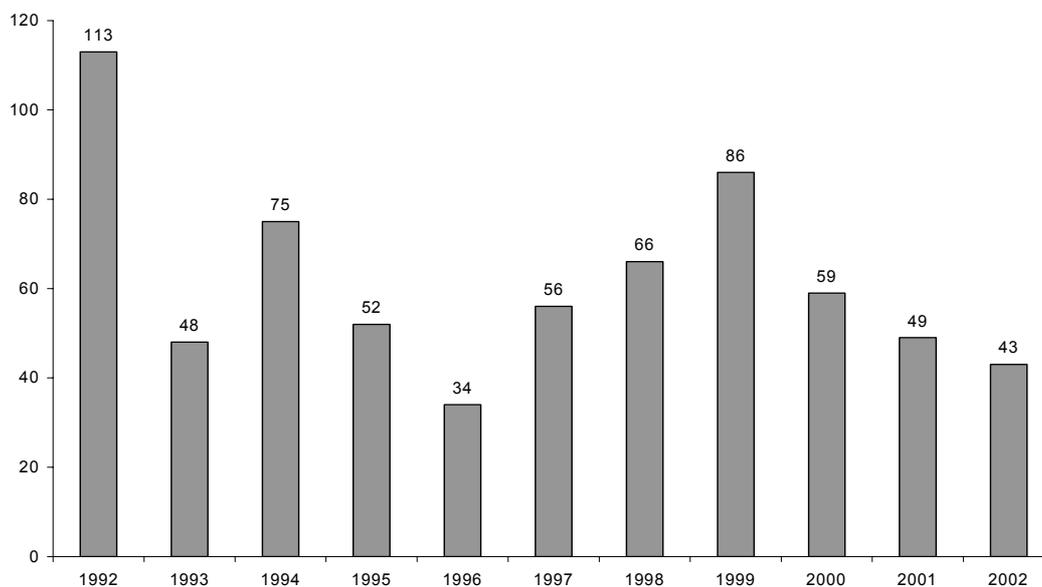


Figura 4. Casi di Salmonellosi umane dal 1992 al 2002: riepilogo annuale ULSS n. 2

Considerando, in particolare, gli isolamenti da acque destinate al consumo umano nell'ULSS n. 2, sul numero totale di campioni prelevati negli anni 1992-2003 (2.658 circa), sono state isolate 23 Salmonelle, 14 delle quali appartenenti al gruppo K (sierotipo S. III b), sei al gruppo F (sierotipo *S. veneziana*), secondo lo schema di Kauffman-White.

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche effettuate su questi campioni, che si riferiscono all'isolamento, oltre che dei batteri enterici patogeni, degli indicatori di contaminazione fecale, coliformi totali e fecali, streptococchi fecali, *Escherichia coli*, clostridi solfito riduttori e batteri eterotrofi cresciuti a 22 °C e a 37 °C.

**Tabella 1. Risultati analisi microbiologiche nelle acque della provincia di Belluno (ULSS n. 2) (1992- 2003)**

Data	Acquedotti e fontane non acquedottistiche	Comune	CT	CF	<i>E.coli</i>	BA	SF	CBT 37°	CBT 22°	Gruppo Salmonelle
12.11.92	Donada-Muiach	S.Gregorio nelle Alpi	5	5	0	0	0	9	17	K III b
16.05.96	Fontana Zottier Borghetto	Mel	35	30	30	30	6	140	350	K III b
17.06.96	Fontana Scuole Faller	Sovramonte	14	1	0	0	0	46	70	f veneziana
13.08.96	Fontana Prapavei	Sedico	>120	>120	>120	8	>120	120	250	K III b
27.06.97	Opera Presa Lasen Bassa	Feltre	12	10	6	0	3	30	95	K III b
28.06.97	Opera Presa Lasen Bassa	Feltre	10	1	1	0	2	4	40	K III b
01.07.97	Opera Presa Lasen Bassa	Feltre	2	0	0	0	0	5	15	K III b
12.11.97	Sanzan	Feltre	60	33	33	0	100	50	700	K III b
29.07.98	Maragno	Pedavena	>120	>120	>120	26	>120	210	990	K III b
07.10.98	Incino	Arsiè	120	120	90	30	50	100	>900	f veneziana
14.10.98	Carpene	Pedavena	14	9	6	0	4	10	93	f Veneziana
14.10.98	Oregne Campaz	Sospirolo	0	0	0	0	0	1	10	K III b
23.06.99	Oltra	Lamon	0	0	0	0	0	1	11	c2 Munchen
11.08.00	Privato Malga Celado	Arsiè	>120	90	60	29	>120	250	170	c1 thompson
11.09.01	Privato Canidi - Nuovo Serb. c/o Nuovo Serbatoio	Mel	>120	>120	>120	0	40	>100	>100	S III b
11.09.01	Privato Canidi - Osteria Boz c/o Osteria "Al Boz"	Mel	>120	>120	>120	0	30	>100	>100	S III b
17.07.02	Vigne Furiano - Maschi	Lamon	90	25	18	0	35	>100	>100	K III b
17.07.02	Costa-Chioè	Lamon	>120	90	90	0	90	>100	>100	K III b
14.08.02	Lasen	Feltre	0	0	0	0	0	5	12	spp. (specie plurima)
21.08.02	Delle Sorgenti	Alano di Piave	42	13	10	3	6	11	17	K III b
04.09.02	Incino	Arsiè	0	0	0	0	0	17	25	f veneziana
04.09.02	Rocca	Arsiè	0	0	0	0	0	1	2	f veneziana
16.07.03	Ex Sava Privato Enel	Sovramonte	6	0	00	0	0	1	20	f veneziana

CT=Coliformi totali, CF=Coliformi fecali; BA=Batteri anaerobi; SF= streptococchi fecali; CBT=Conta batterica totale.

Le Salmonelle sono state isolate sia in campioni di acqua destinata al consumo umano con presenza di coliformi totali, coliformi fecali, *Escherichia coli* e streptococchi fecali, sia in campioni conformi ai requisiti di qualità microbiologica del DPR 236/1988. I sierotipi identificati sono gli stessi di quelli isolati nelle feci di uccelli e animali selvatici (4) e la loro presenza nelle acque sorgive denuncia una captazione e una protezione della sorgente non adeguate.

Al contrario, tra le Salmonelle riscontrate in alimenti o in animali vivi o carcasse negli anni 1996-1999 nell'ULSS n. 2, non è stata isolata nessuna *Salmonella veneziana* o S. III b. Anche le denunce per isolamento umano negli anni 1992-2002 non hanno mai riguardato S. III b e solo in qualche caso *Salmonella veneziana*, essendo la gran parte degli isolamenti umani riferibili a *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. london* e *S. blokley*.

## Considerazioni finali

Sembra esistere una certa coincidenza di sierotipi tra gli isolamenti nell'uomo, negli alimenti e negli animali o loro carcasse, mentre le Salmonelle enteropatogene isolate nelle acque ad uso umano sembrano circolare in maniera quasi parallela (circuiti "selvatici" delle Salmonelle!). Questo dato si accorderebbe, peraltro, alla minor patogenicità per l'uomo di S.IIIb. Ulteriori indagini epidemiologiche sugli animali selvatici e nell'ambiente sono auspicabili in vista dell'applicazione della normativa sulle acque destinate al consumo umano (2, 5).

La ricerca di enteropatogeni nelle acque di un'area alpina con mediocre indice di potabilità ha condotto al risultato di isolare alcuni sierotipi di Salmonelle, probabilmente poco patogeni per l'uomo. Il risultato inatteso ha riguardato l'evidenziazione della presenza di Salmonella anche in concomitante assenza di batteri indicatori nell'acqua destinata al consumo umano. La rilevazione di microrganismi patogeni, come le Salmonelle, in acque apparentemente di qualità idonea per il consumo umano sembra evidenziare che i batteri indicatori non sono sempre idonei a rilevare condizioni riferibili a inquinamento fecale e non garantiscono il consumatore contro la presenza di enteropatogeni. Questi risultati sono in accordo con i risultati di studi condotti anche in altri paesi, che mostrano, come, talvolta, acque potabili con assenza di coliformi sono state, invece, origine di episodi epidemici anche consistenti nella popolazione (6). Di conseguenza, riteniamo che dovrebbe essere fatte opportune valutazioni, soprattutto in ambito normativo, al fine di considerare atteggiamenti corretti che possano limitare il più possibile situazioni come quella descritta (7).

## Bibliografia

1. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 24 maggio 1988, n. 236. Attuazione della direttiva CEE 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della legge 16/4/87 n. 183. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 152, 30 giugno 1988.
2. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.
3. Il modello Lasen A e B. In: Regione Veneto-Direzione Regionale per la Prevenzione (Ed.). *Atti delle 5 giornate di studio sulla qualità delle acque ad uso umano nelle zone montane*. Feltre (Belluno), luglio-novembre 1997 e giugno-settembre 1998. Venezia: Direzione Generale Prevenzione. Regione Veneto; 1998.

4. Bernagozzi M, Varoli O, Sacchetti R, Nannetti A. Ricerca di *Yersinia*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Salmonella* nelle feci di mammiferi selvatici. *Ig Mod* 1999;112:519-42.
5. Le Salmonelle nell'ambiente e nell'uomo. In: ULSS n. 2 Feltre (Ed.). *Atti del Seminario su Patogeni nell'ambiente e nell'uomo*. Feltre (BL) 17 settembre 2003. Belluno: Rasai di Seren del Grappa; 2003.
6. Payment P, Hunter PR. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO; 2001. p. 61-88.
7. Townsend SA. The relationships between salmonellas and faecal indicator concentrations in two pools in the Australian wet/dry tropics *J Appl Bact* 1992;73:182-8.

# INQUINAMENTO DI TIPO AGRICOLO NELLE FALDE ACQUIFERE DELLA PROVINCIA DI UDINE

Anna Lutman, Walter Avoscan, Ivan Ciani, Paolo Coan, Giannantonio Gava, Renato Nardini, Ludovico Pressello

*Dipartimento Provinciale di Udine, ARPA Friuli-Venezia Giulia, Udine*

## Introduzione

Alla fine del 1995 alcuni controlli analitici, effettuati su campioni di acqua destinata al consumo umano provenienti da pozzi situati nella zona della bassa pianura friulana della Regione Friuli-Venezia Giulia, cominciarono ad evidenziare la presenza di desetilatrazina, metabolita dell'erbicida atrazina. Nell'aprile del 1996 si verificava in alcuni pozzi il superamento del valore di 0,10 µg/L, concentrazione massima ammissibile prevista dall'Allegato I del DPR 236/1988. Nella zona in cui la concentrazione di erbicidi eccedeva il limite imposto dalla legge non è presente alcun sistema acquedottistico e il fabbisogno di acqua destinata al consumo umano agli edifici pubblici e privati viene garantita unicamente dall'utilizzo di pozzi propri. Questa situazione ha imposto alle autorità di controllo un imponente lavoro di verifica dell'intensità e della diffusione dell'inquinamento. Venivano così analizzati nello stesso anno più di 1000 campioni di acqua che evidenziarono una situazione di inquinamento diffuso da erbicidi nelle falde acquifere della bassa e dell'alta pianura friulana, come mostrato nella Figura 1.

Scopo di questo lavoro è quello di valutare lo stato attuale dell'inquinamento di tipo agricolo, dovuto all'uso di erbicidi, delle falde acquifere fino ad ora conosciute della pianura friulana e di verificare se tale inquinamento ha una periodicità temporale ed eventualmente se esiste una certa dipendenza dagli eventi climatici del luogo.

## Idrogeologia

La situazione geologica, stratigrafica e morfologica esistente oggi nel sottosuolo del Friuli-Venezia Giulia è il risultato di eventi geologici avvenuti nel passato, infatti è noto che le falde acquifere di questa regione italiana sono contenute nei depositi quaternari e pleistocenici della pianura friulana e che quest'ultima è essenzialmente divisa in due zone: l'Alta pianura e la Bassa pianura (1).

L'Alta pianura, situata a sud dello sbocco dei grandi fiumi dalla montagna, è costituita in prevalenza da ghiaie calcaree e dolomitiche, provenienti dai depositi alluvionali fluviali ed è sede di una potente falda freatica stratificata. La presenza in profondità di orizzonti sabbioso-argillosi e la progressiva riduzione del mezzo filtrante spostandosi verso il mare, fa sì che le acque di questa potente falda freatica formino numerosi fiumi di risorgiva lungo una linea detta appunto linea delle risorgive che rappresenta anche il limite tra Alta e Bassa pianura friulana. Il fenomeno delle risorgive è, infatti, una emergenza spontanea della parte superiore della falda freatica presente nell'Alta pianura quando questa cerca di passare dalle ghiaie permeabili di quest'ultima ai limi della Bassa pianura molto meno permeabili (1-4). A differenza dell'Alta pianura la Bassa pianura è caratterizzata dalla presenza nel sottosuolo di numerosi e potenti orizzonti argillosi impermeabili più o meno continui (Figura 2) (1).

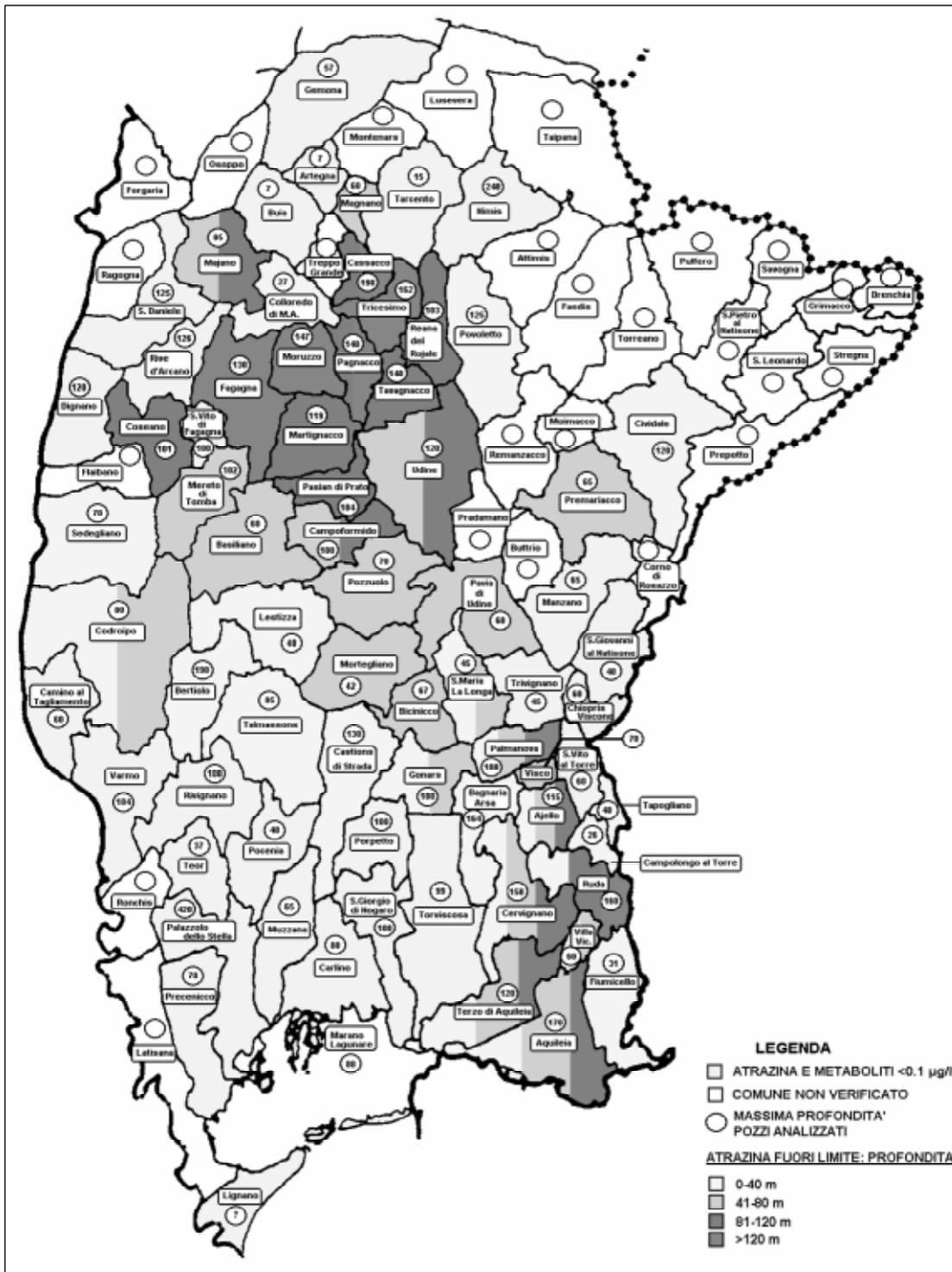
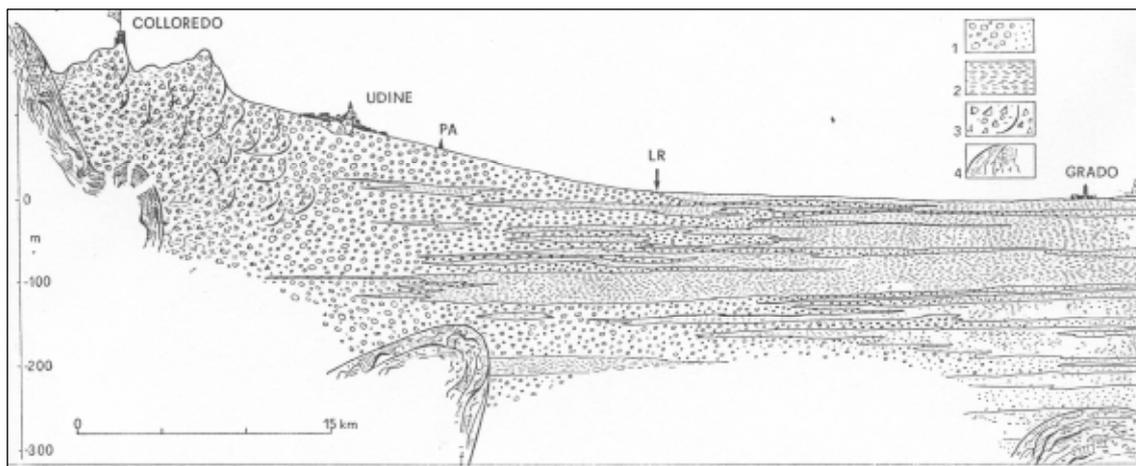


Figura 1. Provincia di Udine: carta tematica dell'inquinamento da atrazina e desetilatrazina (anno 1996)



PA=Pozzo petrolifero Agip, LR= linee delle risorgive. Altezze e distanze non in scala.  
 1. Ghiaie, 2. Limi ed argille, 3. Morene, 4. Arenarie e marne del Flysch

**Figura 2. Sezione geologica schematica fra Udine e Grado (1)**

La diversa composizione granulometrica presente in queste due zone genera quindi due situazioni idrogeologiche completamente differenti tra loro. Nell'Alta pianura, dove le ghiaie sono prevalenti, esiste una potente falda freatica continua che si trova fra i 100 e i 40 metri dal piano campagna in prossimità delle colline e che emerge in corrispondenza della linee delle risorgive. Nella Bassa pianura l'alternanza di limi e ghiaie genera almeno otto falde artesiane sovrapposte descritte nella Tabella 1 (5-11) che riporta dati da letteratura che ha elaborato informazioni dei sondatori.

