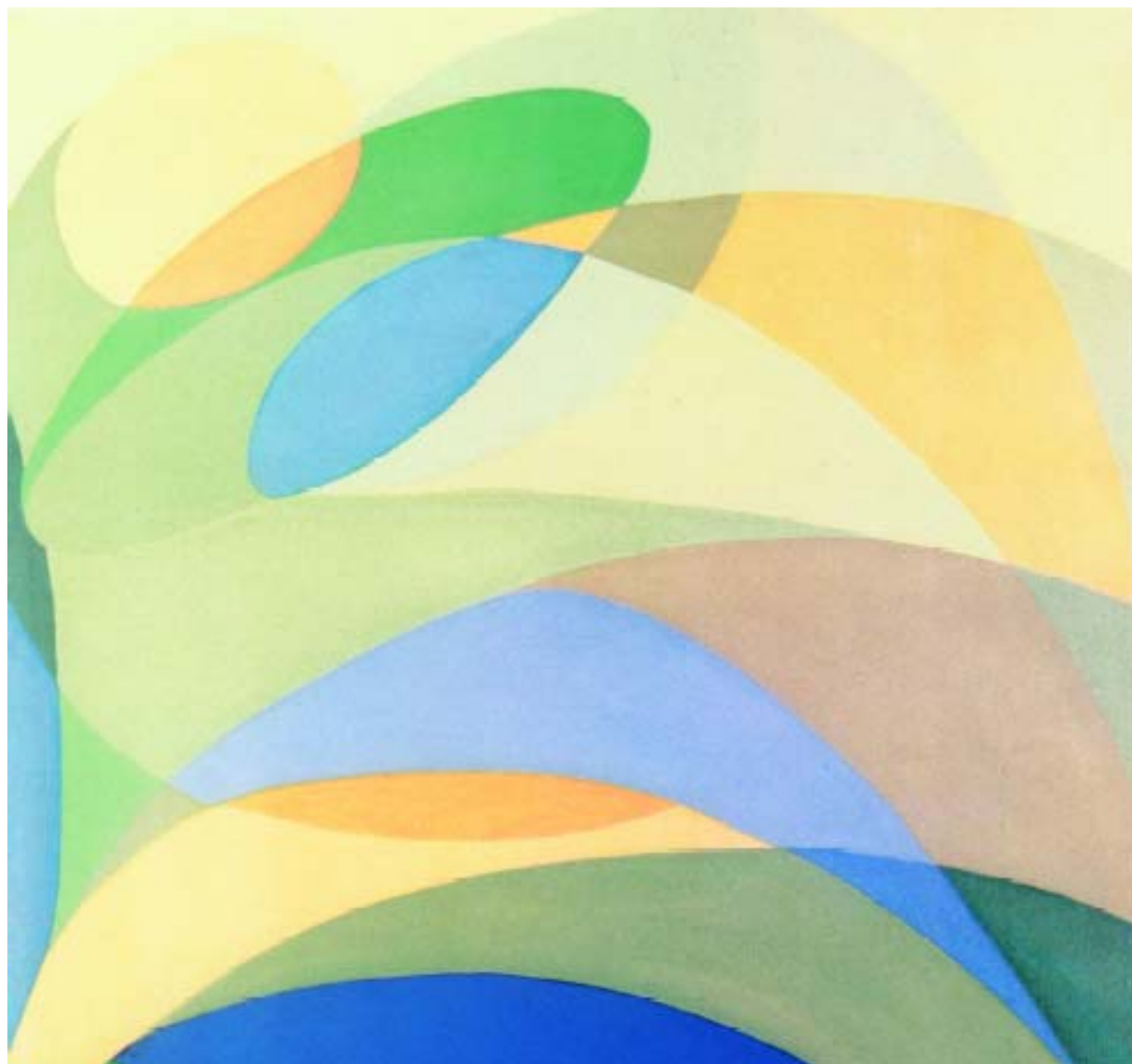


**REGIONE
TOSCANA**



ARPAT



STUDIO “ BALNEAZIONE 2004”

Relazione finale

STUDIO “BALNEAZIONE 2004”

sulla proposta di direttiva europea per le acque di balneazione

1 INTRODUZIONE

Il 24 ottobre 2002 la Commissione Acque di Balneazione delle Comunità Europee ha presentato la proposta di “Direttiva del Parlamento e del Consiglio relativa alla qualità delle acque di balneazione” (COM(2002) 581 definitivo). In questo documento, recependo i suggerimenti dell’OMS, vengono introdotti 2 nuovi parametri microbiologici, Enterococchi intestinali (EI) ed *Escherichia coli* (EC), perché questi parametri «rappresentano la migliore corrispondenza disponibile tra inquinamento di origine fecale e ripercussioni per la salute nelle acque destinate a scopi ricreativi».