**Tabella 1. Distribuzione stratigrafica e areale delle falde confinate entro ghiaie e sabbia comprese fra limi e argille nella alluvioni della Bassa Pianura Friulana**

Zone acquifere inclinate N-S	Lungo sezione N-S			Lungo sezione E-W
	9 km ad Ovest di Corte Paradiso	3 km ad Ovest di Corte Paradiso	10 km ad Est di Corte Paradiso	a ridosso della laguna a 8 km a Sud di Corte Paradiso
Livelli di ghiaie e sabbie e separti da limi e argille Profondità in metri dal livello marino				
<b>A</b>	30-80 Vari livelli acquiferi	20-80 Vari livelli acquiferi	20-70 Vari livelli acquiferi	30-80 Vari livelli acquiferi
<b>B</b>	80-120	80-110	70-100	95
<b>C</b>	Senza dati	Senza dati	110-150 Vari livelli acquiferi	110-130
<b>D-E</b>	130-160	120-150	160-175	160
<b>F</b>	170-210	170-190	200	190
<b>G</b>	235-260	230-252	Senza dati	240
<b>H</b>	295	265-275	Senza dati	Senza dati
<b>I</b>	420	Senza dati	Senza dati	Senza dati

L'apporto idrico alla pianura friulana viene garantito, oltre che dalle abbondanti precipitazioni, dalle portate dei principali fiumi regionali: Livenza, Cellina, Meduna, Tagliamento, Torre, Natisone, Isonzo e da alcuni corsi d'acqua minori. Le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di questi corsi d'acqua sono abbastanza simili, tuttavia le acque del fiume Tagliamento sono ben distinguibili dalle altre per l'alto contenuto di solfati e la diversità dei valori del rapporto tra la concentrazioni di Ca e di Mg (Ca/Mg) permette di identificare le acque del fiume Natisone per l'elevato valore di Ca/Mg riscontrato ( $Ca/Mg = 10$ ) e quelle dei fiumi Cellina e Meduna per la presenza di bassi valori di Ca/Mg (Figura 3 e Tabella 2) (1, 12, 13).

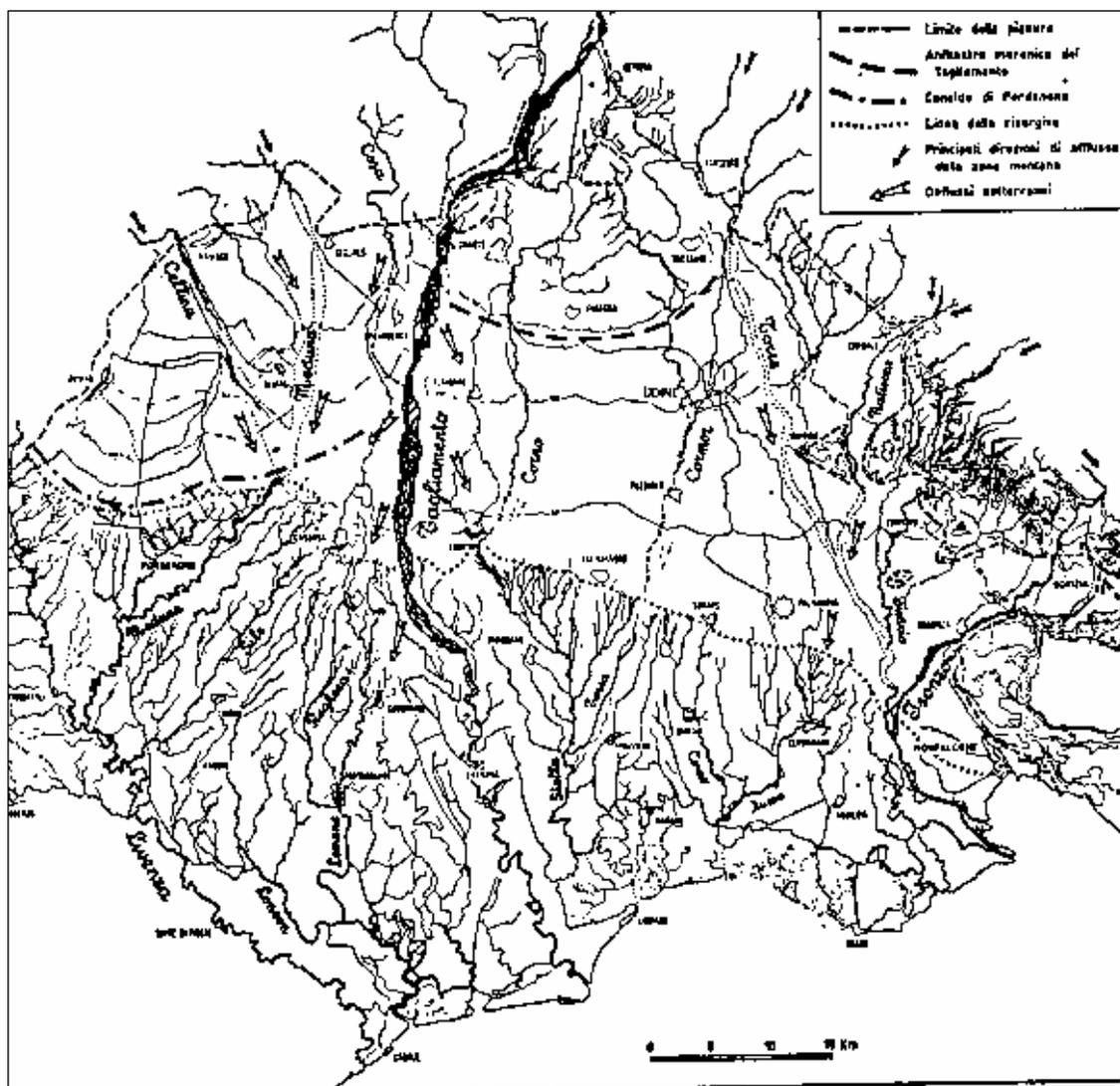


Figura 3. Idrografia superficiale della Pianura Friulana, con evidenziato il Tagliamento e la fitta rete fluviale generata dalle risorgive (1)

I dati e le conoscenze fino ad ora descritte consentono di individuare aree in cui le caratteristiche idrogeologiche sono relativamente omogenee e le condizioni idrologiche di aree contermini sono ben differenziate.

**Tabella 2. Tenori medi del chimismo dei principali corsi d'acqua della pianura friulana; dati riferiti agli ultimi quindici anni del programma regionale di monitoraggio delle acque**

Fiume	Tagliamento	Torre	Livenza	Natisone	Cellina	Meduna	Isonzo
Località	Ragogna	Reana del Roiale	Sacile	Cividale	Montereale Valcellina	Meduno	Cassegliano
ph	8	8,3	8	8,2	8,5	8,2	8,2
O <sub>2</sub> mg/L	9,9	10,7	10,1	10,9	11,1	11,2	12,2
Durezza totale °F	28,4	13,4	17	14,6	12,8	12,7	15
Ca mg/L	80	38	53	51	33	29	43
Mg mg/L	20	9,4	8,1	5,1	10	11	10
Na mg/L			1,4		0,9	0,6	3
K mg/L	0,9		0,6		0,3	0,3	0,7
HCO <sub>3</sub> mg/L	167	153	193	172	144	135	173
NO <sub>3</sub> mg/L	4,4	5,1	6,6	4,4	6	3,5	4,4
SO <sub>4</sub> mg/L	141	8,3	7,6	7	6,2	7,6	7
Cl mg/L	3,4	2,8	2,9	2,6	1,3	0,4	2,5
SiO <sub>2</sub> mg/L		1,4	3	1,9	1,3	1,5	3,2
Sr mg/L	0,9	0,06		0,13			
Ca/Mg	4	4	6,9	10	3,3	2,6	4,3
Portata media mc/s	92	7,1	22,6	14,8		9	152
Q80 mc/s		3,1		6,8	19,7		59,5
Deflusso mc/s		8,6		17			105

I valori della portata media, del Q80 e del deflusso per infiltrazione nel sottosuolo sono ricavati da Mosetti (1) e da una relazione inedita redatta dall'A.G.E.G.A.S. (acquedotto di Trieste)

Le aree idrogeologicamente omogenee in cui è possibile dividere la pianura friulana sono:

1. Bassa pianura pordenonese,
2. Alta pianura pordenonese,
3. Alta pianura in destra e sinistra Tagliamento,
4. Piede dell'Anfiteatro morenico,
5. Alta pianura centro-orientale,
6. Fascia pedecollinare dei conoidi dei fiumi Torre, Natisone e Isonzo,
7. Bassa pianura in destra e in sinistra Tagliamento,
8. Bassa pianura circumlagunare orientale.

## L'atrazina nel Friuli-Venezia Giulia

In questa regione l'atrazina è stata usata in modo massiccio in particolare nelle aree a cultura intensiva del mais.

Le prime evidenze di inquinamento di falde a causa dell'uso dell'atrazina risalgono ai primi anni '80. La prima ordinanza del Ministero della Sanità di divieto temporaneo e cautelativo dell'uso di presidi sanitari contenenti atrazina risale al 25/06/86; a questa ordinanza è seguito un periodo caratterizzato da varie revoche e proroghe in cui il limite di accettabilità per le acque destinate al consumo umano è stato aumentato fino a 1 µg/L.

Il 6 febbraio 1991 con un provvedimento che di fatto diventa definitivo viene vietata la vendita e tutti gli impieghi delle formulazioni contenenti atrazina.

L'atrazina (ATRA) è un composto che presenta una elevata resistenza alla degradazione chimica e biologica; il principale prodotto di degradazione è la desetilatrazina (DEA) che ha normalmente nelle falde acquifere una concentrazione da 2 a 4 volte superiore a quella dell'atrazina; un altro metabolita è la deisopropilatrazina che però incide molto poco (circa 5%) sulla somma ATRA e suoi metaboliti che si può quindi ricondurre a ATRA+DEA.

I rapporti [DEA]/[ATRA] sono intorno ad 1-2 nell'alta pianura e vanno fino a 4-5 nella bassa pianura e ciò è dovuto al fatto che la DEA è circa 12 volte più solubile nell'acqua dell'ATRA, quindi l'acqua di falda si arricchisce sempre più in DEA rispetto all'ATRA nel corso della sua migrazione in direzione nord-sud.

La portata della falda dell'Alta pianura è notevolmente influenzata dall'apporto proveniente dalle acque meteoriche. Queste ultime a contatto con il terreno si caricano dei composti utilizzati in agricoltura e disciolgono questi composti inquinando la falda freatica che risulta particolarmente vulnerabile.

La falda freatica una volta raggiunta la linee delle risorgive riemerge e si riversa sul terreno sotto forma di emergenze di acqua sia localizzate e di grandi portate che come reticolo disseminato.

Le falde artesiane sovrapposte site nelle alluvioni della Bassa pianura friulana createsi dall'alternanza di limi e ghiaie vengono sì rimpinguate dalla falda freatica dell'alta pianura, ma anche dai principali fiumi regionali, dalla percolazione delle acque meteoriche locali e dalle acque dei fontanili generatisi con il fenomeno delle risorgive. Questo particolare fenomeno di caricamento associato all'andamento della circolazione idrica sotterranee (N → SE) e all'elevato sfruttamento agricolo della zona, soprattutto per la coltivazione del mais, fanno sì che vi sia una vasta zona di acque sotterranee inquinate e/o a rischio di inquinamento.

## Elaborazione dei dati

I campioni analizzati dall'anno 1996 al 1999 sono 2152 e risulta che circa il 30 % dei campioni superano la Concentrazione Massima Ammissibile (CMA) di 0,1 µg/L prevista dall'Allegato I del DPR 236/88.

In base alle profondità dei pozzi si è pensato di dividere i dati in 7 gruppi, come riportato in Tabella 3.

**Tabella 3. Pozzi ordinati in gruppi in base alla profondità**

Gruppo n.	Profondità pozzi (in metri)
1	0-30
2	30-50
3	50-80
4	80-100
5	100-150
6	150-200
7	>200

Nel Figura 4 ciascun punto rappresenta la media delle concentrazioni di DEA+ATRA di tutti i punti analizzati in un trimestre nell'intervallo di profondità considerato; sono stati evidenziati con lo stesso colore i gruppi che hanno un andamento simile e si muovono in un range di concentrazione paragonabile. Si può vedere che tutti i gruppi hanno un andamento irregolare e che si ha un forte calo di concentrazione media passando dal 3° al 4° gruppo (oltre 80 m) e dal 5° al 6° (oltre 150 m).

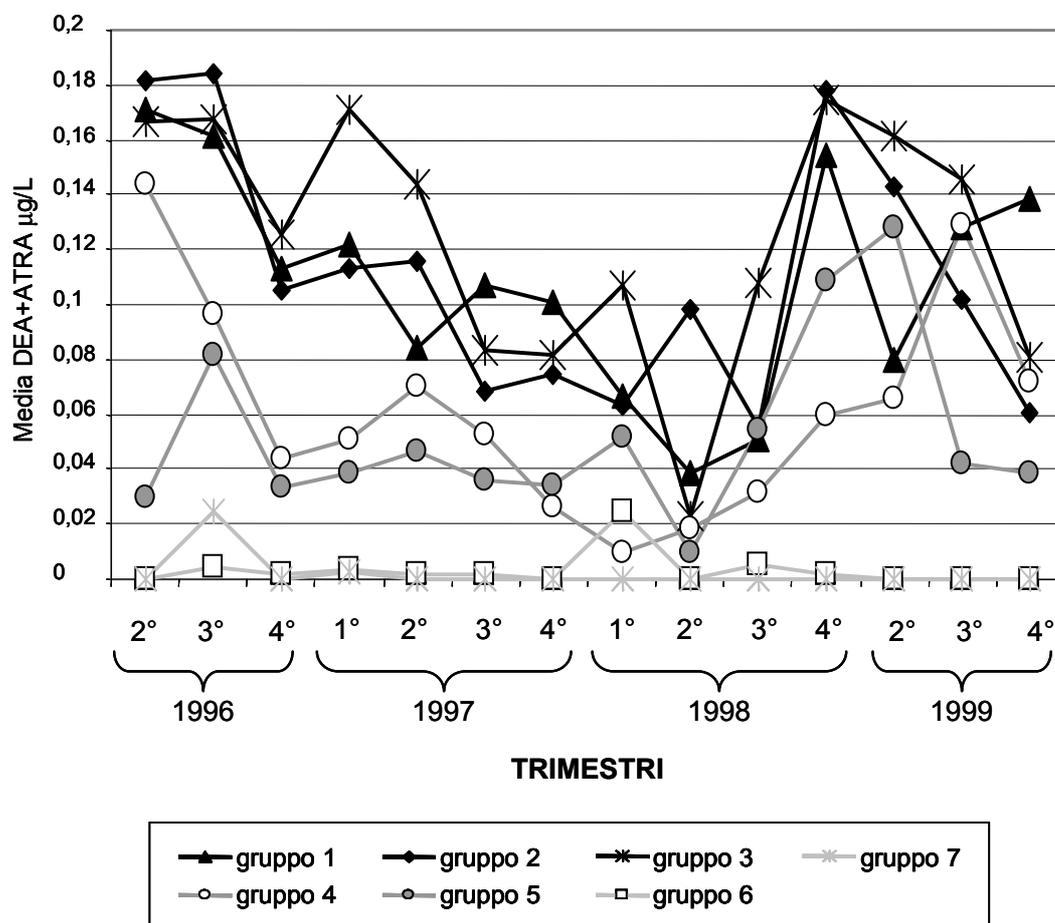


Figura 4. Andamento delle concentrazioni di DEA+ATRA nel periodo 1996-1999

Nel periodo esaminato non si evidenzia una diminuzione di concentrazione di DEA+ATRA. L'andamento irregolare appare fortemente correlato con l'andamento delle precipitazioni, come mostrato nella Figura 5, dove vengono sovrapposte le curve relative ai dati del gruppo 1 con la piovosità. Si può notare che tale correlazione con la piovosità pur presente anche nei gruppi 2 e 3 cala, come è logico aspettarsi, con l'aumentare della profondità.

Il confronto tra inquinamento riscontrato nei singoli comuni nell'anno 1996 e nell'anno 1999 può essere visto confrontando la Figura 1 con la Figura 6. La sovrapposizione delle due figure mostra che il territorio interessato all'effetto non è affatto diminuito.

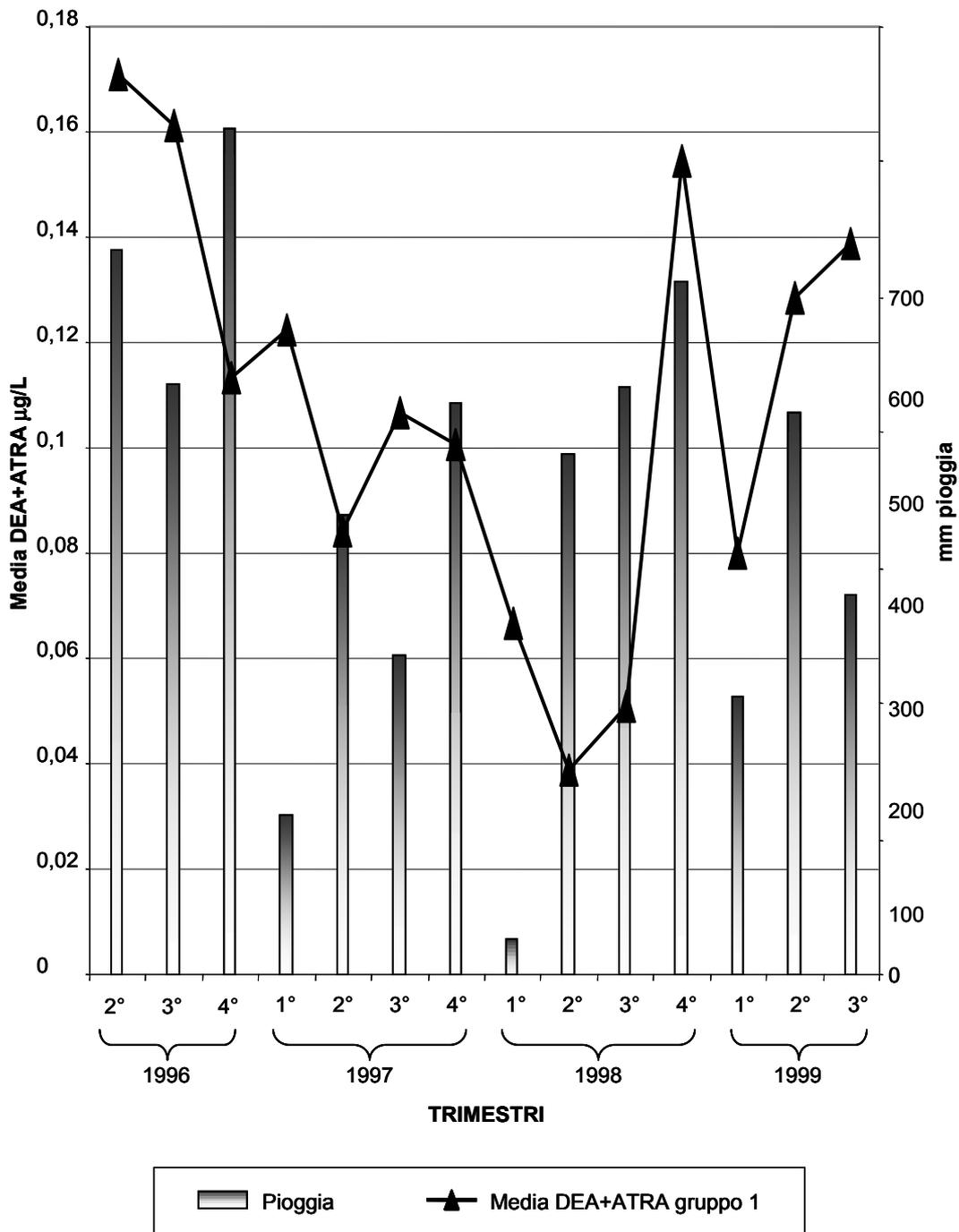


Figura 5. Confronto delle concentrazioni medie di ATRA + DEA del gruppo con la piovosità

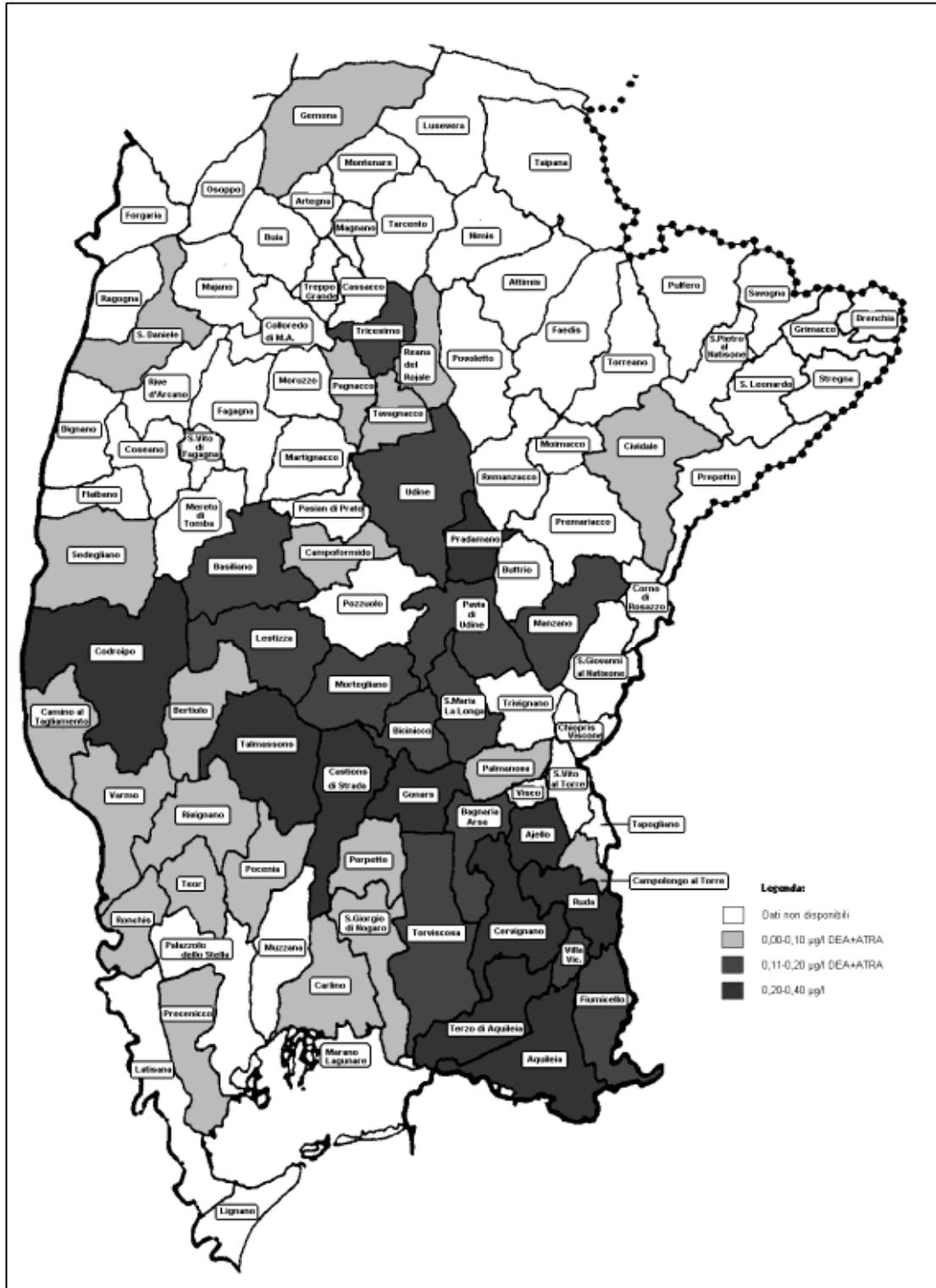


Figura 6. Provincia di Udine: Carta tematica dell'inquinamento da atrazina e desetilatrazina (anno 1999)

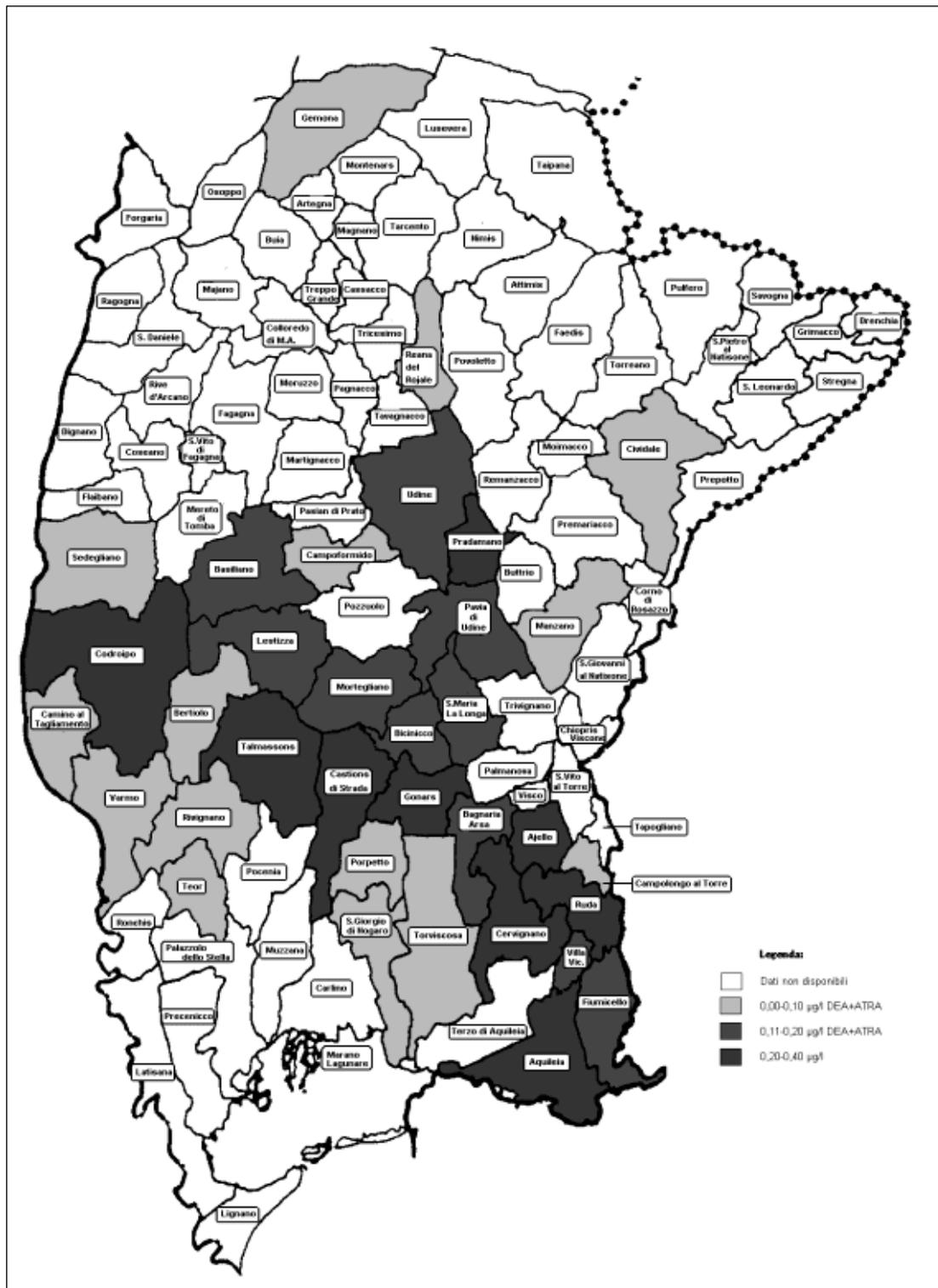


Figura 7. Provincia di Udine: carta tematica dell'inquinamento da atrazina e deetilatraxina delle falde 1,2,3 (anno 1999)



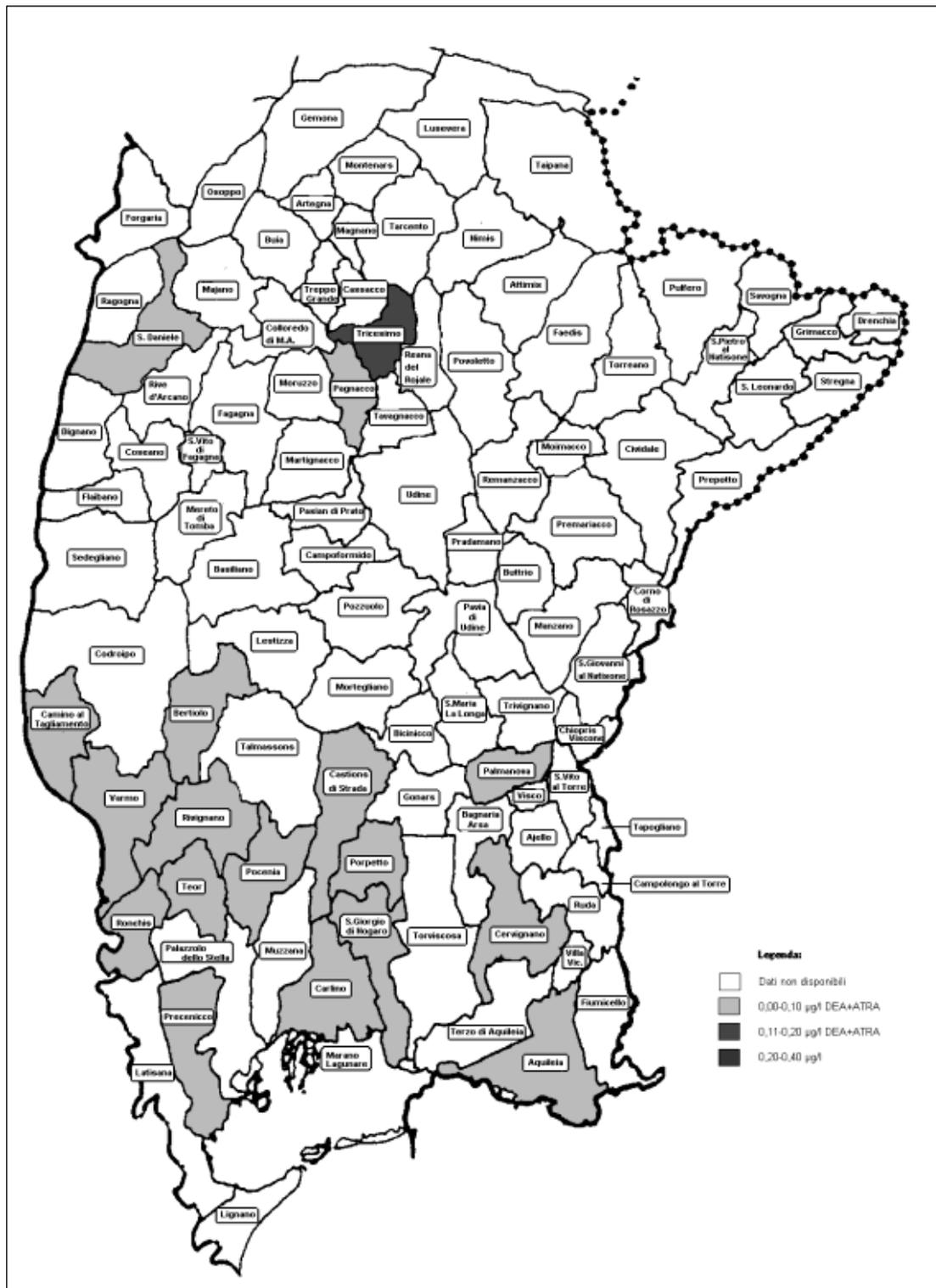


Figura 9. Provincia di Udine: carta tematica dell'inquinamento da atrazina e desetilatrazina delle falde 6,7 (anno 1999)

## Conclusioni

Si può notare che l'effetto dell'uso massiccio dell'atrazina fino al 1986 è ancora presente, in quanto le concentrazioni medie non sono calate in questi ultimi anni.

Inoltre, poiché, ogni qualvolta si verifica una forte precipitazione si nota un aumento di concentrazione, si presuppone che vi sia ancora una notevole quantità di atrazina presente nel terreno.

Il confronto tra i dati del 1996 e del 1999 indica che l'inquinamento dell'atrazina sta raggiungendo anche le zone a ovest della zona maggiormente inquinata, infatti il comune di Torviscosa (Figura 6) nel 1999 ha superato la CMA prevista, mentre nel 1996 era al di sotto di tale valore. I dati analitici mostrano inoltre che anche il comune di San Giorgio di Nogaro, assolutamente esente da ogni traccia di ATRA e DEA nel 1996, è oggi leggermente toccato da questo tipo di fenomeno.

Le Figure 7, 8 e 9 indicano infine che nella zona più ad est della Bassa pianura friulana le falde esenti da problemi di inquinamento agricolo sono site ad una profondità superiore ai 150 metri.

## Bibliografia

1. Mosetti F. *Sintesi sull'idrologia del Friuli-Venezia Giulia*. Udine: Ente Tutela Pesca del del Friuli-Venezia Giulia; 1983. (Quaderni ETP 6).
2. Lenardi P, Morelli C, Norinelli A, Tribalto G. Sintesi geologica e geofisica riguardante l'area veneziana e zone limitrofe. *Mem Carta Geol. d'Italia* 1973;5(34):1-53.
3. Verri G. Potenzialità e qualità delle risorse idriche del Friuli-Venezia Giulia. *Quaderni di Informatica per il Territorio* 1980;5:47-63.
4. Novelli G. *Le risorgive del Friuli-Venezia Giulia. Un patrimonio da conoscere e da proteggere*. Udine: Ente Tutela Pesca del del Friuli-Venezia Giulia; 1990. (Quaderni ETP).
5. Novelli G. L'inventario delle falde acquifere della Regione. *Rassegna Tecnica del Friuli-Venezia Giulia*, 5; 1976.
6. Verri G, Chignoli C, Gambolati G, Volpi G. Automatic mapping of hydrology variables: A contribution to territory recognition of Friuli-Venezia Giulia, 18mo Congresso IAHR, 10 pp., Cagliari, 1979.
7. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia, Direzione regionale dei lavori pubblici, Servizio dell'idraulica. *Mappatura automatica delle risorse idriche regionali*. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia; 1982.
8. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia, Direzione Regionale dell'Ambiente. *Catasto regionale dei pozzi per acque e delle perforazioni eseguite nelle alluvioni quaternarie e nei depositi sciolti nel Friuli-Venezia Giulia*. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia; 1990.
9. Stefanini S, Giorgetti F. *I potenziali inquinamenti delle acque freatiche dell'alta pianura friulana ad opera delle discariche*. Trieste: Università degli Studi di Trieste, Dipartimento di Scienze Geologiche Ambientali e Marina; 1996.
10. Fuganti A. *Caratteristiche idrogeologiche e differenziazioni delle falde acquifere presenti nella bassa Pianura Friulana. Valutazioni dell'acqua della falda confinata artesianica presente alla profondità da 86 a 94 m come acqua minerale naturale con il nome commerciale di Fonte Annia*; 1998
11. Drolì GP. *L'idrografia dell'ambito territoriale ottimale della Provincia di Udine, risorse idriche disponibili e attuali e problematiche territoriali*. Ordine degli ingegneri della Provincia di Udine –

- Commissione ambiente. Assessorato all'Ecologia, Ambiente e territorio Tavola rotonda su "Legge Galli e sua applicazione concreta nel Friuli-Venezia Giulia"; 1999.
12. Massari G. *Caratterizzazione stratigrafica e geochemica delle falde acquifere della pianura friulana area orientale*. Trieste: Università degli Studi di Trieste; 1996-1997.
  13. Cucchi F, Giorgetti F, Gemiti F, Massari G, Oberti S. *Caratterizzazione geochemica delle falde acquifere della pianura friulana*. Trieste: Università degli Studi di Trieste, Dipartimento di Scienze Geologiche Ambientali e Marina; 1997.

## **EPIDEMIE DI EPATITE A IN ITALIA E POSSIBILI INDAGINI SU MATRICI AMBIENTALI**

Graziella Morace, Maria Rapicetta

*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'epatite di tipo A è una malattia di origine virale diffusa in tutto il mondo che dà spesso luogo ad epidemie ricorrenti più o meno estese. L'infezione è autolimitante e la mortalità è piuttosto rara.

Il virus dell'epatite A appartiene alla famiglia dei Picornavirus, che comprende diversi virus causa di infezioni enteriche (1). Come negli altri membri della famiglia il virione è una particella nuda con un diametro di 27 nm e contiene un genoma ad RNA a singola elica con polarità positiva. Tuttavia, diverse caratteristiche biologiche distinguono l'HAV dagli altri picornavirus. In particolare esso è molto più resistente all'inattivazione. L'infettività è mantenuta anche dopo permanenza di oltre due mesi nei cibi, nell'acqua e su molti tipi di superfici, sia in ambiente umido sia essiccato, e per alcuni anni a -20 °C. L'HAV è anche resistente a molti dei comuni disinfettanti. Il virus viene completamente inattivato solo dopo alcuni minuti a 98-100 °C, od in autoclave a 121 °C per 20 minuti; inoltre, sono efficaci il trattamento con formalina, con composti contenenti cloro e con radiazioni ultraviolette (2, 3).

Il modo principale di trasmissione è attraverso la via oro-fecale, sia per contagio diretto da un individuo all'altro, sia per ingestione di alimenti contaminati da feci infette. Dopo la penetrazione nell'organismo, il virus si replica nel fegato e le nuove particelle virali vengono escrete nell'ambiente con le feci. Una massiccia escrezione di virus ha inizio due o tre settimane prima della comparsa dei sintomi e può continuare, a basso titolo, per più settimane dopo la loro scomparsa.

A causa del modo di trasmissione l'epidemiologia dell'HAV è marcatamente influenzata dal livello sanitario e igienico dell'ambiente. La distribuzione dell'epatite A nelle diverse aree geografiche mondiali è perciò variabile ed è caratterizzata da diversi livelli di endemia, classificati come alto, medio e basso. Le aree ad alta endemia, che includono vaste zone del continente Africano, dell'Asia e del Sud America, sono caratterizzate da sovraffollamento e condizioni igieniche inadeguate. In tali aree il contatto con il virus avviene molto precocemente e in circa il 100% dei bambini, in cui decorre in maniera asintomatica. Di conseguenza, i casi di malattia sono sporadici e le epidemie sono rare. In aree caratterizzate da condizioni igienico-sanitarie variabili, come nei Paesi in via di sviluppo e in alcune regioni dei Paesi industrializzati, la circolazione del virus è elevata ma molti bambini non hanno occasione di contatto con il virus nella prima infanzia. L'esposizione ritardata al virus implica una maggiore probabilità di infezione negli adulti, e pertanto il numero di casi di malattia è elevato e le epidemie sono frequenti. In contrasto, nelle società industrializzate le epidemie sono in genere limitate a piccole comunità e i gruppi più a rischio sono rappresentati dai viaggiatori, il personale di asili nido e scuole materne e omosessuali maschi (4, 5) (Tabella 1).