Attualmente, la normativa italiana (DPR470/82 e modifiche successive) ed europea (76/160/CEE), prevedono che l’idoneità alla balneazione venga attribuita in base al rispetto dei limiti di 11 parametri, di cui 4 microbiologici (Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali e Salmonelle). Tutti questi parametri hanno uguale importanza per la determinazione della conformità, ma, in pratica, influiscono in maniera sensibilmente diversa: in Italia circa il 90% dei casi di non conformità è dovuta ai soli parametri batteriologici.

La nuova direttiva, invece, di fatto, dovrebbe sostituire tutti quelli utilizzati finora con Enterococchi intestinali ed *Escherichia coli*, gli unici in grado di determinare conformità e classificazione. Con il primo termine (conformità) si intende il rispetto dei limiti “vincolanti” stabiliti dall’OMS per la tutela della salute dei bagnanti (200 ufc/100ml per EI e 500 ufc/100ml per EC) e le acque si dividono in conformi e non conformi. Con la classificazione si attribuisce un giudizio di qualità ambientale in senso lato delle acque di balneazione sia che esse siano non conformi (classe “scarsa”) o conformi (classe “buona”) e si introduce una ulteriore suddivisione tra le conformi, con il rispetto dei limiti di “riferimento” (100 ufc/100ml per EI e 250 ufc/100ml per EC) per una maggior tutela sanitaria (classe “elevata”)¹.

La classificazione non si limita ad una diversa espressione “formale”, ma si concretizza in una serie di adempimenti temporali (frequenza dei prelievi, aggiornamento delle informazioni relative al profilo della spiaggia, ecc.) e gestionali (predisposizione di piani e misure per ridurre/eliminare l’inquinamento, individuazione delle cause e dei fattori di rischio, realizzazione di interventi, informazione dei cittadini, ecc.) che possono essere estremamente “onerosi”, dal punto di vista economico, politico e sociale.

Tutto ciò comporta, di fatto, che la proposta si inserisca a pieno titolo nel quadro delle principali direttive “ambientali” sulle acque (2000/60/CE; 91/271/CEE; 91/676/CEE), prevedendone il coordinamento ed il riferimento esplicito nelle considerazioni iniziali (comma

¹ Nell’ultima versione della proposta, quella approvata dal Consiglio Europeo il 28/06/2004, tali limiti sono stati modificati in senso meno restrittivo: per le acque marine i valori del 95° percentile sono stati portati a 500 e 1000 ufc/100ml per EC e 200 e 400 ufc/100ml per EI, rispettivamente per la classe “elevata” e la “buona”. Inoltre, nella medesima versione è stata introdotta una ulteriore classe (“sufficiente”) con la valutazione del 90° percentile rispetto a 900 ufc/100ml per EC e 360 ufc/100ml per EI

8). Ancor più evidente e sicuramente importante è il richiamo in tal senso nella definizione degli obiettivi (art. 1), dove la direttiva persegue il fine «*di preservare, proteggere e migliorare la qualità dell'ambiente e di proteggere la salute umana*» ed al capoverso successivo dice di integrare «*gli obiettivi e i provvedimenti istituiti dalla direttiva 2000/60/CE*».

In realtà, nella nuova direttiva (Allegato II) vengono elencati anche altri parametri di natura fisico-chimica, alcuni già presenti nelle norme attuali (oli minerali e pH²), altri di nuova introduzione (residui bituminosi, catrame; materiale galleggiante), ma a questi viene, stavolta, lasciato un ruolo accessorio. Infatti, devono essere valutati, non ai fini di conformità o classificazione, ma per eventuali indagini specifiche ed interventi correttivi (art. 14 comma 2) in zone a rischio di contaminazione o in seguito ad eventi imprevedibili.

Anche l'introduzione del controllo «*delle fioriture di fitoplancton e della proliferazione di macroalghe*» riguarda solo zone che sono soggette a questi fenomeni per effettuarne una valutazione e prendere eventuali provvedimenti (art. 14 comma 1).

La stessa Commissione evidenzia (par. 4.4 della relazione introduttiva), comunque, che «*la drastica riduzione dei parametri prescelti nella nuova direttiva sulle acque di balneazione comporterà ingenti riduzioni dei costi, eviterà duplicazioni, ma non porterà ad alcuna riduzione nel grado di protezione dei cittadini*».

2 GLI OBIETTIVI DELLA SPERIMENTAZIONE

Le principali novità introdotte, dal punto di vista della gestione e del controllo delle acque di balneazione, riguardano le possibili differenze tra i due sistemi di attribuzione dell'idoneità (conformità) e l'introduzione del concetto di qualità (classe) nella tutela sanitaria.

La riduzione nel numero di parametri determinanti, la carenza di informazioni sulle concentrazioni nelle nostre acque, il fatto che i nuovi parametri microbiologici ed i relativi limiti "vincolanti" e di "riferimento" siano difficili da confrontare con il set degli attuali limiti e parametri, microbiologici e non, sono tutti fattori che comportano una notevole incertezza sulle previsioni della qualità delle acque di balneazione. Inoltre, l'ambito temporale di elaborazione dei dati, che passa da 1 a 3 anni, ed il nuovo metodo di calcolo (95° percentile) introducono un'ulteriore variabile nella valutazione dell'impatto di questa direttiva sulla situazione toscana.