Fino alla fine degli anni '70 l'Italia era considerata un paese ad endemia medio-alta, dove il contatto con il virus avveniva in età infantile. Tuttavia già dal 1978 fu dimostrata una diminuzione dell'incidenza di malattia nel Nord Italia. La diminuzione dell'incidenza si è successivamente estesa a tutta l'Italia e coincide con l'osservazione della diminuzione della presenza di anticorpi anti-epatite A sia nella popolazione 0-14 anni che in quella 15-24 (6, 7). Tale diminuzione di incidenza riflette il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie ma,

d'altra parte, indica anche un aumento del numero di adulti non immuni, con un più alto rischi di infezioni sintomatiche (SEIEVA 1999) (Tabella 2).

**Tabella 1. Caratteristiche epidemiologiche dell'epatite A nel mondo**

Endemicità	Età usuale del contatto	Gruppi a rischio di malattia	Epidemie
Alta	< 5 anni	Bambini	Rare
Intermedia	5-15 anni	Ampio	Comuni e a vasta diffusione: cibi o acque contaminati molluschi.
Bassa	> 20 anni	Persone a contatto con individui infetti, viaggiatori, drogati, omosessuali.	Occasionali: asili, comunità, cibi o acque contaminati, molluschi.

**Tabella 2. Tassi annuali/100.000 per l'epatite A, suddivisi per età**

Età	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
0-14	29	4	6	4	2	3	8	11	9	11	5	10	28	8
15-24	16	7	6	5	4	5	7	15	11	14	6	18	50	15
>24	2	3	1	1	2	2	2	2	3	2	1	3	6	4
Totale	10	4	2	2	2	2	4	6	5	6	3	7	17	6

Tuttavia il decremento è più lento nel Sud, dove permangono delle "sacche" di endemia. Epidemie si sono verificate nel 1991 in Campania e nel 1992, 1994 e 1996 in Puglia, dove comunque si conferma il generalizzato spostamento dell'età del primo contatto con il virus, con un elevato numero di casi nelle fasce di età 7-14 e 15-24 anni (8, 9) (Tabella 3; Tabella 4).

**Tabella 3. Casi di epatite A in Italia e in Puglia (1990-1996)**

Anno	Italia	Puglia
1990	2.572	925
1991	2.764	753
1992	6.046	2.805
1993	3.308	915
1994	3.531	1349
1995	/	190
settembre 1996	/	4.635

**Tabella 4. Epatite A in Puglia (1996): distribuzione per età**

Età	Casi %
0-4 anni	1,1
5-9 anni	5,8
10-14 anni	16,2
15-19 anni	28,8
20-24 anni	29,7
25-29 anni	13,6
30-34 anni	2,9
>35 anni	1,5

Come noto, le epidemie di epatite A sono frequentemente associate all'ingestione di cibo contaminato. In Italia una delle fonti principali di infezione è rappresentata dai molluschi provenienti da coltivazioni in tratti di mare inquinati (>40% dei casi), consumati crudi o poco cotti (4, 10). I molluschi filtrano giornalmente grandi quantità d'acqua per ricavare ossigeno e cibo e durante tale processo possono concentrare il virus fino a 60 volte (Figura 1).

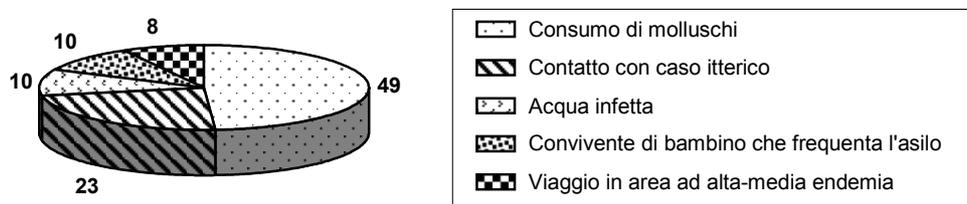


Figura 1. Principali fattori di rischio (%) per l'epatite A in Italia

Poiché le acque superficiali di laghi, fiumi e mare accolgono i liquami urbani e la depurazione non è sempre ottimale, l'acqua può costituire un veicolo d'infezione (11). Il contagio in seguito ad ingestione di acqua contaminata non è molto frequente in Italia (12); principalmente l'infezione avviene in seguito alla contaminazione di molluschi "rinfrescati" prima della vendita con acqua marina inquinata (spesso proveniente dal porto) o al consumo di vegetali crudi irrigati con acque non potabili (13).

Un'altra fonte d'infezione frequente in Italia è rappresentata dal contatto con soggetti itterici.

Il contagio da HAV può avvenire anche attraverso la manipolazione di cibi da parte di portatori del virus in fase di incubazione o di infezione asintomatica. Tale tipo di trasmissione è però più frequente nei paesi del nord Europa e nord America (14).

L'epatite A non viene in genere trasmessa con il sangue anche se durante l'infezione si osserva una transitoria viremia. Tuttavia alcuni anni fa è stata riportata la trasmissione di epatite A ad alcuni emofilici che avevano ricevuto fattore VIII preparato a partire da sangue infetto (15).

Il problema della contaminazione di campioni ambientali da parte dell'HAV, siano essi molluschi, o acque destinate ad uso potabile o alla coltivazione di molluschi o all'irrigazione oppure acque di fogna, è rilevante a livello sanitario.

I batteri coliformi o diversi tipi di fagi sono usati da molti anni come indicatori della potabilità di acque o della qualità dei molluschi. I virus enterici, e in particolare il virus dell'epatite A, mostrano però una maggiore resistenza nell'ambiente e pertanto i comuni organismi indicatori non rappresentano uno standard adatto a rivelare la loro presenza (16). È perciò necessario effettuare una rilevazione diretta.

Diversamente dalla ricerca degli altri virus enterici, la messa in evidenza dell'HAV da campioni ambientali è piuttosto complessa e legata a diverse problematiche: 1) la quantità di virus nel campione di acqua o cibo è spesso bassa (il virus è semplicemente trasportato dal cibo, non si replica); 2) necessità di concentrare il campione, con possibile perdita di materiale o inattivazione del virus durante il trattamento 3) presenza di batteri od altri virus enterici contaminanti, che costringono a diluire il campione o a trattarlo per inattivare eventuali altri virus presenti o inibirne la crescita.

Un altro fattore che rende difficoltosa la determinazione dell'HAV è la mancanza di tecniche standardizzate per la sua ricerca in campioni provenienti dall'ambiente, e l'elevata variabilità nella sensibilità delle differenti metodiche, sia tradizionali (colture cellulari, ELISA o RIA) che molecolari (sonde molecolari o RT-PCR) (Tabella 5).

**Tabella 5. Limiti di sensibilità delle tecniche utilizzabili per il rilevamento di HAV**

Metodo	Sensibilità
Colture cellulari	1 particella infettiva
ELISA	1 x 10 <sup>5</sup> particelle
RIA	1 x 10 <sup>5</sup> particelle
Sonde molecolari	10 <sup>2</sup> particelle
RT-PCR	3-30 particelle

L'isolamento in coltura cellulare rappresenta un ottimo mezzo di rilevamento di virus ambientali quali enterovirus, adenovirus e (meno efficientemente) rotavirus. Tuttavia, l'epatite A proveniente dall'ambiente è di difficile adattamento alla crescita in coltura, cresce molto lentamente con bassissime rese, richiede molte settimane e almeno un passaggio cieco. Inoltre possono esserci contaminanti tossici nell'inoculo, o sostanze interferenti con la crescita virale. A queste limitazioni bisogna anche aggiungere la mancanza di un effetto rilevabile della crescita virale sulle cellule stesse (effetto citopatico). Pertanto la crescita di HAV in coltura cellulare deve essere dimostrata mediante l'applicazione successiva di un'ulteriore metodica, come ad esempio un test immunologico.

Le tecniche immunologiche, quali ELISA e RIA, permettono l'identificazione del virus e possono essere utilizzate direttamente sul materiale da esaminare per la determinazione della presenza di HAV, qualora il virus sia presente in quantità sufficiente. Tuttavia la loro sensibilità è bassa e perciò essi non sono adatti per l'analisi di campioni ambientali (Tabella 5).

In anni recenti sono state messe a punto tecniche di biologia molecolare molto sensibili e specifiche per la determinazione della presenza di materiale genetico specifico in vari tipi di campioni. In particolare, la metodica di "polymerase chain reaction" (PCR), che consente l'amplificazione di sequenze specifiche secondo la relazione  $2^n$  (dove  $n$  = numero di cicli di amplificazione) può essere usata per amplificare, a livelli rilevabili, specifiche sequenze di DNA presenti in un basso numero di copie in campioni di diversa origine.

La reazione di PCR può essere utilizzata anche per l'analisi di campioni contenenti RNA, facendola precedere da una reazione di trascrizione inversa (RT) per sintetizzare molecole di DNA a singola elica complementari all'RNA da esaminare.

Pertanto la RT-PCR può essere applicata con successo alla ricerca dell'HAV in campioni ambientali di diversa provenienza, ad esempio acque od omogenati di mitili. L'applicazione di tale metodica offre diversi vantaggi in paragone all'isolamento in coltura cellulare: il tempo di esame del campione è ridotto da molte settimane ad ore, la sensibilità è elevata e inoltre la presenza di un virus specifico viene determinata direttamente senza necessità di analisi ulteriori.

L'utilizzo della metodica di PCR su campioni ambientali è però complicata dalla possibile presenza di inibitori della reazione, sia organici che inorganici, che è necessario rimuovere preventivamente con mezzi chimici (cloroformio) o fisici (separazione mediante cromatografia). Nel caso della ricerca dell'HAV un altro sistema utile per l'eliminazione di inibitori e di eventuali contaminanti è rappresentato dalla cattura dell'antigene con anticorpi specifici (AC-PCR), come descritto da Jansen *et al.* (17). Un ulteriore problema che può insorgere nell'analisi dei campioni ambientali è legato alla bassissima concentrazione del virus nel materiale da esaminare. In tal caso, sebbene il test di PCR sia molto sensibile è conveniente far seguire alla prima reazione di RT-PCR una seconda reazione di amplificazione utilizzando *primer* interni alla regione amplificata, cioè applicare una "nested" RT-PCR.

La metodica di PCR permette di ipotizzare la eventuale patogenicità di un campione ambientale ma non ne dimostra l'effettiva capacità infettante: il virus può essere non infettante

in quanto il suo involucro è danneggiato o nel campione sono presenti solo frammenti del genoma. Nella ricerca dell'HAV tale scoglio può essere superato facendo precedere la reazione di RT-PCR da una fase cattura (antigen-capture, AC) con un anticorpo specifico per le particelle virali complete: ciò assicura la potenziale capacità infettiva del virus poiché viene amplificato solo RNA proveniente da virioni intatti. Vi sono in commercio due preparazioni di anticorpi monoclonali che presentano tale capacità di discriminazione e che pertanto possono essere impiegati con successo per la cattura dell'HAV: l'anticorpo K2-4F2 (CSL, Australia) (18) e l'anticorpo 7E7 (Mediagnost, Germania) (Morace, comunicazione personale).

Attualmente non esiste una metodica standardizzata per la concentrazione delle acque o per l'estrazione del genoma dell'HAV da mitili.

Per quanto riguarda le acque, il volume minimo da analizzare a seconda della diversa provenienza non è stato ancora definitivamente stabilito. In generale tale volume è dell'ordine di centinaia di millilitri se si tratta acque superficiali prelevate da zone sicuramente infette o da liquami, di molti litri se vengono analizzate acque di sorgente o acque già sottoposte a trattamenti di depurazione e potabilizzazione. La maggior parte dei protocolli prevede la concentrazione del virus presente nel campione mediante adsorbimento su membrane elettropositive ed eluizione con estratto di carne al 3%.

Il materiale concentrato viene successivamente trattato con cloroformio per eliminare batteri e virus con involucro. Il virus viene rilevato con la nested RT-PCR, dopo estrazione dell'RNA o dopo immunocattura del virus con anticorpi specifici (11, 19, 20) (Figura 2).

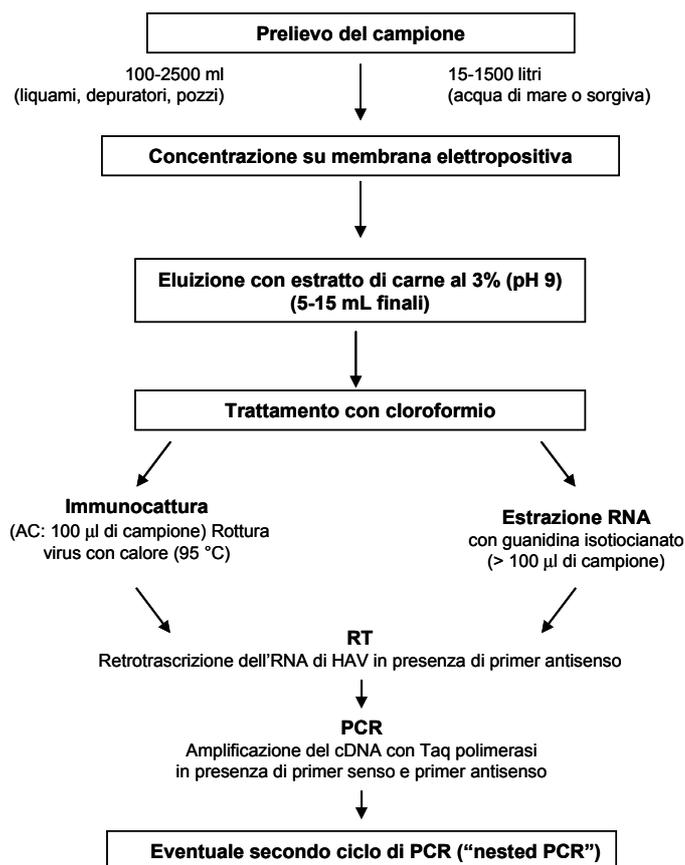


Figura 2. Esempio di protocollo per la determinazione dell' HAV in campioni di acque

Anche la ricerca dell'HAV nei molluschi non è ancora sufficientemente standardizzata. In generale le varie metodiche prevedono una fase di estrazione del virus dal corpo del mollusco che viene effettuata mediante trattamento dell'omogenato con un tampone a base di glicina e la sua precipitazione con PEG. Successivamente si procede all'estrazione dell'RNA virale mediante isotiocianato di guanidina o TCA, e alla sua amplificazione con RT-PCR (Tabella 6).

**Tabella 6. Esempio di protocollo per la ricerca dell'HAV nei molluschi**

Fasi	Procedimento
1	Omogenizzazione dei molluschi
2	Diluizione in tampone glicina
3	Concentrazione del virus con PEG
4	Estrazione RNA con tampone isotiocianato di guanidina
5	Centrifugazione attraverso cuscino di CsCl
6	Lavaggio dell' RNA con etanolo
7	Retrotrascrizione dell' RNA
8	Nested – PCR
9	Elettroforesi su gel

Qualora si voglia evitare la fase di estrazione dell'RNA, il punto 4) può essere sostituito con la metodica di cattura dell'antigene con anticorpo specifico. La presenza del tratto di genoma amplificato viene messa in evidenza mediante gel di agarosio. Nel caso non sia stata impiegata la tecnica di nested RT-PCR, per aumentare la sensibilità può essere necessario il trasferimento dell'amplificato su nitrocellulosa e la sua ibridazione con una sonda radioattiva specifica.

La metodica di AC-RT-PCR ha permesso di dimostrare la presenza in Italia di HAV in acque di varia provenienza anche in caso di epidemie e da molluschi provenienti dal mare Adriatico (11, 12, 21). In tali studi è stata impiegata la tecnica di “nested” RT-PCR preceduta dalla cattura dell'antigene con un anticorpo specifico per la particella virale o l'estrazione dell'RNA virale dall'omogenato di mitili, mediante estrazione con guanidina. I *primer* sono stati selezionati in base al 100% di identità di sequenza tra diversi isolati in differenti parti del mondo, in modo da poter riconoscere qualsiasi ceppo presente nel materiale in esame.

In anni recenti è stato dimostrato che, sebbene l'HAV presenti un solo sierotipo, nel mondo circolano diversi genotipi con diversa distribuzione. Qualora si voglia eseguire la genotipizzazione per stabilire il genotipo (o i genotipi) coinvolto in differenti epidemie e tracciare un'eventuale mappa della circolazione di diversi ceppi di HAV è conveniente selezionare i *primer* per l'amplificazione nella regione genomica VP1-2A, tra i nucleotidi 2799 e 3375: Applicando due coppie di *primer* “nested” (Tabella 7) è possibile amplificare un frammento di genoma corrispondente a 374 basi. Tale regione è relativamente variabile in paragone ad altre regioni genomiche dell'HAV, e permette la classificazione genotipica delle sequenze amplificate attraverso il loro sequenziamento e il successivo paragone con i dati riportati in letteratura (22, 23).

**Tabella 7. Primer per la genotipizzazione di HAV tramite RT-PCR**

Primer	Sequenza del primer
Primer senso esterno	5'-ATTCAGATTAGACTGCCTTGGA-3'
Primer anti esterno	5'-AGTAAGAACCCCTCCAGCATCCATTC -3'
Primer senso interno	5'-CTATTCAGATTGCAAATTACAAT-3'
Primer anti interno	5'-AACTTCATTATTACATGCTCCT-3'

Uno studio sulla presenza dell'HAV in campioni di liquami grezzi e in acque effluenti da impianti di depurazione è in corso nell'ambito del progetto "Epatite Virale" dell'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione tra i laboratori di Igiene Ambientale e Virologia. Risultati preliminari hanno mostrato la presenza dell'HAV non solo nei liquami grezzi, ma anche nell'effluato, anche se in quantità minore. La presenza di virus infettante, suggerita dal nostro sistema di AC-RT-PCR, è stata confermata mediante inoculo dei campioni su colture cellulari. Gli isolati verranno sequenziati nella regione genomica VP1-2A per determinare il genotipo/i presenti nella zona studiata.

## Bibliografia

1. Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol Suppl* 1991;2:320-6.
2. Abad FX, Pintò RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3704-10.
3. Hollinger FB, Ticehurst JR. Hepatitis A virus. In: Fields BN, et al. (Ed.). *Fields virology*. 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 735-82.
4. Shapiro CN, Margolis HS. Worldwide epidemiology of hepatitis A virus infection. *J Hepatol* 1993;18:S11-S14.
5. Lemon S. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clinical Chemistry* 1997;43:1494-9.
6. Stroffolini T, D'Amelio R, Matricardi PM, Chionne P, Napoli A, Rapicetta M, Crateri S, Pasquini P. The changing epidemiology of hepatitis A in Italy. *Ital J Gastroenterol* 1993;25:372-4.
7. Panà A, Franco E. The epidemiology of hepatitis A in Italy. *Res Virol* 1995;146:249-52.
8. Barbuti S, Germinario C, Lopalco PL, Quarto M. Epatite A in Puglia: l'epidemia del 1966. *Vaccinazione 2000* 1996;45:3-4.
9. Lucioni C, Cipriani V, Mazzi S, Panunzio M. Cost of an outbreak of hepatitis A in Puglia, Italy. *Pharmacoeconomics* 1998;13:257-66.
10. Leoni E, Bevini C, Degli Esposti S, Graziano A. An outbreak of intrafamilial hepatitis A associated with clam consumption: epidemic transmission to a school community. *Eur J Epidemiol* 1998;14:187-92.
11. Morace G, Pisani G, Divizia M, Panà A. Detection of hepatitis A virus in concentrated river water by polymerase chain reaction. *Zentralbl Hyg* 1993;193:521-7.
12. Divizia M, Gnesivo C, Bonapasta RA, Morace G, Pisani G, Panà A. Hepatitis A virus identification in an outbreak by enzymatic amplification. *Eur J Epidemiol* 1993;9:203-8.
13. Ward KE, Irving LG. Virus survival on vegetables spray washed with waste water. *Water Res* 1987;21:57-61.
14. Appleton H. Foodborne viruses. *Lancet* 1990;336:1362-4.
15. Mannucci PM, Gdovin S, Gringeri A, and The Italian Collaborative Group. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent-detergent to inactivate viruses. *Ann Int Med* 1994;120:1-7.
16. Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Divizia M, Donia D, Cosentino AM, Moretti P, Costantini G. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and Escherichia coli in adriatic sea mussels. *J Appl Microbiol* 2000;88:293-8.
17. Jansen RW, Siegel G, Lemon SN. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen capture/polymerase chain reaction method. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990;87:2867-71.