Dal punto di vista operativo, poi, la classificazione comporterà una diversa frequenza del monitoraggio in base alle classi. Infatti, a differenza di adesso, con differenze tra 12 o 6 campionamenti stagionali, si potrà arrivare, nella migliore delle ipotesi (qualità eccellente), a soli 3-4 campioni in una stagione balneare di 5 mesi, come quella italiana. Questa condizione, se presente in un numero significativo di siti (come è il caso della costa toscana, dove già oltre il 75% dei punti può usufruire della riduzione del campionamento), potrebbe portare ad una diminuzione dello sforzo e delle risorse necessarie al controllo delle acque di balneazione, con una conseguente miglior efficienza ed uguale tutela dell'ambiente.

La Commissione nella stessa proposta di direttiva, rendendosi conto che la sua applicazione potrebbe cambiare anche sostanzialmente il sistema di controllo e la situazione di

² il pH è previsto solo per le acque dolci

molte zone di balneazione, ha voluto venire incontro agli operatori ed agli amministratori locali, agevolandone i compiti e l'uso delle risorse, ed ha introdotto la possibilità di anticipare i tempi di recepimento a livello nazionale della direttiva (comma 3 art. 7).

Queste considerazioni hanno portato a formulare un'ipotesi di progetto per avviare la sperimentazione sulla nuova direttiva, in parallelo al controllo normale ai sensi del vigente DPR 470/82, per vedere quale poteva essere l'impatto delle modifiche normative sulla situazione toscana e sul nostro sistema di controllo.

3 GLI APPROFONDIMENTI DEL 2004

In base all'esperienza della stagione 2003 e per aggiornare ulteriormente il sistema di controllo delle acque di balneazione della Toscana, nell'ottica della più moderna normativa ambientale, è stato deciso, di intesa con la Regione Toscana, di apportare alcuni cambiamenti al piano sperimentale dell'anno precedente. Pertanto, in accordo tra Regione Toscana ed ARPAT, è stato deciso di continuare la sperimentazione su Enterococchi intestinali e *Escherichia coli* anche durante la stagione di campionamento 2004, in concomitanza dei controlli “routinari” sulle acque di balneazione della Toscana previsti dalla vigente normativa.

Il progetto di sperimentazione, denominato “Balneazione 2004” è stato approvato dalla Giunta Regionale Toscana con D.G.R. n. 360 del 19/04/2004 ed è stato finanziato dalla Regione formalizzando il rapporto con un'apposita convenzione il 12/8/2004 (decreto del DG ARPAT n. 574 del 03/09/2004). Questo progetto ha previsto alcune innovazioni rispetto a quello del 2003, per un ulteriore adeguamento alla proposta di Direttiva e per una verifica delle perplessità metodologiche.

3.1 LE “AREE OMOGENEE”

Già nella direttiva europea del 1976 (76/160/CEE) esisteva la definizione di “zona di balneazione” come luogo in cui si trovano le acque di balneazione (art. 1 comma b), senza che venisse previsto alcun limite di estensione o di altro genere, ma lasciandone l'identificazione agli Stati membri. Anzi, all'art. 4 comma 2, veniva esplicitamente stabilito che le zone di balneazione dovevano essere «*create dalle autorità competenti degli Stati membri*» e che dovevano essere «*specialmente attrezzate per la balneazione*».

E' solo con la norma italiana di recepimento (DPR 470/82) che viene introdotto (primo capoverso dell'Allegato 2 “Norme tecniche”) una limitazione chilometrica: «*di norma la distanza tra due punti di prelievo adiacenti non dovrà superare i 2 km salvo a ridurla opportunamente nelle zone ad alta densità di balneazione*», nonostante nell'articolato venga mantenuta la definizione originale (art. 2 comma b) e venga attribuita alle Regioni la competenza dell'individuazione delle zone idonee alla balneazione (art. 4 comma b).

Questo tipo di impostazione va contro tutti i principi ispiratori per una corretta gestione della fascia costiera, per la pianificazione ed il monitoraggio ambientale e per un corretto uso e tutela delle risorse. Infatti, come abbiamo visto, tutte le successive ipotesi di revisione mettono tra i principali obiettivi la conoscenza di tutti fattori di pressione che possono incidere sulla qualità delle acque di balneazione, per provvedere ad una loro gestione e mitigazione, individuando gli standard di qualità ambientale da perseguire. Questo tipo di approccio,

perfettamente in linea con la direttiva quadro sulle acque (2000/60/CE), pone come base territoriale il bacino idrografico o, comunque, un ambito definito sulla base di un'analisi territoriale di dettaglio, che tenga presente sia le caratteristiche naturali che quelle antropiche.