18. Probst C, Jecht M, Gauss-Müller V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *J Biol Chem* 1999;274:4527-31.
19. Abbaszadegan M, Stewart P, Lechevallier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 444-9.
20. Graff J, Ticehurst J, Flehmig B. Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3165-70.
21. 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. *Int J Food Microbiol* 1999;48:67-71.
22. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon S. Genetic relatedness of hepatitis a virus strains recovered from different geographic regions. *J Gen Virol* 1992;73:1365-77.
23. De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, Brassard N, Barthe C, Dionne M, Prud'homme H, Paradis D, Shapiro CN, Nainan OV, Margolis HS. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* 1999;179:37-43.

# ANALISI MICROBIOLOGICHE SU ACQUE DI FALDA DELLA PROVINCIA DI TREVISO

Marina Raris, Franco Rigoli, Valentina Catto, Biancarosa Fiorotto, Alfredo Mussato  
*Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione Ambientale del Veneto, Dipartimento Provinciale di Treviso, Treviso*

## Introduzione

Avendo partecipato ad un progetto dell'Istituto Superiore di Sanità sulle acque di falda e partendo dalla considerazione che l'accertamento della presenza di organismi cosiddetti "fastidiosi" è, generalmente, trascurato, si è condotta un'indagine nella provincia di Treviso, con la finalità di verificare, in tre differenti tipologie di acquiferi la presenza di indicatori di contaminazione fecale e di altri microrganismi "indesiderabili". Questa provincia occupa parte del territorio della alta e media pianura veneta e comprende, a Nord, la fascia prealpina. Nella fascia dell'alta pianura, a ridosso dei rilievi prealpini, è presente un sottosuolo pressoché interamente ghiaioso, indifferenziato anche per qualche centinaio di metri di spessore, che consente la presenza di un'unica potente falda di tipo freatico. A valle, nella media pianura, il sottosuolo mostra una progressiva differenziazione stratigrafica fino ad una struttura caratterizzata da alternanze di livelli alluvionali ghiaiosi con livelli limoso-argillosi, per spessori di almeno 300-400 m. Pertanto dal sistema monofalda si passa a quello multifalde (una falda freatica e più falde in pressione separate tra loro). Nella fascia prealpina sono presenti acquiferi alimentati per carsismo o fratturazione. Le condizioni idrogeologiche sono determinanti per l'accessibilità degli inquinanti alle falde.

## Materiali e metodi

Le stazioni di prelievo sono state: Sorgente Tegorzo situata nella fascia prealpina (provincia di Belluno) ma utilizzata da un acquedotto trevigiano); Pozzo n. 1 (Silea-TV) e Pozzo n. 6 (Treviso) situati nella fascia tra l'alta e media pianura all'interno della zona delle risorgive. Nella Tabella 1 ne sono riportate le principali caratteristiche.

**Tabella 1. Caratteristiche principali dei tre tipi di acqua di falda considerate nel presente lavoro**

Caratteristiche	Sorgente Tegorzo	Pozzo artesiano n. 1	Pozzo trivellato n. 6
Ubicazione	400 m s.l.m. Quero (BL) Monte Capra	14 m s.l.m. Silea (TV)	15 m s.l.m. Treviso
Anno di costruzione	1932	1960 (utilizzo dal 1965)	1937 (riattivato 1972)
Portata (L/s)	350-400 (300 captati)	25	30
Fonte approvvigionamento	Acquedotto Alto Trevigiano (54 comuni, 300.000 abitanti, 350 km <sup>2</sup> )	Acquedotto Sile-Piave (6 comuni provincia TV+3 comuni provincia VE, 75.000 abitanti, 275 km <sup>2</sup> )	Acquedotto Comunale di Treviso (85.000 abitanti, 50 km <sup>2</sup> )

Sui campioni prelevati in primavera e alla fine dell'estate 1999 sono state effettuate determinazioni fisico-chimiche e le seguenti analisi microbiologiche (1):

1. Coliformi totali terreno m-Endo agar LES a  $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  per 24 h.
2. Coliformi fecali su mFC agar a  $44 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  per 24 h.
3. *Escherichia coli* su nutrient agar addizionato di MUG, utilizzato in seconda battuta come conferma per le colonie enumerate su sui terreni mFC ed m-Endo agar LES.
4. Enterococchi su Slanetz Bartley medium a  $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  per 48 h e successiva conferma su Esculina Iron agar, incubato a  $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$  per 3 ore.
5. Conta batterica rilevata su Agar sangue a  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  per 5-7 giorni per l'enumerazione dei batteri mesofili (emolitici e non emolitici) e a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  per 3 giorni per gli psicrofili (emolitici e non emolitici). I batteri isolati sono stati sottoposti alla verifica della resistenza alla presenza della streptomina secondo le modalità indicate nel protocollo di lavoro previsto per le analisi delle acque di falda (1).
6. Enumerazione di Attinomiceti per spatolamento su piastre di Agar Amido.
7. Enumerazione di *Pseudomonas* spp. su Pseudosel agar e osservazione per la rilevazione della fluorescenza..
8. Enumerazione di *Aeromonas* spp. su destrina/ampicillina agar e successive prove di conferma per la verifica della presenza di ossidasi.
9. Enumerazione di lieviti e muffe su agar malto.
10. Enumerazione presuntiva di *Acinetobacter* secondo le modalità indicate nel protocollo di lavoro previsto per le analisi delle acque di falda (1).
11. Fagi di *Escherichia coli* su PAC (Phage agar concentrate) e verifica delle aree di lisi.
12. Enumerazione di batteri filamentosi per osservazione microscopica di membrane filtranti diafanizzate.
13. Conteggio per osservazione microscopica dei Protozoi a vita libera su vetrini a fresco o colorati con Bleu cotton.
14. Ricerca di Metazoi su 25 L di acqua filtrati attraverso membrane di  $5\mu$  e successivamente di  $1\mu$ .
15. Accertamento della presenza di biofilm con fluoresceina di acetato (FDA).

In relazione alla caratterizzazione fisico-chimica dei campioni sono state effettuate misurazioni di temperatura, torbidità, pH, ossigeno disciolto, ossidabilità. È stato fatto, comunque, costante riferimento alle notizie storiche in possesso del laboratorio riguardo le sorgenti interessate.

## Risultati

Le temperature dell'acqua nelle tre stazioni hanno confermato una notevole stabilità nei due periodi di osservazione (Tabella 2). I parametri esaminati e i relativi risultati sono schematizzati nelle Tabelle 3-5.

**Tabella 2. Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) misurate nei punti di prelievo nel corso di due campionamenti**

Punto prelievo	1° prelievo (aprile-maggio)		2° prelievo (settembre)	
	aria	acqua	aria	acqua
Sorgente Tegorzo Quero (BL)	9	8,1	22	8,6
Pozzo artesiano Silea (TV)	19	15,0	20	15,7
Pozzo trivellato Treviso	20	14,3	22	14,5

**Tabella 3. Parametri microbiologici e chimici rilevati su campioni di acqua raccolti dalla Sorgente Tegorzo sita nel comune di Quero (BL)**

Parametri microbiologici	Data prelievo 20 aprile 1999	Data prelievo 14 settembre 1999
Coliformi totali UFC/100 mL	31	4
Coliformi fecali UFC/100 mL	1	0
<i>Escherichia coli</i> UFC/100 mL	1	1
Enterococchi UFC/100 mL	0	1
Conta batterica a 22 °C per 5-7 gg UFC/mL	115	7,4
Conta batterica a 30 °C per 3 gg UFC/mL	104	10,1
1. Psicrofilii non emolitici S.R.* /mL	0	0
2. Psicrofilii non emolitici S.S.°/mL	113	7
3. Psicrofilii emolitici S.R. /mL	0	0,2
4. Psicrofilii emolitici S.S. /mL	2	0,2
5. Mesofili non emolitici S.R. /mL	0	0
6. Mesofili non emolitici S.S. /mL	100	10
7. Mesofili emolitici S.R. /mL	0	0
8. Mesofili emolitici S.S. /mL	4	0,1
Eterotrofi antibiotico-resistenti /mL	< 0,1	0,2
Attinomiceti UFC/mL	1	< 1
<i>Pseudomonas</i> spp. UFC/100 mL	600	0
<i>Aeromonas</i> UFC/100 mL	10	0
Lieviti UFC/250 mL	75	0
Muffe UFC/ 250 mL	8	0
<i>Acinetobacter</i> /2 mL	0	0
Batteriofagi anti <i>E. coli</i> UFP/100 mL	0	0
Batteri filamentosi /1000 mL	Assenti	Assenti
Protozoi / 2000 mL	Assenti	Assenti
Metazoi / 2000 mL	Assenti	Assenti
pH	8,00	8,10
Conducibilità a 20 C° us/cm	205	215
DOC mg/L	1,1	0,5
Ossigeno disciolto mg/L	11,5	11,1

\*S.S. = streptomina sensibili  
°S.R. = streptomina resistenti.  
DOC = Dissolved Organic Carbon

**Tabella 4. Parametri microbiologici e chimici rilevati su campioni di acqua raccolti dal Pozzo Artesiano n. 1 profondo m 220 e sito nel comune di SILEA (TV)**

Parametri microbiologici	Data prelievo 15 maggio 1999	Data prelievo 27 settembre 1999
Coliformi totali UFC/100 mL	0	0
Coliformi fecali UFC/100 mL	0	0
<i>Escherichia coli</i> UFC/100 mL	0	0
Enterococchi UFC/100 mL	0	0
Conta batterica a 22 °C per 5-7 gg UFC/mL	21	21
Conta batterica a 30 °C per 3 gg UFC/mL	26	19
1. Psicrofili non emolitici S.R.* /mL	0	0
2. Psicrofili non emolitici S.S.°/mL	21	21
3. Psicrofili emolitici S.R. /mL	0	0
4. Psicrofili emolitici S.S. /mL	0	0
5. Mesofili non emolitici S.R. /mL	0	0
6. Mesofili non emolitici S.S. /mL	25	19
7. Mesofili emolitici S.R. /mL	0	0
8. Mesofili emolitici S.S. /mL	1	0
Eterotrofi antibiotico-resistenti /mL	< 0,1	< 0,1
Attinomiceti UFC/mL	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp. UFC/100 mL	28	0
<i>Aeromonas</i> UFC/100 mL	1	0
Lieviti UFC/250 mL	4	2
Muffe UFC/ 250 mL	10	14
<i>Acinetobacter</i> /2 mL	0	0
Batteriofagi anti <i>E. coli</i> UFP/100 mL	0	0
Batteri filamentosi /1000 mL	<i>Gallionella ferruginea</i>	Assenti
Protozoi / 2000 mL	Assenti	Assenti
Metazoi / 2000 mL	Assenti	Assenti
pH	7,75	7,80
Conducibilità a 20 C° us/cm	350	350
DOC mg/L	0,8	< 0,5
Ossigeno disciolto mg/L	3,4	3,0

\*S.S. = streptomina sensibili  
°S.R. = streptomina resistenti.  
DOC = Dissolved Organic Carbon

**Tabella 5. Parametri microbiologici e chimici rilevati su campioni di acqua raccolti dal pozzo trivellato n. 6 profondo m 127 e sito nel comune di Treviso**

Parametri microbiologici	Data prelievo 15 maggio 1999	Data prelievo 27 settembre 1999
Coliformi totali UFC/100 mL	0	0
Coliformi fecali UFC/100 mL	0	0
<i>Escherichia coli</i> UFC/100 mL	0	0
Enterococchi UFC/100 mL	0	0
Conta batterica a 22 °C per 5-7 gg UFC/mL	0,1	2,1
Conta batterica a 30 °C per 3 gg UFC/mL	2	2,2
1. Psicrofilii non emolitici S.R.* /mL	0	0
2. Psicrofilii non emolitici S.S.°/mL	0,1	2,1
3. Psicrofilii emolitici S.R. /mL	0	0
4. Psicrofilii emolitici S.S. /mL	0	0
5. Mesofili non emolitici S.R. /mL	0	0,2
6. Mesofili non emolitici S.S. /mL	2	2
7. Mesofili emolitici S.R. /mL	0	0
8. Mesofili emolitici S.S. /mL	0	0
Eterotrofi antibiotico-resistenti /mL	< 0,1	0,2
Attinomiceti UFC/mL	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp. UFC/100 mL	0	0
<i>Aeromonas</i> UFC/100 mL	0	0
Lieviti UFC/250 mL	0	13
Muffe UFC/ 250 mL		
<i>Acinetobacter</i> /2 mL	0	0
Batteriofagi anti <i>E. coli</i> UFP/100 mL	0	0
Batteri filamentosi /1000 mL	0	0
Protozoi / 2000 mL	0	0
Metazoi / 2000 mL		
pH	7,75	7,75
Conducibilità a 20 C° us/cm	370	370
DOC mg/L	0,5	< 0,5
Ossigeno disciolto mg/L	3,0	2,4

\*S.S. = streptomina sensibili  
°S.R. = streptomina resistenti.  
DOC = Dissolved Organic Carbon

## Discussione

Si riportano alcune osservazioni sulle nuove tecniche microbiologiche utilizzate e proposte dal protocollo previsto per le analisi delle acque di falda (1).

La Conta batterica diretta al microscopio, benchè previsto dal protocollo operativo, ha evidenziato alcune difficoltà legate all'azione presumibilmente tossica dell'arancio di acridina. Il problema sembra sia stato riscontrato anche da altri laboratori, pertanto dovrebbe essere riconsiderato l'utilizzo di tale reattivo.

La Conta batterica su Agar sangue ha messo in evidenza la necessità di valutare la presenza o l'assenza di emolisi su un numero limitato di colonie, per evitare fenomeni di sovrapposizione, pertanto in caso di acque con elevate cariche batteriche è necessario procedere a diluizioni.

Per la Conta batterica dei germi streptomicina sensibili e resistenti, al fine di facilitare la lettura delle piastre e pertanto evidenziare la crescita di colonie streptomicina resistenti, in corrispondenza dei fori praticati sulla superficie dell'agar contenente streptomicina, è stato introdotto nella preparazione del terreno un colorante vitale il TTC (tetrafeniltrazolio cloruro).

Anche per *Pseudomonas* spp. risulta necessario operare con bassi numeri di colonie per piastra per facilitare l'evidenziazione della fluorescenza; un alto numero di colonie determina confluenza degli aloni di fluorescenza.

Come si evidenzia dai risultati riportati nella tabella 3, le analisi microbiologiche hanno confermato per la Sorgente Tegorzo l'influenza degli eventi meteorici nelle variazioni delle cariche microbiche dei parametri quali Coliformi totali, Conte batteriche, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas*, Lieviti e Muffe.

Mentre per i pozzi di Silea e Treviso i risultati (vedi tabelle 4 e 5) hanno evidenziato assenza dei principali batteri indicatori di inquinamento fecale e presenza di specie di rilevanza ambientale.

In particolare per il pozzo di Silea è stata rilevata la presenza di batteri filamentosi (*Gallionella ferruginea*); dai dati storici in possesso si evidenzia che tale riscontro è frequente, pur se discontinuo, associato a solfobatteri, protozoi, nematodi e conferma la presenza una comunità biofilmante.

In generale il significato igienico e ambientale di queste presenze va maggiormente approfondito per la formulazione di un giudizio di qualità delle acque, collegato al grado di vulnerabilità degli acquiferi.

I valori di pH rilevati rientrano nella normalità per acque di questo tipo, con discreto contenuto di bicarbonati che portano a leggera alcalinità. Non si osservano variazioni significative a conferma della stabilità degli acquiferi.

La Conducibilità elettrica a 20 °C indica una salinità medio-bassa. Per questo tipo di acque, regolate soprattutto dagli equilibri del sistema Ca-CO<sub>2</sub>, può essere stimato un residuo fisso a 180° come da Tabella 6.

**Tabella 6. Relazione conducibilità / residuo salino**

Conducibilità (microS/cm)	Residuo salino (mg/L)
205	135
350	235
370	245

Appare utile chiarire che le misure Carbonio Organico Disciolto (DOC) sono state ottenute con metodo strumentale che prevede ossidazione dell'acqua con Persolfato di sodio e irraggiamento UV a bassa temperatura, quindi rilevazione della CO<sub>2</sub> svolta mediante IR non dispersivo in gas di trasporto O<sub>2</sub>. L'ossidazione avviene dopo eliminazione del Carbonio Inorganico per acidificazione con acido fosforico. Il volume campionato è di 10 mL. Da notare che con questo metodo viene determinato in realtà il solo Carbonio Organico Disciolto non volatile. I valori rilevati rientrano nella normalità di acque di falda povere di Carbonio Organico, ma si possono notare apprezzabili variazioni stagionali, in particolare nella sorgente Tegorzo.

Come ci si attende da sorgenti con circolazione di tipo carsico, i valori di Ossigeno Disciolto rilevati nella Sorgente Tegorzo evidenziano una buona ossigenazione. Diversamente i valori dei pozzi indicano leggera ossigenazione e buona stabilità ad indicare origine da falde profonde con circolazione lenta.

Allo scopo di disporre di un maggior numero di dati che possano essere utilizzati per la valutazione della qualità ambientale e dei problemi igienici legati all'uso di queste acque di falda, si ritiene importante proseguire l'applicazione sperimentale del protocollo di lavoro previsto (1) su altri campioni che verranno prelevati.

## Ringraziamenti

Si ringrazia per la disponibilità e la collaborazione l'Acquedotto Schievenin-Alto Trevigiano di Montebelluna (TV), l'Acquedotto Sile-Piave di Roncade (TV), l'Acquedotto Comunale di Treviso e il Servizio Igiene Alimenti e Nutrizione del Dipartimento di Prevenzione ULSS n. 8 di Montebelluna (TV).

## Bibliografia

1. Volterra L. Acque di falda: nuovi indicatori di qualità e rischio sanitario (Progetto di ricerca triennale ISS). In: *Relazione dell'Istituto Superiore di Sanità sui risultati dell'attività svolta nell'esercizio finanziario 2000 e programma per l'esercizio 2002*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2001. p.57-8. (Rapporti ISTISAN 01/36).

# APPLICAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI LAVORO SULLE ACQUE DI FALDA NELLA PROVINCIA DI RIETI

Adriana Vecchi, Cesare Pezzotti

Area Laboratorio Sanitaria, Unità Analitica di Supporto, ARPA Lazio Sezione Provinciale di Rieti, Rieti

## Introduzione

La maggior parte dell'acqua in distribuzione nelle reti acquedottistiche italiane deriva da acque di falda. Particolare interesse deve suscitare la presenza dei cosiddetti "organismi indesiderabili" anche in assenza degli abituali indicatori di contaminazione fecale.

È sempre stato interesse del nostro comparto cercare di dare significato alla presenza di organismi indesiderabili ogni volta che, nel corso di indagini analitiche sul sistema acqua/rete di distribuzione, se ne riscontrava occasionalmente la presenza.

La finalità di questo lavoro è di comprendere quanto, pur trovandoci in un territorio particolarmente ricco di acque profonde e sorgive e, con un ambiente poco compromesso dall'intervento "umano", siano presenti e quindi potenzialmente dannose queste figure biologiche nocive alla salute umana direttamente o come veicolo di altri agenti patogeni.

## Materiali e metodi

Sono state scelte per ogni territorio provinciale due realtà storicamente diverse:

- *Sorgente n. 1 Pozzo Madonna del Passo* (Rieti)  
una sorgente geologicamente ben protetta e dotata di un sistema di condottamento efficiente e ben gestito
- *Sorgente n. 2 Sorgente Acquagrossa di Rivodutri* (Rieti)  
caratterizzata da frequenti manifestazioni di vulnerabilità dovute probabilmente a fattori ambientali e/o gestionali.

La prima sorgente è situata alle pendici del monte Terminillo, località Madonna del Passo. La trivellazione eseguita è a 532 m s.l.m., la profondità è di 123 m dal p.d.c. La falda si trova dopo il superamento della prima formazione calcarea, che funge da serbatoio alle acque sottostanti, ed è sicuramente collegata ad un enorme bacino di alimentazione che interessa gran parte degli Appennini Centrali a varie profondità. Questa supposizione è suffragata dalla notevole portata idrica (200 L/s). La sorgente serve circa 50.000 abitanti e non è sottoposta a clorazione continua.

La seconda sorgente è costituita da una captazione effettuata con due prese naturali nel punto di emersione a quota di 928 m s.l.m. Durante l'esecuzione delle analisi di routine si è verificato con frequenza in passato il superamento dei limiti di legge e per tale motivo le acque sono sottoposte a clorazione continua prima della distribuzione. L'acqua di questa sorgente viene condottata fino ad un partitore di raccolta, qui miscelata con un'altra sorgente, sottoposta a clorazione continua e distribuita ad un comprensorio di tre comuni che contano complessivamente circa 10.000 abitanti.

Le acque delle sorgenti sono state analizzate secondo le procedure disposte e concordate con il Laboratorio ambientale dell'Istituto Superiore di Sanità, che ha fornito un protocollo di lavoro indirizzato proprio alle analisi specifiche per la caratterizzazione di acque di falda (1).

Sono stati effettuati due prelievi nell'arco di un anno: uno nel periodo di piena e uno nel periodo di magra.

Durante il sopralluogo effettuato in fase di campionamento è stato rilevato il cattivo stato di manutenzione della sorgente Acquagrossa sia nel manufatto, colonizzato da diversi animali, sia per mancanza della zona di rispetto assoluta in quanto non recintata completamente e sede di pascolo libero.

Le ricerche eseguite sono state le seguenti:

1. Coliformi fecali rilevati con il metodo delle membrane filtranti poste, dopo la filtrazione del campione, su terreno mFC a  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  per 24 h. Sono state enumerate le colonie di varie gradazioni di blu.
2. Coliformi totali rilevati con il metodo delle membrane filtranti poste, dopo la filtrazione del campione, su terreno m-Endo agar LES a  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per 24 h. Sono state enumerate le colonie di colore rosso scuro o metallizzate.
3. *Escherichia coli* rilevata trasferendo le membrane dai terreni mFC ed m-Endo agar LES su terreno addizionato di MUG, mantenendovele per 3 ore a  $36\text{ °C}$  e considerando positive per *E. coli* le colonie fluorescenti all'esame della lampada di Wood. Sono state ricercate anche forme non coltivabili di *Escherichia coli* presso l'Università di Verona, con l'applicazione di metodi di biologia molecolare.
4. Enterococchi rilevati con il metodo delle membrane filtranti poste, dopo la filtrazione del campione, su terreno m-Enterococcus agar a  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per 48 h e considerando positive le colonie rosse. Le colonie presuntivamente considerate enterococchi sono state sottoposte a prove di conferma trasferendo le membrane su Esculina Iron agar, incubato a  $36\text{ °C}$  per 3 ore. Sono state confermate come enterococchi le colonie che hanno mostrato sul retro delle membrane un precipitato nero.  
Sono state ricercate anche forme non coltivabili di *Enterococcus faecalis* presso l'Università di Verona (2).
5. Conta batterica rilevata su quantità di 1 mL e 10 mL di campione, con il metodo delle membrane filtranti poste dopo la filtrazione del campione su terreno Agar sangue a  $22\text{ °C}$  per 5-7 giorni (mesofili) e a  $30\text{ °C}$  per 3 giorni (psicrofili). Sono state contate le colonie caratterizzate da attività emolitica e quelle non emolitiche. Le colonie di microrganismi emolitici e non emolitici sono state saggiate per la resistenza alla streptomina (a due concentrazioni: 0,1 mg e 1 mg/piastra) sovrapponendo le relative membrane filtranti sul terreno specifico (Antibiotic Medium n.2) e forando con un ago le colonie in modo che parte della colonia potesse essere posta a contatto col terreno contenente l'antibiotico. nello stesso.
6. Conta batterica diretta al microscopio, che è stata eseguita sul campione fissato con glutaraldeide in tampone fosfato e colorato con arancio di acridina (1 mL di campione fissato si unisce 1 mL di arancio di acridina) si filtra su membrana da  $0,22\text{ }\mu$  di porosità e dopo asciugatura si legge al microscopio a 100x con obiettivo ad immersione. Il numero delle cellule presenti va contato su almeno 20 campi e calcolato secondo la formula:  
$$\text{Cellule totali/mL} = N_i \times (A/a) \times (1/n_i) \times (1/V).$$
7. Attinomiceti su Agar Amido: spatolamento in superficie e incubazione a  $22\text{ °C}$  per almeno 7 giorni. Vanno contate le tipiche colonie crostose o cotonose con odore di terra, gram positive.
8. *Pseudomonas* spp. in 100 mL di campione: filtrare con membrana  $0,45\text{ }\mu$  di porosità, porre su Pseudosel agar e incubare a  $30\text{ °C}$  per 48-72h. Contare le colonie fluorescenti.

9. Lieviti e Muffe su agar malto: eseguire doppia semina di 1 mL e 30 mL di campione e incubare a T ambiente per 5 giorni.
10. Ricerca diretta di batteri filamentosi: filtrare 1000 mL di campione attraverso una membrana di 0,45  $\mu$  di porosità, lasciare asciugare diafanizzare e contare i filamenti su almeno 5-7 campi microscopici.
11. *Aeromonas* spp. su destrina/ampicillina agar: filtrare 100 mL di campione e incubare a 30 °C in anaerobiosi per 24-48h. Considerare *Aeromonas* positive le colonie gialle ossidasi positive.
12. Batteriofagi anti *Escherichia coli* su PAC (Phage agar concentrate). Filtrati 100 mL di campione, uniti a 5 mL di brodocoltura di *Escherichia coli* di 12h. È stata aggiunta la di  $\text{CaCl}_2$  e il tutto al PAC. La membrana filtrante è stata posta su piastre da 10-14 cm di diametro incubate a 37 °C per una notte.
13. Misura del biofilm con Fluoresceina DiAcetato (FDA) per poter quantificare la carica batterica in esso presente. Si opera su 0,1 e 1 mL di biofilm raschiato dalle pareti di tubi e/o vasche e unito a 5 mL di tampone fosfato sterile 60 mM con pH 7,6 e, a 0,1 mL di soluzione acetonica di FDA 2 mg/mL. Si legge l'assorbanza della soluzione dopo averla filtrata su carta.
14. Conta diretta dei Protozoi a vita libera con vetrini a fresco o colorati con Bleu cotton.
15. Ricerca di Metazoi su 25 L di acqua: filtrare con filtri scalari con porosità da 5 a 1  $\mu$ , sciacquare poi la membrana con pochi mL di acqua campione e osservare successivamente al microscopio ottico direttamente o dopo fissazione con soluzione di formalina acetata.
16. Sono state anche effettuate analisi per la caratterizzazione fisico-chimica dei campioni in esame (temperatura, torbidità, pH, ossigeno disciolto, ossidabilità), facendo sempre comunque costante riferimento alle notizie storiche in possesso del laboratorio riguardo le sorgenti interessate.

## Risultati e discussione

I parametri chimici dei due prelievi effettuati sulla sorgente n. 1 Pozzo Madonna del Passo si presentano più o meno costanti nel tempo e nella norma come evidenziato dalla Tabella 1.

**Tabella 1. Madonna del Passo (Rieti): valori dei parametri chimico-fisici**

Parametri	1° prelievo	2° prelievo
Colore mg/L (Scala Pt/Co)	Incolore	Incolore
Odore	Inodore	Inodore
Sapore	Insapore	Insapore
Torbidità ( $\text{SiO}_2$ ) (mg/L)	1	1
Temperatura acqua (°C)	12	10
Temperatura aria (°C)	23	20
pH	7,28	7,33
Conducibilità elettrica	345	410
Ossigeno Disciolto (mg/L)	10,6	10,9
Ossigeno Disciolto (% di saturazione)	119,7	113,5
Cloruri ( $\text{Cl}^-$ ) (mg/L)	8,86	12,41
Azoto Ammoniacale ( $\text{NH}_4^+$ )(mg/L)	Assente	Assente
Azoto Nitroso ( $\text{NO}_2^-$ ) (mg/L)	Assente	Assente
Azoto Nitrico ( $\text{NO}_3^-$ ) (mg/L)	Assente	Assente
Cloro Residuo Libero ( $\text{Cl}_2$ )	Assente	Assente
Durezza totale (°F)	18,9	17,4
Portata (L/s)	240	200

La Tabella 2 riporta i risultati delle analisi microbiologiche. Si nota l'assenza o scarsa presenza di indicatori d'inquinamento fecale e ciò conferma che si tratta di una sorgente sicura dal punto di vista igienico.

**Tabella 2. Pozzo Madonna del Passo (Rieti): risultati delle analisi microbiologiche**

Parametri microbiologici	1° prelievo	2° prelievo
Coliformi totali/100 mL	Assenti	1
Coliformi fecali/100 mL	Assenti	Assenti
Enterococchi/100 mL	Assenti	Assenti
Batteri mesofili, non emolitici, resistenti a streptomina	10 (strep.sens)	21 (strep.sens.)
Batteri mesofili, emolitici	0	0
Batteri psicrofili, non emolitici,	8"	7"
Batteri psicrofili, emolitici	0	1"
Attinomiceti	1	0
<i>Pseudomonas</i> /100 mL	Assenti	2
Lieviti e muffe/100 mL	18	10
Biofilm (misura con FDA) a 490 nm/0,1 mL	--	3 · 10 <sup>7</sup>
Biofilm (misura con FDA) a 490 nm/1 mL	--	10 <sup>8</sup>
<i>Aeromonas</i> /100 mL	Assenti	6
Conta batterica diretta/9 mL	84	51
Ricerca batteri filamentosi/1 L	220	--
Fagi di <i>Escherichia coli</i> /100 mL	Assenti	Assenti
Protozoi a fresco con Blue-cotton	Assenti	Rari
Metazoi/3L	Assenti	Assenti

Su Agar Sangue sono stati isolati batteri emolitici (Tabella 2). Questo risultato è interessante perché con l'uso di un terreno più ricco di nutrienti rispetto al Plate Count Agar si è ottenuto un buon sviluppo dei batteri "stressati" provenienti dall'ambiente idrico.

La presenza di muffe e batteri filamentosi, possibili microrganismi biofilmanti e quindi potenzialmente dannosi per le condutture, denota il rapporto più o meno diretto con l'ambiente esterno.

Una nota particolare merita la conta della carica biofilmante eseguita per scarificazione delle pareti dei serbatoi e misurata con FDA. Questi depositi esistono e sono cospicui. Le alte cariche ottenute indicano che ciò che noi abitualmente troviamo non è che la minima parte di quanto è realmente presente.

Sono risultati sempre assenti i batteriofagi anti *Escherichia coli* e i metazoi. È ipotizzabile che i metodi eseguiti siano da rivedere, serve cioè un metodo con maggiore capacità di recupero per i primi (es. ultrafiltrazione tangenziale) e, un maggiore quantitativo di acqua da analizzare per i secondi.

È rara la presenza di Protozoi, di *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp.

Qualche riflessione va fatta sulle conte dirette: il metodo risulta di difficile attuazione sia per la speciale attenzione con la quale occorre lavorare con il colorante arancio di acridina sia per la filtrazione la cui attuazione presenta diverse difficoltà.

I risultati ottenuti nella sorgente Acquagrossa di Rivodutri (Rieti) (Tabella 3) confermano come questa sorgente sia realmente più vulnerabile della prima.

I parametri chimici sono risultati nella norma e senza variazioni notevoli nell'arco di un anno (Tabella 3).

**Tabella 3. Sorgente Acquagrossa di Rivodutri (Rieti): risultati dei parametri chimico-fisici**

Parametri	1° prelievo	2° prelievo
Colore mg/L (Scala Pt/Co)	Incolore	Incolore
Odore	Inodore	Inodore
Sapore	Insapore	Insapore
Torbidità (SiO <sub>2</sub> ) (mg/L)	1	1
Temperatura acqua (°C)	10	8
Temperatura aria (°C)	22	22
pH	7,31	7,50
Conducibilità elettrica	247	312
Ossigeno Disciolto (mg/L)	9,80	11
Ossigeno Disciolto (% di saturazione)	125,7	130,7
Cloruri (Cl <sup>-</sup> ) (mg/L)	7,80	8,51
Azoto Ammoniacale (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )(mg/L)	Assente	Assente
Azoto Nitroso (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (mg/L)	Assente	Assente
Azoto Nitrico (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (mg/L)	Assente	Assente
Cloro Residuo Libero (Cl <sub>2</sub> )	Assente	Assente
Durezza totale (° F)	14,9	13,7
Portata (L/s)	15	13

Si nota la scarsa presenza degli indicatori di inquinamento fecale (Tabella 4). La sporadica presenza di indicatori microbiologici di contaminazione fecale nei terminali può essere dovuta, oltre che a cause accidentali, alla sopravvivenza nei sistemi di condottamento (biofilm) dopo il loro arrivo occasionale in rete. In tale situazione infatti, questi microrganismi risultano protetti dai comuni sistemi di disinfezione (clorazione) e possono palesarsi in seguito ad episodi favorevoli quali, ad esempio, brusche variazioni nel flusso idrico.

**Tabella 4. Sorgente Acquagrossa (Rieti): risultati delle analisi microbiologiche**

Parametri microbiologici	1° prelievo	2° prelievo
Coliformi totali/100mL	Assenti	2
Coliformi fecali/100mL	Assenti	Assenti
Enterococchi/100mL	Assenti	Assenti
Batteri mesofili, non emolitici	10 (strep.sens)	168 (strep.sens.)
Batteri mesofili, emolitici	1	7
Batteri psicrofili, non emolitici	10	109
Batteri psicrofili, emolitici	0	11
Attinomiceti/100mL	Assenti	62
<i>Pseudomonas</i> /100mL	10	120
Lieviti e muffe/100mL	35	47
Biofilm (misura con FDA) a 490 nm/0,1mL	>10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>7</sup>
Biofilm (misura con FDA) a 490 nm/1mL	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>8</sup>
<i>Aeromonas</i> /100mL	8	220
Conta batterica diretta/9mL	97	26
Ricerca batteri filamentosi/1L	330	--
Fagi di <i>Escherichia coli</i> /100mL	Assenti	Assenti
Protozoi a fresco con Blue-cotton	Assenti	Rari
Metazoi/3L	Assenti	1 (Rotifero)

Anche in questo caso l'esame colturale su Agar Sangue ha evidenziato la presenza di più numerose forme emolitiche. Non sono stati evidenziati microrganismi antibiotico resistenti.

Nel caso specifico, la presenza di *Pseudomonas* spp, Attinomiceti, muffe e lieviti è risultata più abbondante rispetto a quanto evidenziatosi per l'altra sorgente. La situazione della sorgente Acquagrossa può essere conseguenza di collegamento più diretto con l'ambiente esterno, con scarsa attività di filtro dei terreni circostanti. Questi infatti provenendo da materiale organico derivante dal dilavamento dei terreni hanno poi buona capacità di sopravvivenza nell'ambiente idrico.

In questa sorgente la valutazione della presenza del biofilm nei serbatoi ha dato luogo a risultati che evidenziano una colonizzazione piuttosto avanzata delle superfici.

I batteriofagi di *Escherichia coli* sono risultati sempre assenti, rari i Protozoi e per quanto riguarda i Metazoi è stato rilevato un solo Rotifero.

Sono state eseguite analisi aggiuntive su campioni prelevati presso le stesse sorgenti, in particolare, sono state effettuate analisi per il rilevamento di

- *Escherichia coli* ed *Enterococcus faecalis* mediante l'applicazione di metodiche di biologia molecolare in grado di rilevare forme non coltivabili di questi microrganismi. Queste indagini sono state eseguite presso l'Università di Verona (2).

Sugli stessi campioni sono state eseguite analisi colturali classiche.

- Le cariche batteriche sono state rilevate su Brain Hearth Infusion agar incubato a temperatura ambiente (22-24 °C) per 3 giorni.
- *Escherichia coli* ed *Enterococcus faecalis* sono stati enumerati rispettivamente su MacConkey agar ed mEnterococcus incubati a temperatura ambiente per 3 giorni per permettere lo sviluppo di microrganismi stressed.

I risultati di queste prove aggiuntive sono di grande interesse. *Escherichia* ed *Enterococcus* non sono cresciute sui terreni di coltura classici, è, invece, risultata positiva la presenza di genoma di Enterococchi (Tabella 5).

**Tabella 5. Caratterizzazioni fisico-chimiche e ricerca di Forme Non Coltivabili di *Enterococcus faecalis* e di *Escherichia coli* in campioni delle sorgenti di Pozzo Madonna del Passo e Sorgente Acquagrossa**

Parametro	Pozzo Madonna del Passo		Sorgente Acquagrossa	
	giugno	ottobre	giugno	ottobre
Torbidità mg/L SiO <sub>2</sub>	1	1	1	1
Temperatura °C	12	10	10	10
pH	7,28	7,33	7,31	7,50
Conducibilità 20 °C	345	410	247	312
Percentuale di saturazione	119,7	113,5	125,7	103,7
Cloruri Cl <sup>-</sup> mg/L	8,86	12,41	7,00	8,51
Azoto ammoniacale NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg/ l	assente	assente	assente	assente
Azoto nitroso NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/L	assente	assente	assente	assente
Azoto nitrico NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	assente	assente	assente	assente
Cariche batteriche/mL	0	0	10	24
Cariche batteriche/10mL	3	3	94	206
<i>Escherichia coli</i> /100mL	0	1	3	0
Enterococchi/100 mL	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> (PCR)	positivo = 50 picogr= 25cellule/mL	positivo = 8 picogr= 2cellule/mL	positivo = 10 picogr= 5cellule/mL	positivo = 1 picogr= 1cellule/10mL
<i>Escherichia coli</i> (PCR)	negativo	negativo	negativo	negativo

## Conclusioni

In base ai risultati ottenuti dopo la prima esperienza possiamo affermare che già si è avuta una conferma, anche se parziale, delle ipotesi in premessa.