Invece, il limite chilometrico massimo (tutto e solo italiano) ha creato non poche difficoltà nella predisposizione dei piani di monitoraggio, in quanto l'individuazione dei siti di controllo delle acque di balneazione doveva essere fatta, spesso, a prescindere dalla reale esigenza territoriale, ma solo per non incorrere in problemi normativi. Queste difficoltà sono vere ancor più per quelle regioni, come la Toscana, dove l'alternanza di tipologie costiere e la notevole diversità degli ambienti prevedrebbero una maggior flessibilità ed adattabilità dei criteri di monitoraggio. Infatti, le coste rocciose difficilmente raggiungibili e poco frequentate (soprattutto nella zona dell'Arcipelago Toscano), così come i lunghi tratti di costa sabbiosa senza foci fluviali, né scarichi né altri fattori di rischio (come è dimostrabile da serie storiche decennali di valori abbondantemente entro i limiti), potrebbero essere correttamente controllate con pochi punti di prelievo, anche a notevole distanza l'uno dall'altro.

Nonostante queste limitazioni, la Regione Toscana, in stretta collaborazione con i tecnici delle Unità Sanitarie Locali, prima, e dei Dipartimenti ARPAT, poi, ha individuato i siti per il controllo delle acque di balneazione sulla base di criteri ancora oggi validi e che si possono così riassumere:

- densità di popolazione balneare,
- presenza di strutture adibite alla balneazione,
- accessibilità dei luoghi da terra,
- consuetudini balneari della popolazione,
- fonti di possibile inquinamento da terra.

Dopo, però, oltre 20 anni di monitoraggio, con la conseguente aumentata esperienza e conoscenza del territorio, considerando l'evoluzione delle normative e la nuova concezione di controllo ambientale applicato alle acque marine costiere, è possibile ripensare quel sistema di controllo, aggiornando i criteri di valutazione, gli obiettivi ed il piano di monitoraggio.

Nell'ultima versione della proposta di direttiva europea (Fascicolo interistituzionale: 2002/0254 (COD) del 23 giugno 2004), su precisa volontà della rappresentanza italiana, è stata introdotta una ulteriore possibilità per andare in questa direzione, individuando alcuni criteri per operare questa revisione dei piani. Infatti, all'art. 4 comma 5 di quel documento, si prevede, per quanto attiene alla valutazione della qualità, che *«gli Stati membri possono suddividere o raggruppare acque di balneazione esistenti alla luce delle valutazioni della qualità delle acque di balneazione. Essi possono raggruppare le acque di balneazione solo se dette acque di balneazione:*

- a) sono contigue;*
- b) hanno ricevuto valutazioni simili nei quattro anni precedenti;*
- c) hanno profili che identificano fattori di rischio comuni o assenza di fattori di rischio».*

In pratica, quindi, si prevede che possano esistere delle entità superiori alle acque di balneazione, così come definite fino a questo momento (richiamo valido soprattutto o, forse,

esclusivamente per la situazione italiana, per quanto detto in precedenza), che raggruppano tutte quelle di uguali caratteristiche in una stessa zona. Queste entità che, per comodità, denomineremo “aree omogenee” saranno quelle sulle quali dovrà essere impostato il controllo, sulla base dei dati raccolti con l’attuale normativa (DPR 470/82 e successive modifiche).

Inoltre, nella stessa versione del 28 giugno 2004 all’art. 3 comma 3, si specifica che «*il punto di monitoraggio è la zona delle acque di balneazione:*

- a) *nella quale si prevede il maggior afflusso di bagnanti; o*
- b) *nella quale si prevede il rischio più elevato di inquinamento in base al profilo delle acque di balneazione».*

Questo significa che, nel caso dell’“area omogenea”, un tratto di costa dove le caratteristiche naturali (geomorfologiche, idrologiche, ecc.) siano sostanzialmente uniformi, il punto di controllo vada posizionato laddove si concentrano gli eventuali fattori di rischio.

Prendendo spunto da queste indicazioni, cercando di chiarire che cosa si dovesse intendere per “valutazioni simili” e per quantificare meglio i fattori di rischio, sono stati utilizzati i dati ufficiali forniti dal Sistema Informativo Sanitario del Ministero della Salute negli ultimi quattro anni, rielaborandoli secondo questi criteri

- rispetto dei limiti del DPR 470/82 per tutti i parametri;
- rispetto dei limiti del DPR 470/82 per i soli parametri microbiologici, che sono considerati la causa più frequente di inquinamento delle acque di balneazione e i soli certamente riferibili ad una contaminazione antropica;
- rispetto dei limiti Imperativi della 76/160/CEE per i soli parametri microbiologici;
- classe di appartenenza dell’Indice di Qualità Batteriologica (IQB).

Quest’ultimo indice, si basa sostanzialmente sull’uso dei parametri microbiologici fecali come indicatori ambientali³, attribuendo diversi pesi ai valori calcolati per ciascun parametro e creando una classificazione in base al punteggio totale. L’IQB, quindi, non valuta solo la qualità igienico-sanitaria delle acque di balneazione, ma fornisce indicazioni sulla qualità ambientale e sul tipo ed importanza dei fattori di rischio a cui sono sottoposte.

Tabella 1 – Classificazione dei punti di balneazione per la definizione delle aree omogenee (i valori sono espressi come frequenza sul totale dei campioni raccolti)

Classe	Tutti i parametri a norma	Parametri microbiologici:		IQB classe
		entro limiti Guida	entro limiti Imperativi	
A	100%	100%	100%	1-2
B	>95%	>95%	100%	1-2
C	>90%	>90%	100%	1-3
D ⁴	≤90%	≤90%	<100%	4-5

³ vedere anche Melley A., Iozzelli M., 2002 - *Controllo e tutela delle acque costiere in Toscana*. Regione Toscana – ARPAT, Firenze, 70 pp

⁴ in questo caso è sufficiente che almeno 1 delle 4 condizioni sia verificata per determinare la classe D, cioè che il punto non possa rientrare in nessuna delle altre 3 classi

Prendendo i criteri sopra enunciati e combinandoli insieme, mantenendo una sostanziale omogeneità di tutela della salute e di qualità ambientale all'interno di una stessa combinazione, è stata effettuata una classificazione dei punti di balneazione attualmente controllati, secondo uno schema comprensivo di quattro classi (Tabella 1).

Sulla base di questa nuova classificazione, abbiamo verificato quali punti limitrofi appartenessero alla stessa classe, facendo una prima ipotesi di accorpamento. Poi, sulla base di quali erano stati i motivi di istituzione di quel punto di controllo (delimitazione di un divieto permanente, presenza di foci fluviali, scarichi, ecc.), di quali potevano essere i fattori di rischio (presenza di porti, centri urbani, ecc.) e se vi fossero cambiamenti nella morfologia costiera (promontori, costa rocciosa e sabbiosa), abbiamo proceduto ad una ulteriore verifica dell'area omogenea. Abbiamo sempre e comunque escluso dall'accorpamento tutti i punti ricadenti in classe D, tutti quelli che delimitavano un divieto permanente e tutti quelli separati da barriere naturali o artificiali.

Nei casi dubbi, in una zona, cioè, con caratteristiche ambientali apparentemente uniformi dove venivano evidenziati punti con classificazione diversa, abbiamo approfondito l'analisi per verificare se i fattori di contaminazione (per quanto non esattamente identificati) di un punto fossero gli stessi degli altri e se, in questo caso, l'effetto fosse rappresentato da quello in classe peggiore. In altri termini, abbiamo valutato se la causa di inquinamento fosse ben localizzata e se la classificazione fosse determinata solo dalla distanza dal punto critico (per un effetto di diluizione e dispersione degli inquinanti). Questo è stato possibile, osservando nel tempo la concomitanza delle concentrazioni batteriche più elevate nei diversi punti e la presenza di un preciso andamento spaziale delle stesse, coerente con la nostra classificazione.

Infine, tra i punti appartenenti ad una stessa area omogenea, così determinata, abbiamo scelto di mantenere (per continuità con il passato e per salvaguardare la serie storica) quello in cui venivano evidenziate condizioni più critiche (campioni non a norma, concentrazioni medie di batteri fecali, classe IQB, ecc.).

3.2 IL PROTOCOLLO METODOLOGICO PER *E. COLI*

Dai dati del 2003, sono emersi con chiarezza i problemi incontrati per l'analisi di *E. coli* con il metodo suggerito a livello europeo come il più valido e specifico: il metodo enzimatico miniaturizzato ISO 9308-3:1998⁵.

Al di là del fatto che un confronto tra risultati espressi come MPN (per *E. coli*) e come UFC (per i coliformi fecali) è improprio dal punto di vista statistico, il divario dei valori registrato è stato tale che non poteva essere spiegato solo su questa base. Infatti, gli EC erano stati trovati superiori di alcuni ordini di grandezza ai CF, anche in situazioni indipendenti da eventuali fenomeni di contaminazione ed i valori MPN non erano compatibili con la presenza di cellule di EC, neppure se metabolicamente non attive.

Inoltre, nel manuale fornito dalla ditta Bio-Rad, che distribuisce in Italia le micropiastre per l'ISO 9308-3:1998, si fa riferimento alla verifica di crescita batterica (come torbidità nel pozzetto) insieme alla reazione fluorescente, per determinare la positività del pozzetto,

⁵ vedi anche APAT & IRSA-CNR, 2003 – *Metodi analitici per le acque. Volume terzo. 7030 Escherichia coli. Metodo A*. APAT, Manuali e linee guide, 29/2003: 884-886

indicazione non presente nel metodo originale. Questa caratteristica, però, con l'uso di micropiastre dal fondo opaco (quali erano quelle fornite nel 2003) non poteva essere apprezzata, potendo indurre in errore nel conteggio della positività, non sufficiente, comunque, a spiegare i dati “anomali”. Di questo problema è stata informata la ditta Bio-Rad, che si è premurata di chiedere chiarimenti alla società francese di produzione e, comunque, nel 2004 ha fornito solo micropiastre trasparenti.