Infatti, anche quando gli indicatori di inquinamento fecale sono assenti, si evidenziano a volte altri tipi di microrganismi quando vengono impiegati metodiche e terreni di coltura diversi da quelli previsti dalle normative vigenti. Tale risultato ci induce a considerare anche altri fattori nella valutazione dello stato di salute di una falda idrica e del suo sistema di condottamento fino all'utente.

Il solo controllo degli indicatori di inquinamento fecale e, ancora di più quelli previsti dalle nuove direttive CEE, non danno la garanzia assoluta del controllo del fenomeno inquinamento.

Resta comunque da fare una valutazione più precisa sulla rilevanza epidemiologica della loro presenza ponendola anche e soprattutto in relazione alla popolazione più a rischio (es. bambini e immunodepressi).

## Bibliografia

1. Volterra L. Acque di falda: nuovi indicatori di qualità e rischio sanitario (Progetto di ricerca triennale ISS). In: *Relazione dell'Istituto Superiore di Sanità sui risultati dell'attività svolta nell'esercizio finanziario 2000 e programma per l'esercizio 2002*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2001. p.57-8. (Rapporti ISTISAN 01/36).
2. Del Mar Lleò M, Pierobon S, Tafi MC, Brugnoli A. Biologia molecolare applicata alla batteriologia. In: Volterra L, Aulicino FA (Ed.). *Acque di falda: stato dell'arte delle conoscenze in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1999. (Rapporti ISTISAN 99/32). p. 39-43.

## **CIRCOLAZIONE DI *VIBRIO CHOLERAE* IN AMBIENTI CONTAMINATI DA LIQUAMI**

Ennio Zaottini

Sezione Provinciale di Latina, ARPA Lazio, Latina

L'ipotesi dell'unica via di trasmissione oro-fecale per l'infezione colerica è inadeguata per spiegare il perdurare, il diffondersi e il riapparire in certe aree endemiche della epidemia del colera e non tiene conto soprattutto dell'importanza dell'ambiente. I vibrioni, come le salmonelle, hanno capacità di lunga sopravvivenza, una volta abbandonati i rispettivi ospiti: rilasciati nell'ambiente esterno, con vomito o feci, sono isolabili nei liquami e nelle acque superficiali in cui questi si immettono, nel suolo e sul biota (vegetale e animale) (1).

La diffusione di *V.cholerae* in ambienti acquatici è oggi una acquisizione largamente condivisa, non essendo casuale, tra l'altro, la sua appartenenza ad una famiglia i cui generi (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*) trovano habitat prevalente negli ecosistemi acquatici. Meno chiara, tuttavia, è la ragione della persistenza di *V.cholerae* in acque superficiali o profonde, essendone noti solo in parte i meccanismi determinanti.(2,3).

Gli studi sul comportamento di *V.cholerae* dovrebbero essere perciò finalizzati a comprendere meglio i meccanismi che consentono l'instaurarsi di siti endemici e il diffondersi di una epidemia, se si vogliono adottare i provvedimenti più adeguati per il controllo e una prevenzione efficaci.

La prima evidenza di trasmissione del colera attraverso vegetali irrigati con acque reflue si è avuta con l'epidemia che colpì Gerusalemme dall'agosto al settembre del 1970: vibrioni e batteriofagi furono isolati sia sul suolo irrigato con le acque reflue, sia nell'insalata raccolta e in quella venduta ai mercati (4). L'epidemia comportò 250 casi di colera confermato clinicamente e fu possibile dimostrare che il vibrione colerico, in idonee condizioni di umidità, sopravviveva per 10–20 giorni sul suolo e 2–5 giorni sui vegetali, i quali potevano rappresentare le derrate alimentari fertirrigate, fonte di contagio. La sospensione della vendita e la distruzione delle derrate alimentari presumibilmente contaminate implicarono, dopo 12 giorni, l'interruzione del propagarsi dell'infezione e nessun caso clinico fu ulteriormente segnalato (4).

### **Sopravvivenza di *Vibrio cholerae* nell'ambiente**

Il mantenimento della colonizzazione di acque superficiali e profonde da parte di *V.cholerae* può essere spiegato con l'esistenza di "reservoir" ambientali che consentano al germe di adattarsi alle mutate condizioni, rispetto a quelle prodotte nell'intestino dei soggetti ammalati. Tale ipotesi è suffragata dalle numerose osservazioni segnalate in ogni parte del globo, sulla identificazione di foci endemici non solo nelle regioni classiche (Bangladesh), (5) ma anche negli USA, in Australia, in Europa e in Giappone (6–9).

I ceppi di *V.cholerae* isolati nell'ambiente non appartengono, in genere, ai sierogruppi O1/O139, produttori di tossina, ma alla più numerosa "famiglia" dei "non O1" – definiti anche come "NAG" (non agglutinanti) o "NCV" (vibrioni non del colera); i vibrioni non O1 ambientali sono nettamente più resistenti agli antibiotici, ai detergenti e alla lisi con proteine denaturanti rispetto agli isolati clinici di *V. cholerae* O1; la differenza fondamentale sembrerebbe addebitabile alla mancanza, nei non O1, di fosfolipidi esposti all'esterno sulla

membrana cellulare, assenza che conferirebbe maggiore resistenza alle fluttuazioni fisico-chimiche che si realizzano nell'ambiente esterno (10).

La capacità di sopravvivenza della specie *Vibrio cholerae* è affidata ad una serie di peculiarità espresse in maniera differente dai vari ceppi: 1) adattamento alle variazioni fisico-chimiche del mezzo acquoso; 2) adesività; 3) biocenosi; 4) miniaturizzazione; 5) dormienza; 6) tossicoconversione.

## Adattamento alle variazioni fisico-chimiche del mezzo acquoso

È l'aspetto più mutevole tra i vari ceppi. *V. cholerae* non O1 può sopravvivere per molti mesi a bassa salinità (anche in presenza di concentrazioni saline dello 0,1%), dando luogo a conte numeriche maggiori quando siano alti i livelli di temperatura (>17 °C) e nutrienti (3, 11). La presenza di ferro in forma di ossido ferrico (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) raddoppia la sopravvivenza di *Vibrio cholerae* in acque dolci poco inquinate (12) ma la sospensione di *V. cholerae* in acqua dolce o salata comporta sempre e comunque un decremento delle cellule enumerabili su piastra; la vitalità è conservata meglio in ambiente salino rispetto a quello di un'acqua dolce perché, per la crescita e, verosimilmente, per la sopravvivenza, è necessaria una presenza adeguata di ioni Na<sup>+</sup>. Ciò implica che *V. cholerae* non O1 (ma anche *V. cholerae* O1) riescano a sopravvivere meglio in ambienti salmastri o marini rispetto a quelli dolciacquicoli, aumentando in tal modo il proprio serbatoio di circolazione ambientale e la facilità, conseguente, di infezione.

### Adesività

*V. cholerae*, come altre *Vibrionaceae*, ha sviluppato specifiche interazioni ecologiche attraverso l'adesione a sistemi viventi, ad esempio, alle radici del giacinto d'acqua *Eichhornia crassipes*, diffuso in aree tropicali, oppure alle sostanze mucillaginose prodotte da microfite (13). Attraverso la produzione di una chitinasi extracellulare viene assicurata l'adesione al carapace e alle esuvie di artropodi zooplanctonici e bentonici; la maggiore presenza di *V. cholerae* si registra intorno all'apparato boccale e alle appendici dei crostacei marini che vengono impiegate per alimentarsi (14-16). La capacità adesiva a forme planctoniche, come i copepodi, allunga sicuramente la sopravvivenza di *V. cholerae* in natura (15).

### Biocenosi

Condizioni di eutrofizzazione dell'ambiente marino costiero che determinino la presenza di bloom algali di cianofitiche favoriscono la sopravvivenza di *V. cholerae* che, usando tecniche di rilevamento diretto in condizioni di laboratorio, riesce a protrarre tale sopravvivenza per oltre 15 mesi, in associazione con cianobatteri (17). La capacità adesivante, che consente a *V. cholerae* di attaccarsi alla superficie di zooplancton, fitoplancton, alghe unicellulari e macrofite, procrastina la sopravvivenza e offre ai vibriani sostanze nutrienti prodotte ed escrete o sottratte all'ospite.

## Miniaturizzazione

In condizioni di carenza di nutrienti, elevata salinità e/o ridotte temperature, *V. cholerae* va incontro ad una trasformazione morfologica rilevante, consistente nella riduzione delle dimensioni e nell'assunzione di una forma di tipo coccoide; la respirazione endogena diminuisce in maniera significativa così come la quantità di DNA cellulare. I vibriani vengono definiti, in questa forma, "starved" e si possono trovare in sospensione o associati ad organismi biologici o ai sedimenti, rimanendo ancora coltivabili. In presenza della opportuna concentrazione di nutrienti (un brodo basso a base di peptone o estratto di lievito), infatti, le forme coccoidi recuperano la normale morfologia a "virgola" entro 2 ore dall'inseminamento; il processo prende inizio già dopo 10 minuti ma solo dopo 4-5 ore le cellule iniziano un nuovo ciclo divisionale (18). In questa fase di "starvation" i batteri vanno incontro ad un numero di mutazioni spontanee maggiori, probabilmente per effetto della sottoregolazione dei sistemi di riparazione del DNA come parte del meccanismo di conservazione dell'energia, piuttosto che come incremento della percentuale di mutazione (19).

## Dormienza

Il processo di miniaturizzazione può ulteriormente progredire dando luogo a forme in stato di dormienza, dette VBNC (*Viable But Not Cultivable*) le quali, in antitesi alle forme "starved", non sono più in grado di replicarsi su terreni colturali pur rimanendo capaci di assimilare substrati radioattivi. La capacità in stato di "stress", di assumere lo stato VBNC, non si limita a *V. cholerae*, ma è una prerogativa condivisa da molti batteri Gram negativi di interesse igienico, come *Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella enteritidis*, *Aeromonas salmonicida*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter (Campylobacter) jejuni* e *Helicobacter pylori*. L'esistenza nello stato VBNC riveste per *V. cholerae* un'importanza critica nel monitoraggio dell'ambiente acquatico alla ricerca di questo patogeno (20). Le forme "starved" e VBNC possono costituire una chiave valida per comprendere la patogenicità e la ecologia di *V. cholerae* e il ruolo centrale rivestito dall'ambiente nello sviluppo di epidemie: da pazienti infetti avviene il rilascio nell'ambiente di ceppi colerigeni che, a lungo andare, producono forme "starved" che vanno incontro a molteplici spontanee mutazioni; in conseguenza di queste mutazioni hanno origine ceppi atossici che si perpetuano nell'ambiente passando da fasi perfettamente vitali a fasi VBNC che, a loro volta, andranno incontro a una alta incidenza di mutazioni; in questo coacervo di mutazioni/selezioni si produrranno anche ceppi ipertossigeni che saranno in grado di reiniziare il processo, provocando il colera se ingeriti da un idoneo soggetto ricettore.

## Tossicoconversione

La produzione di tossina e altri fattori di virulenza di *V. cholerae* O1, è controllata da una sequenza di geni ed è opportunamente regolata da "controllori" ambientali. La temperatura ha un ruolo soppressivo: a 35 °C determina una attenuazione nella produzione di tossina mentre a 25 °C ne stimola la produzione. Questa osservazione fornirebbe supporto alla tesi che la tossina possa svolgere un ruolo favorente le associazioni ambientali. L'interruttore alla risposta di "stress" a 37 °C può essere interpretato come un meccanismo adattativo in conseguenza al cambiamento tra differenti ambienti: l'ecosistema acquatico e l'intestino umano. Dal punto di vista genetico *V. cholerae* è strettamente correlato alle altre specie di vibriani ambientali presenti e comuni negli ecosistemi acquatici (21). Gli organismi che causano il colera

appartengono a ceppi tossigeni di *V. cholerae* O1 (biotipi Classico o El Tor) e O139, nell'ambito dei quali, durante un'epidemia, si possono distinguere vari stipti: tossigeni, ipertossigeni o atossigeni (22). I ceppi ipertossici, che possono avere molte copie del gene *tox*, saranno quelli favoriti ad insediarsi nell'intestino. I ceppi di origine clinica isolati da soggetti ammalati potrebbero, come tali, avere uno svantaggio selettivo nell'ambiente (23), per esempio, per la loro incapacità ad adattarsi ai possibili stati metabolici e questo può spiegare perché non sono facili da isolare dall'ambiente. I ceppi non tossici possono essere privi o parzialmente difettivi dei geni funzionali per la produzione della tossina *tox* (24). Tali ceppi, assai diffusi nell'ambiente, in alcuni casi possono andare incontro ad una tossicoconversione, così dimostrando che i vari stipti fanno parte di un unico grande e mutevole insieme.

## ***Vibrio cholerae* in acque superficiali contaminate da liquami**

*V. cholerae*, in uno studio del gruppo di Colwell (25), ricercato per un ciclo annuale in una rete idrica che comprendeva acque piovane, lacuali e canali di scolo fognario, è stato ritrovato nelle acque di lago con 2 picchi stagionali legati al ciclo delle piogge (in agosto-settembre e maggio-giugno); al di fuori di questi due periodi era identificabile con elevata incidenza nei sedimenti, a dimostrazione della possibile esistenza di cicli di passaggio del germe tra acqua e sedimenti; nell'acqua i fattori più importanti per il ritrovamento di *V. cholerae* sembravano essere temperatura e pH; alte conte erano individuabili in luoghi molto inquinati anche nei periodi invernali, così come in acque salmastre e dolci destinate all'allevamento di crostacei da esportazione, proprio per la tendenziale alcalinità dell'acqua; da ultimo, mentre *V. cholerae* non O1 era comune in tutti gli ambienti di acqua dolce in Calcutta, la sierovarietà O1 non era isolabile in tutti i campioni esaminati in questo studio.

Varie ricerche hanno mostrato come sia possibile in ambienti marini ritrovare nell'acqua, nei sedimenti e nei molluschi il germe anche in assenza di coliformi (25,26). Infatti, *V. cholerae* nell'ambiente si comporta in modo antitetico a *E. coli*, mostrando alte concentrazioni durante il periodo caldo e bassi titoli durante quello freddo. Uno studio sperimentale sugli effetti di pH, temperatura e luce solare sulla sopravvivenza di *V. cholerae* e di coliformi fecali conferma il comportamento opposto di questi due specie batteriche: pH alcalini stimolano la crescita di *V. cholerae* mentre promuovono il decadimento di *E. coli*; *V. cholerae* è anche meno sensibile nei confronti della luce solare di quanto lo sia invece *E. coli*, mentre l'effetto della temperatura è dipendente dalla contestuale disponibilità di nutrienti. Il comportamento diverso può incidere anche sulla efficienza di abbattimento di *V. cholerae* negli impianti di depurazione, dove l'uso dei coliformi fecali, come indicatori del pericolo potenziale per la salute, potrebbe non essere del tutto adeguato (27). Trattamenti che, come il lagunaggio, sono idonei per rimuovere/eliminare i germi enterici nei liquami, non lo sono altrettanto nei confronti dei vibroni colerici (28, 29). Proprio quest'ultimo studio ha dimostrato la scarsa efficienza di abbattimento degli impianti di depurazione biologici nei confronti di *V. cholerae non O1*.

Come può evincersi dall'osservazione della Tabella 1, a 9 isolamenti su 17 campioni di liquami in ingresso, hanno corrisposto 7 isolamenti sui reflui in uscita; i corpi idrici ricettori, campionati entro i 500 m dal punto di immissione dello scarico, mostravano un andamento del tutto consensuale, con 7 isolamenti ottenuti su acqua superficiale contestualmente ai 7 isolati ottenuti sulle acque di scarico in uscita.

**Tabella 1. Isolamenti di *V. cholerae* non O1 su campioni di liquami in ingresso e in uscita dai depuratori comunali delle città costiere della Provincia di Latina, e su campioni dei rispettivi corpi idrici ricettori**

Località	Rete fognaria	Depuratore		Corpo idrico ricettore
		ingresso	uscita	
Latina	/	2/3	2/3	2/3
Sabaudia	/	0/2	0/2	0/2
San Felice Circeo	/	1/2	0/2	0/2
Terracina	/	3/3	3/3	3/3
Sperlonga	/	1/2	1/2	1/1
Gaeta*	1/1	/	/	/
Formia	/	2/2	1/2	1/2
Minturno/Sc*	1/1	/	/	/

\*non dotate di impianti di depurazione.

Isolamenti di *V. cholerae* su acque superficiali, si è già detto, sono stati riportati praticamente in ogni parte del globo. In Italia sono numerose le segnalazioni di tale presenza, anche in tempi recenti (26, 27, 29, 30) a testimonianza di una elevata circolazione di tale germe negli ambienti idrici di acque dolci e nelle marine costiere di pertinenza. Tale circolazione appare sottovalutata rispetto ai rischi di contaminazione in agricoltura o nella fruizione ricreazionale delle coste del nostro paese. La scarsa attenzione verso il rischio di infezioni da *Vibrionacee* non può trovare nemmeno giustificazione nell'esiguo numero di isolamenti clinici, da mettere piuttosto in relazione alla poco diffusa ricerca di tali germi nella rete dei laboratori italiani di primo livello, pubblici o privati.

## Bibliografia

1. Zinsser H. *Rats, lice and history*. USA: Bantam Science and mathematics; 1967.
2. Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(11):5488-97.
3. Louis VR, Russek-Cohen E, Choopun N, Rivera IN, Gangle B, Jiang SC, Rubin A, Patz JA, Huq A, Colwell RR. Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(5):2773-85.
4. Mara D, Cairncross S. Guidelines for safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture. Geneva: World Health Organization; 1989.
5. Brayton PR, Tamplin ML, Huq A, Colwell RR. Enumeration of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh waters by fluorescent-antibody direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol* 1987;53:2862-5.
6. Roberts NC, Bradford HB, Barbay JR. Ecology of *Vibrio cholerae* in Louisiana coastal waters. In: Colwell RR (Ed). *Vibrio in the environment*. New York: John Wiley & Sons; 1984. p. 389-98.
7. West PA, Lee JV. Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae* in natural waters in Kent, England. *J Appl Bacteriol* 1982;52(3):435-48.
8. Juras H, Futh U, Winkler D, Friedemann J, Hillig T. Occurrence of NAG *Vibrio* in Berlin waters. *Z Allg Mikrobiol* 1979;19(6):403-9.
9. Uchiyama H, Todoroki T. Water quality and isolation of *Vibrio cholerae* non-O1 from an aquatic environment. *Kansenshogaku Zasshi* 1989;63(12):1313-21.