L'ipotesi più probabile, come è stato detto, è che vi sia, in alcune situazioni particolari (zone, periodi, ecc.), un'interferenza determinata da microrganismi (batteri o fitoplancton eterotrofo) che possiedono lo stesso enzima di EC (la β -glucuronidasi) e che sono normalmente presenti nel plancton marino. Tali batteri, però, sembrano poter crescere in modo diverso nei pozzetti del metodo miniaturizzato piuttosto che su Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX).

Dato che, attualmente, non sembra che né a livello nazionale (ISS) né a livello europeo vi siano ripensamenti sull'affidabilità del metodo ISO 9308-3:1998, si è deciso di adottare una sorta di protocollo analitico uniforme per consolidare e verificare le ipotesi del 2003. Questo protocollo prevede:

1. analisi di *E. coli* su membrane filtranti⁶ con Tryptone Bile X-Glucuronide agar (TBX agar) in parallelo al metodo ISO 9308-3:1998 e su tutti i campioni della sperimentazione 2004;
2. verifica di accoppiamento tra crescita batterica e fluorescenza nei pozzetti delle micropiastre (trasparenti) per dare positività di EC;
3. analisi aggiuntiva per tutti i campioni dell'Isola d'Elba, di S. Vincenzo e di Piombino (le zone maggiormente interessate dai dati anomali nel 2003) su Marine Agar con aggiunta del cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-glucuronide (X-Gluc) alla concentrazione di 0,075g/l (lo stesso composto del metodo con TBX), per evidenziare eventuale crescita di batteri marini con enzima β -glucuronidasi;
4. nei casi in cui la lettura di *E. coli* dalle micropiastre MPN si presenti nettamente discordante con le letture su membrane filtranti, si procede all'isolamento dei batteri dai pozzetti positivi (per fluorescenza sotto luce UV e per formazione di deposito sul fondo) delle micropiastre MPN per delle prove di conferma.

4 MATERIALI E METODI

Delle metodiche utilizzate per la sperimentazione 2004 si è già detto in precedenza e si rimanda al volume APAT & IRSA-CNR, 2003 – *Metodi analitici per le acque* per qualsiasi ulteriore specifica metodologica.

4.1 IL CAMPIONAMENTO

Questa volta, i campioni sono stati raccolti solo nelle aree omogenee, tralasciando le zone sottoposte a divieto permanente per inquinamento (foci fluviali) e quelle del controllo

⁶ APAT & IRSA-CNR, 2003 – *Metodi analitici per le acque. Volume terzo. 7030 Escherichia coli. Metodo F*. APAT, Manuali e linee guide, 29/2003: 892-893

straordinario, dato che nel 2003 i risultati emersi da questi controlli erano stati del tutto analoghi e perfettamente coerenti con quelli dei punti di controllo routinario.

I criteri, sopra specificati, per la definizione delle aree omogenee sono stati applicati per la pianificazione della sperimentazione 2004, come verifica delle scelte operate, sia in termini di sicurezza per la salute dei bagnanti sia di risparmio di risorse umane e finanziarie: l'analisi dei parametri sperimentali, quindi, è stata fatta "solo" su 243 aree omogenee⁷ contro i 373 punti previsti dal DPR 470/82, con una riduzione di circa il 35% (Tabella 2).

Tabella 2– Confronto tra punti controllati e campioni "routinari" raccolti nel 2004 sulla base del sistema attuale(DPR 470/82) e delle aree omogenee (studio "Balneazione 2004)

Prov	Dip.	Nome Comune	DPR 470/82		Balneaz. 2004		Differenze	
			Punti	Campioni	Aree Omog	Campioni	Punti	Campioni
MS	MS	CARRARA	4	36	3	30	25%	17%
MS	MS	MASSA	13	126	12	114	8%	10%
MS	MS	MONTIGNOSO	4	42	3	30	25%	29%
LU	LU	FORTE DEI MARMI	4	42	4	42	0%	0%
LU	LU	PIETRASANTA	4	36	4	36	0%	0%
LU	LU	CAMAIORE	3	30	3	30	0%	0%
LU	LU	VIAREGGIO	5	42	4	36	20%	14%
PI	PI	VECCHIANO	3	18	3	18	0%	0%
PI	PI	SAN GIULIANO TERME	2	12	1	6	50%	50%
PI	PI	PISA	16	96	11	66	31%	31%
LI	LI	LIVORNO	26	180	16	120	38%	33%
LI	LI	ROSIGNANO MARITTIMO	23	138	13	78	43%	43%
LI	LI	CECINA	10	72	5	36	50%	50%
LI	LI	BIBBONA	7	48	3	24	57%	50%
LI	LI	CASTAGNETO CARDUCCI	13	78	6	36	54%	54%
LI	LI	CAPRAIA ISOLA	5	30	3	18	40%	40%
LI	Pb	SAN VINCENZO	17	132	10	90	41%	32%
LI	Pb	PIOMBINO	26	216	17	156	35%	28%
LI	Pb	CAMPO NELL'ELBA	8	78	6	54	25%	31%
LI	Pb	CAPOLIVERI	15	114	9	78	40%	32%
LI	Pb	MARCIANA	10	72	7	48	30%	33%
LI	Pb	MARCIANA MARINA	2	24	2	24	0%	0%
LI	Pb	PORTO AZZURRO	5	36	3	24	40%	33%
LI	Pb	PORTOFERRAIO	15	126	11	96	27%	24%
LI	Pb	RIO MARINA	9	54	6	36	33%	33%
LI	Pb	RIO NELL'ELBA	2	12	2	12	0%	0%
LI	Pb	CAMPIGLIA MARITTIMA	1	12	1	12	0%	0%
GR	GR	FOLLONICA	9	66	6	48	33%	27%
GR	GR	SCARLINO	8	66	5	48	38%	27%
GR	GR	CASTIGLIONE DELLA PESCAIA	20	120	10	60	50%	50%
GR	GR	GROSSETO	16	114	8	66	50%	42%
GR	GR	MAGLIANO IN TOSCANA	1	6	1	6	0%	0%
GR	GR	ORBETELLO	28	174	16	102	43%	41%
GR	GR	MONTE ARGENTARIO	17	102	9	54	47%	47%
GR	GR	CAPALBIO	5	30	3	18	40%	40%
GR	GR	ISOLA DEL GIGLIO	10	60	10	60	0%	0%
GR	GR	MASSA MARITTIMA	1	6	1	6	0%	0%
FI	FI	BARBERINO DI MUGELLO	4	36	4	36	0%	0%
FI	FI	SIGNA	2	18	2	18	0%	0%
Totale			373	2700	243	1872	35%	31%

⁷ per l'elenco dettagliato vedi Allegato 1

In definitiva, quindi, considerando che molti dei punti di controllo possono usufruire di una frequenza di campionamento ridotta della metà (mensile invece che quindicinale), grazie al fatto che le analisi hanno dato risultati costantemente favorevoli per tutti i parametri negli ultimi 2 anni (Allegato 1 al DPR 470/82), con l'applicazione delle aree omogenee sono stati analizzati circa 1'900 campioni per i parametri sperimentali, contro i 2'700 del controllo istituzionale (riduzione di oltre il 30% dei campioni)⁸.

4.2 L'ELABORAZIONE DEI DATI

A questo proposito occorre fare una precisazione relativamente ai valori più bassi di *E. coli*. Nel metodo ISO 9308-3 i risultati, espressi come “numero più probabile” (Most Probable Number, MPN), dipendono dalle diluizioni utilizzate e dal numero di pozzetti positivi, cioè da quanti inoculi hanno sviluppato una fluorescenza blu, dovuta all'idrolisi del 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG), evidenziata alla luce ultravioletta.

Dato che, normalmente, per le acque marine si usano 2 diluizioni (64 pozzetti con diluizione 1:2 e 32 a 1:20), quando non si riscontrino pozzetti positivi, in base alle apposite tabelle di conversione, il valore dovrebbe essere riportato come inferiore al limite del metodo (15 batteri/100ml): sebbene nelle stesse tabelle vengano forniti i limiti di affidabilità di questa probabilità (nello specifico 2 e 108 batteri/100ml), le concentrazioni dovrebbero essere espresse come <15, senza specificare ulteriormente.

Nel nostro caso, invece, dovendo confrontare questi valori con quelli in UFC/100ml, che possono arrivare fino a “0” (assenza di colonie), abbiamo dovuto adottare una convenzione per rendere le due unità di misura il più possibile analoghe, anche in considerazione di una notevole numerosità di campioni con concentrazioni tra 0 e 15 UFC/100ml.

In pratica quando dall'analisi di *E. coli* con il metodo miniaturizzato il risultato era inferiore a 15 MPN/100ml abbiamo inserito il valore convenzionale “1” (uno), sulla base del quale sono state fatte tutte le elaborazioni.

Per la classificazione, la nuova direttiva prevede l'utilizzo del 95° percentile, definendo anche le modalità di calcolo nel modo seguente:

- i) prendere il \log_{10} di tutte le enumerazioni batteriche nella sequenza di dati
- ii) calcolare la media aritmetica dei $\log_{10}(\mu)$
- iii) calcolare la deviazione standard dei $\log_{10}(\sigma)$
- iv) 95° percentile = antilog $((\mu) + (1,65 \times \sigma))$

Questo metodo ha il problema pratico di dover convertire i valori inferiori al limite del metodo (<15 UFC/100ml nel nostro caso) in valori diversi da zero, per poterne fare la trasformazione logaritmica ed a seconda del valore inserito si possono ottenere risultati sensibilmente diversi. Inoltre, dal punto di vista operativo la sequenza di elaborazioni, nel caso di un numero elevato di punti e di campioni, non è di agevole realizzazione.