10. Chaudhuri MAR, Bhadra RK, Das J. Cell surface characteristics of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae* non O1. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:3567-73.
11. Khan MU, Shahidullah M, Haque MS, Ahmed WU Presence of vibrio in surface water and their relation with cholera in a community. *Trop Geograph Med* 1984;36:335-40.
12. Joseph S, Bhat KG. Effect of iron on the survival of *Vibrio cholerae* in water. *Indian J Med Res* 2000;111:115-7.
13. Tamplin ML, Gauzens AL, Huq A., Sack DA., Colwell RR. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ Microbiol* 1990;56:1977-80.
14. Hood MA., Ness GE. Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl Environ Microbiol* 1982;43:578-84.
15. Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R, Colwell RR. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:275-83.
16. Huq A, West PA, Small EB, Huq MI, Colwell RR. Influence of water temperature, salinity and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 with live copepods in laboratory microcosms. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:420-4.
17. Epstein PR. Algal blooms in the spread and persistence of cholera. *BioSystems* 1993;31:209-21.
18. Colwell RR, Huq A. Vibrios in the environment: viable but non cultivable *Vibrio cholerae*. In: Kaye I, Blake PA, Olsvik O (Ed.). *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. Washington D.C. American Society for Microbiology; 1994. p. 117-33.
19. Siegel DA, Kolter R. Life after log. *J Bacteriol* 1992;174:345-8.
20. Ravel J, Knight IT, Monahan CE, Hill RT, Colwell RR. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but non cultivable state: growth or resuscitation. *Microbiol* 1995;141:377-83.
21. Andersen SR, Sandaa RA. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(3): 908-12.
22. Koblavi S, Grimont F, Grimont PAD Long-term persistence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the mucilaginous sheath of a blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J Trop Med Hyg* 1990;93:133-9.
23. Drasar BS. Pathogenesis and ecology: the case of cholera. *J Trop Med Hyg* 1992;95:365-72.
24. Colwell RR, Tamplin ML, Brayton PR, Tavzans AL, Tall BD, Herrington D, Levine MM, Hall S, Huq A, Sack DA. Environmental aspects of *Vibrio cholerae* in transmission of cholera. In: Sack RB, Zinnaki R (Ed.). *Adv. Research on Cholera and Related Areas*. 7th edition. Tokyo: KTK Scientific Publishers; 1990. p. 327-43.
25. Kaper J, Lockman H, Colwell RR, Joseph SW Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:91-103.
26. Corona R, Caldarini J, Le Foche M, Pagliarella P, Ravizza P, Volterra L, Zaottini E. *Vibrionaceae* presenti in giacimenti naturali di molluschi eduli lamellibranchi e nelle relative acque di mare della costa laziale meridionale. In: *Atti del 39° Congresso Nazionale "La Promozione della Salute nel Terzo Millennio"*. Comunicazioni orali. Ferrara, 24-27 settembre 2000. p. 351.
27. Dumontet S, Krovacek K, Svenson SB, Pasquale V, Baloda SB, Figliuolo G. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. In coastal water of Southern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000;23(1):53-72.
28. Mezrioui N, Oufdou K, Baleux B. Dynamics of non-O1 *Vibrio cholerae* and fecal coliforms in experimental stabilization ponds in the arid region of Marrakesh, Morocco, and the effect of pH, temperature, and sunlight on their experimental survival. *Can J Microbiol* 1995;41:489-98.

29. Corona R, Pagliarella P, Volterra L, Zaottini E. Isolamento di *V. cholerae* nelle acque di scarico e superficiali dei comuni costieri della provincia di Latina. In: *Atti del 39° Congresso Nazionale "La Promozione della Salute nel Terzo Millennio". Comunicazioni orali*. Ferrara, 24-27 settembre 2000. p.350.
30. Barbieri E, Falzano L, Fiorentini C, Pianetti, Baffone W, Fabbri A, Matarrese P, Casiere A, Katouli M, Kuhn I, Mollby R, Bruscolini F, Donelli G. Occurrence, diversity and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(6):2748-53.

# FATTORI DI PRESSIONE PER LA SALUTE CONNESSI CON LA BALNEAZIONE

Laura Mancini, Marcello Iaconelli, Giovanni Alfredo Zapponi, Francesca Anna Aulicino,  
Annamaria D'Angelo  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

La scarsa qualità delle acque di balneazione è in genere legata all'immissione di reflui di varia natura spesso privi di trattamenti preventivi; le acque di balneazione possono pertanto essere veicolo di effetti epidemici di natura infettiva. Le acque di balneazione possono contenere un ampio spettro di microrganismi di differente patogenicità che possono essere trasmessi più o meno facilmente in numerosi distretti corporei.

La correlazione tra balneazione e rischio sanitario è stata affrontata da numerosi autori. Dalla iniziale convinzione che nessun rischio fosse collegabile alle acque di balneazione se non per quelle fortemente contaminate da elevate concentrazioni batteriche di origine fluviale (1), si è fatta largo l'opinione che il rischio fosse invece reale, seppure limitato a patologie di tipo oro-fecale, e che fosse in qualche modo collegato al grado di fecalizzazione delle acque (2-4). Gli studi epidemiologici finora effettuati riportano una serie di patologie (sindromi gastrointestinali, infezioni oculari, disturbi della pelle, infezioni delle vie respiratorie, ecc.).

## Scenari di esposizione

L'esposizione a fattori di rischio presenti nell'acqua di balneazione può avvenire sia per ingestione, che per assorbimento dermico oppure per inalazione. Stime di massima dei livelli di esposizione indicherebbero che l'assunzione di acqua durante la balneazione possa essere compresa tra 50 e 100 mL; i valori più elevati vengono generalmente raggiunti nel caso di bambini. L'inalazione di acqua può arrivare sino all'ordine di grandezza di decimi di grammo per ora assumendo una concentrazione idrica nell'aria a contatto con l'acqua dell'ordine dei decimi di grammo per metro cubo e un tasso di inalazione di 1 m<sup>3</sup> di aria per ora. La quantità di acqua che può essere adsorbita per via cutanea può essere stimata in quantità pari a 1 g/ora nel caso di un bambino di circa 10 kg di peso (superficie corporea di circa 0,6 m<sup>2</sup>) e di circa 3 g/ora nel caso di un adulto di 70 kg (circa 1,8 m<sup>2</sup> di superficie corporea (3)).

## Recenti studi epidemiologici sulla balneazione come indici di valutazione di valori soglia

Gli studi epidemiologici più recenti includono le seguenti tipologie di esposizione all'acqua marina:

- immersione completa;
- nuoto;
- nuoto subacqueo;

- ingestione di acqua;
- contatto limitato con acqua o contatto indiretto, come ad esempio, attività su natanti e presenza sugli arenili.

Tali modalità di esposizione sono spesso legate ad incrementi statisticamente significativi di differenti patologie (sintomi gastrointestinali, infezioni oculari, malattie respiratorie, infezioni delle alte vie respiratorie e disturbi della pelle) correlate alla presenza di quantità elevate di indicatori di fecalizzazione come coliformi totali e fecali, *Escherichia coli*, enterococchi (5, 6). I dati relativi ad alcuni studi svolti sulle acque di balneazione marine e interne recentemente presentati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità sono illustrati nelle Tabelle 1 e 2.

**Tabella 1. Indagini epidemiologiche effettuate su acque ricreazionali interne di alcuni paesi (6)**

Autore e luogo	Esposizione	Indicatori di fecalizzazione rilevati	Sintomi
Seyfried, 1985 Canada (7)	-	SF, CF, stafilococchi	Affezioni respiratorie, sintomi gastrointestinali
Lightfoot, 1989 Canada (8)	contatto fisico	-	Affezioni respiratorie, sintomi gastrointestinali
Ferley 1989 Francia (9)	-	SF, CT, CF	Dermatiti, sintomi gastrointestinali
		<i>Aeromonas</i> spp.	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Fewtrell, 1992 UK (10)	-	CT, CF, SF Stafilococchi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Affezioni oculari, dermatiti, affezioni delle vie respiratorie superiori, affezioni respiratorie
Van Asperen, 1997 Paesi Bassi (11)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Affezioni delle vie respiratorie superiori

CF = Coliformi Fecali; CT = Coliformi Totali; SF = Streptococchi Fecali

Quanto riportato nelle Tabelle 1 e 2 evidenzia come diverse affezioni siano correlabili all'esposizione ad acque ricreazionali; infatti alcuni studi in esse riportati evidenziano correlazioni significative tra contaminazione e patologie.

Ulteriori studi condotti negli USA nel corso del biennio 1993-94 hanno evidenziato 14 epidemie di gastroenterite con 1437 casi di infezione più o meno acuta direttamente riconducibili all'uso di acque ricreazionali interne. In dieci di esse sono risultati implicati, come agenti etiologici, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium*. *Shigella sonnei* e *S. flexneri* spp. sono risultate causa di tre eventi epidemici, mentre in un caso è stato evidenziato il coinvolgimento di *E. coli* 0157:H7 (12).

Correlazioni significative sono state osservate tra l'insorgenza di patologie gastrointestinali e presenza di indicatori di contaminazione fecale. Per quanto riguarda le acque marine è da considerare come riferimento il valore del rapporto tra enterococchi/streptococchi fecali, mentre per le acque interne è da valutare la presenza e concentrazione di *Escherichia coli*.

Le soglie di infettività variano a seconda dei livelli di resistenza delle popolazioni esposte e, in relazione al numero di indicatori di contaminazione, è stato evidenziato come queste soglie siano correlate a 20 batteri/100 mL di acqua per popolazioni meno resistenti e a 40 batteri/100mL nel caso di popolazioni più resistenti alle infezioni. In particolare, quantità di streptococchi fecali pari a 33/100 mL sono indicate come valore correlato all'incremento del rischio di sintomi gastroenterici. L'analisi della relazione dose-risposta sembrerebbe quindi indicare un incremento del rischio di insorgenza dei sintomi a partire da concentrazioni molto basse degli indicatori di contaminazione fecale (13).

Tabella 2. Indagini epidemiologiche sulle acque marine di balneazione di alcuni paesi

Autore e luogo	Popolazione studiata	Esposizione	Indicatore	Sintomi	Note
Mujerigo, 1982 SPAGNA (17)	20.918 individui	Nuoto in immersione, nuoto superficiale	Coliformi fecali, coliformi totali, streptococchi fecali/enterococchi	Dermatiti, infezioni oculari, infezioni delle vie respiratorie superiori, sintomi gastrointestinali, allergie	-
Cabelli, 1982 USA (2)	28.510 individui	Immersione della testa almeno 3 volte	numerosi, in particolare enterococchi	Sintomi gastrointestinali, HCGI, patologie respiratorie, infezioni delle vie respiratorie superiori, altro	Associazione significativa fra gastroenterite ed enterococchi
Cabelli, 1983 EGITTO (3)	23.239 individui (di cui 11.755 bagnanti, 11.484 non bagnanti)	Non identificata	Enterococchi, <i>E. coli</i>	Gastroenteriti, HCGI, malattie respiratorie, infezioni delle vie respiratorie superiori, altro	Associazione significativa fra gastroenterite ed enterococchi; maggiore; incidenza dei sintomi nei bambini
Fattal, 1987 ISRAELE (18)	2.231 individui	Immersione della testa, ingestione di acqua	enterococchi, <i>E. coli</i> , coliformi totali	Sintomi gastrointestinali, dermatiti, patologie respiratorie, otiti	Incidenza dei sintomi nei bambini
Fattal 1991 SPAGNA (19)	1.447 individui	Immersione della testa	<i>E. Coli</i> , <i>streptococchi fecali</i> , <i>coliformi fecali</i> , <i>colifagi</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Dermatiti, infezioni oculari, infezioni delle vie respiratorie superiori, otiti, infezioni vaginali	Incidenza dei sintomi e dermatiti più alta nelle spiagge con elevati livelli di streptococchi fecali
Cheung, 1991 HONG KONG (20)	18.741 individui	Immersione	Numerosi; in particolare <i>E. coli</i>	Sintomi gastrointestinali, HCGI, disturbi della pelle, infezioni oculari, patologie respiratorie, otiti	-
Corbett, 1990 AUSTRALIA (21)	2.839 individui	Nuoto in immersione	Coliformi fecali, streptococchi fecali	sintomi gastrointestinali, patologie respiratorie, infezioni delle vie respiratorie superiori	-
Kay, 1994 REGNO UNITO (22)	701 esposti; 605 non esposti	Dopo almeno 3 immersioni	Coliformi fecali, streptococchi fecali, <i>P. aeruginosa</i>	Sintomi gastrointestinali	-
Pike, 1994 REGNO UNITO (23)	21.294 individui	Nessun contatto con l'acqua; piedi in acqua; canoisti, nuotatori, ecc	Coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali	Infezioni delle vie respiratorie superiori, disturbi della pelle, patologie respiratorie, sintomi gastrointestinali	-

Studi condotti nell'area mediterranea e relativi alla valutazione del rischio di insorgenza di patologie gastrointestinali in individui che frequentano acque ricreative marine contaminate hanno evidenziato come 2,5-4 individui su 100 corrono il rischio di contrarre affezioni (14). Studi effettuati da enti europei preposti al controllo forniscono stime ancor più pessimistiche valutando in circa il 40% il numero di possibili casi di affezioni di varia natura conseguenti ad attività balneari sempre nell'area mediterranea (15).

La tipologia di rischio va definita in relazione alla particolare posizione climatica e di sviluppo socio-economico di ciascun paese. Valori guida sono stati definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (1998) e vanno interpretati in relazione alla riduzione dei rischi sanitari associati all'utilizzo di acque di balneazione. I valori guida sono riportati in Tabella 3.

**Tabella 3. Valori guida per la qualità microbiologica delle acque marine di balneazione di zone temperate (5)**

Valore guida*	Basi di derivazione	Esposizione (10 minuti per bagno)
10	La maggior parte di studi epidemiologici conferma che entro questo valore non sono rilevabili effetti avversi per la salute (NOAEL)	Per una famiglia di 4 adulti per un totale di 400 esposizioni (80 esposizioni stagionali per 5 anni)
50	La maggior parte di studi epidemiologici conferma che entro questo valore si rileva il livello più basso di effetti avversi osservati per la salute, in relazione a gastroenteriti (LOAEL)	Per una famiglia di 4 bagnanti adulti sani con 80 esposizioni per Stagione balneare
200	La maggior parte di studi epidemiologici conferma che entro questo valore si rileva il livello più basso di effetti avversi osservati in relazione ad effetti avversi sulla salute	Per un adulto in buona salute con 20 esposizioni per stagione balneare
1000	Sono usati come indicatori in relazione a gravi effetti sulla salute. Questo valore guida deriva da studi comprovanti la trasmissione di febbri tifoidee e paratifoidee in aree a bassa endemicità per queste affezioni.	Questa situazione è da considerare ad elevato rischio per la salute e dovrebbe essere verificata la presenza di contaminazione fecale di origine antropica.

\*(Streptococchi fecali:n/100 mL-95 percentile)

NOAEL= No Observed Adverse Effect Level; LOAEL= Lowest Observed Adverse Effect Level

Un'analoga valutazione andrebbe effettuata anche per le acque fluviali dove l'input dei microrganismi è tuttavia difficilmente calcolabile a causa delle capacità di accumulo dei sedimenti; questi possono rilasciare numerose specie potenzialmente patogene che si sono sviluppate al loro interno nel tempo soprattutto in occasione di particolari eventi naturali come ad esempio piene improvvise.

In Italia la legislazione prevede che i dati relativi al monitoraggio delle acque di balneazione vengono raccolti dal Ministero della Sanità e pubblicati l'anno successivo anche attraverso una cartografia che riporta con simboli e colori lo stato di qualità delle acque di balneazione rispetto al DPR 470/1982 (16).

La valutazione dell'esposizione alle acque contaminate risulta spesso problematica sia a causa della frequente infrazione dei divieti di balneazione, sia perché le analisi chimiche, fisiche

e batteriologiche, effettuate nell'anno precedente, non sono sempre significative rispetto alla situazione attuale. Per prevenire possibili patologie è importante un approccio preventivo che includa sia gli studi pianificati con protocolli internazionali che gli standard specifici per ogni paese (come ad esempio i fattori sociali ed economici) per tutelare la salute della popolazione rispetto all'uso delle acque di balneazione.

## Bibliografia

1. Public Health Laboratory Service. Sewage contamination of coastal bathing waters in England and Wales: a bacteriological and epidemiological study. *Journal of Hygiene* 1959;57(4): 435-72.
2. Cabelli VJ. Health effects criteria for marine recreational waters. Research Triangle Park, 1983; EPA-600/1-80-031.
3. Cabelli VJ, Dufour AP, McCabe LJ, Levin MA. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. *American Journal of Epidemiology* 1982;115(4):606-16.
4. Dufour AP. Health effects criteria for fresh recreational water. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268. EPA 600/1-84-004.
5. WHO. Guidelines for safe recreational-water environments: coastal and fresh-water. EOS/DRAFT/98 1998;14; p. 1-267.
6. Pruss A,. Review of epidemiological studies from exposure to recreational water. *International Journal of Epidemiology* 1998;27:1-9.
7. Seyfried PL, Tobin RS, Brown NE, Ness PF,. A prospective study of swimming related illness. I. Swimming associated health risk. *Am. J. Public Health*. 1985;75(9): 1068-70.
8. Lightfoot NE. A prospective study of swimming related illness st six freshwater beaches in Southern Ontario. Unpublished PhD Thesis. University of Toronto, Canada. 1989; pp 275.
9. Ferley JP, Zmirou D, Balducci F. Epidemiological significance of microbiological pollution criteria for river recreational waters. *International Journal of Epidemiology*. 1989, 18(1): 198-205.
10. Fewtrell L, Godfree AF, Jones F, Kay D, Salmon RL, Wyer MD. Health effects of white-water canoeing. *Lancet* 1992;339(8922):1587-89.
11. Van Asperen IA, Medema GJ, Havelaar AH, Borgdorff MW 1997. Health effects of freshwater bathing among primary school children. Report n. 289202017, RIVM, BilthovenKramer MH, Herwaldt BL, Craun GF, Calderon RL, Juranek DD. Waterborne disease: 1993 and 1994. *J. AWWA* 1996;66-79
12. Kramer MH, Herwaldt BL, Craun GF, Calderon RL, Juranek DD. 1996. Waterborne disease: 1993 and 1994. 2nd ed. Problem organism in water: identification and treatment. Denver, Colorado: American Water Association; 1996 p. 66-79.
13. WHO. Health risk assessment for coastal and freshwaters. Chapter 3, Microbiological hazards and risks. *Confidential working draft*. April 11 1997.
14. WHO. Ambiente e salute in Italia. Roma: OMS; 1998 pp 585
15. Saliba LJ, Helmer R. Health risk associated with pollution of coastal bathing waters. *World Health Statistics Quaterly* 1990;43:177-85
16. Italia. Decreto legislativo 8 giugno 1982, n. 419. Attuazione della direttiva (CEE) n. 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 203, 26 luglio 1982.
17. Mujeriego R, Bravo JM, Feliu MT. Recreational in coastal waters, public health implication. Vièmes Journées Etud. Pollutions, Cannes, CIESM;1982. p. 585-94.

18. Fattal B, Peleg-Olevsky Agursky T, Shuval HI. The association between sea water pollution as measured by bacterial indicators and morbidity of bathers at Mediterranean beaches in Israel. *Chemosphere* 1987;16: 565-70.
19. Fattal B, Peleg-Olevsky E, Cabelli VJ. Bathers as a possible sources of contamination for swimming associated illness at marine bathing beaches. *Int. J. Env. Health Research* 1991;1: 204-14.
20. Cheung WHS, Chang KCK, Hung RPS. Variations in microbial indicator densities in beach water and health-related assessment of bathing water quality. *Epidemiol. Infect.* 1991;106:329-44.
21. Corbett SJ, Rubin GL, Curry GK, Kleinbaum DG. The health effects of swimming at Sidney beaches. The Sydney Beach Users Advisory Group. *Am. J. Public Health.* 1993;83(12);1701-9.
22. Kay D, Fleisher JM, Salmon RL, Wyer MD, Godfre AF, Zelenauch-Jaquotte Z, Shore R. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing; results from randomized exposure. *Lancet* 1994;344(8927):905-9.
23. Pike EB, 1994. Health effects of sea bathing (WMI 0921)- Phase III: Final report to the Department of the Environment. Report n. DoE 3412/2, pub. Water Research Centre plc, Medmenham, UK: 1-38.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc  
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

*Roma, settembre 2004 (n. 3) 2° Suppl.*