⁸ da notare che nella stesura del progetto erano stati previsti, rispettivamente, 2846 e 1999 punti per il controllo “routinario” e per le aree omogenee sulla base di quanto avvenuto nel 2003, ma nel 2004 vi è stato un incremento dei punti con frequenza dimezzata, da 287 a 296 (3%), e ciò ha comportato una diminuzione del totale dei campioni.

Del resto la definizione proposta del 95° percentile è quella di Bartram, J. e Rees, G. (*Monitoring Bathing Waters*, E. e F. N. Spon, Londra, 2000), ma ne esistono di altre, ugualmente utilizzate a livello internazionale nel campo delle analisi delle acque (di Weibull, di Hazen, ecc.). Anche il programma software Microsoft Excel™ propone una formulazione di facile applicabilità (necessita di solo pochi campioni, al contrario delle altre, e non prevede la trasformazione \log_{10}) e di rapido uso nel caso di dover ripetere il calcolo n-volte. Questa formulazione, tra l'altro, dà risultati che non si discostano significativamente da quelli calcolati con il metodo previsto nell'Allegato II della direttiva e che non sono mai inferiori.

In base a queste considerazioni, si è ritenuto di adottare la formulazione di Excel™ per il calcolo del 95°ile.

4.3 LA STRUTTURA ORGANIZZATIVA

Nella fase operativa del progetto sono state impiegati operatori di 7 Dipartimenti ARPAT (per l'esattezza di 6 Dipartimenti provinciali e del Servizio Sub-provinciale di Piombino) oltre che dell'Area Mare. Per ogni struttura territoriale è stato individuato uno o più referente/i per il progetto, tra il personale dedicato al controllo della risorsa idrica e delle acque di balneazione, così suddivisi

- Dipartimento di Massa: C. Righini, M. Casotti
- Dipartimento di Lucca: G.N. Baldaccini, G. Luchetti
- Dipartimento di Pisa: G. Benedettini
- Dipartimento di Livorno: P. Righini
- Servizio di Piombino: I. Gartner, P. La Malfa,
- Dipartimento di Grosseto: F. Martelli
- Dipartimento di Firenze: G. Caldini
- Area Mare (coordinamento): A. Melley, F. Gambassi,

Naturalmente, essendo previste attività di laboratorio e non che si sovrappongono e che devono essere coordinate con quelle normalmente svolte dalle diverse strutture operative, non solo relativamente alla balneazione, sono stati di volta in volta coinvolti i responsabili dell'U.O. “Prevenzione e controlli ambientali integrati” e dell'U.O. “Attività di laboratorio”, laddove non coincidessero con i referenti del progetto.

Inoltre, in considerazione del notevole aumento del carico di lavoro per lo studio sperimentale, alcuni Dipartimenti, oltre al personale tecnico e sanitario già presente, hanno utilizzato professionalità esterne specializzate in analisi biologiche e microbiologiche.

In definitiva hanno collaborato alle attività dello studio sperimentale, comprendenti sia le analisi di laboratorio sia il campionamento sia la raccolta e l'elaborazione dei dati sia il coordinamento, oltre 20 unità di ARPAT, tra dirigenti biologi, tecnici e collaboratori esterni, oltre al personale amministrativo per la parte di acquisto di materiale e strumentazione.

Rispetto al 2003, in considerazione dell'importanza e della consistenza delle attività per il controllo delle acque di balneazione, sia istituzionali che sperimentali, è stato costituito un apposito Gruppo di Lavoro “Balneazione”, all'interno della Commissione permanente per la

Tutela della Risorsa Idrica dell’Agenzia. Questo GdL, che vede, tra i suoi componenti, gli stessi referenti del progetto ed il cui coordinamento è stato affidato al coordinatore del progetto (Antonio Melley), ha messo a punto la parte metodologica, ha validato le scelte fatte sulle aree omogenee ed ha discusso i diversi problemi incontrati durante lo svolgimento del progetto. Tra l’altro, l’istituzione di questo GdL, come strumento organizzativo ed operativo per tutto ciò che riguarda la gestione delle acque di balneazione, si è dimostrata una scelta ancor più efficace nel gestire i rapporti con le diverse strutture territoriali, nel raccordare le attività di laboratorio con quelle di controllo integrato e nel favorire la condivisione di obiettivi e percorsi di concerto con la Regione Toscana.

5 I RISULTATI DEL 2004

L’analisi dei risultati del progetto 2004 è stata condotta in modo analogo a quanto fatto nella precedente sperimentazione, per consentire un più facile confronto tra ciò che era emerso od era stato ipotizzato nel 2003 e quanto è stato riscontrato nel 2004. La documentazione a cui fare riferimento per il 2003 è la seguente:

Iozzelli M., Melley A., 2004 – *Studio sperimentale sulla nuova direttiva europea per le acque di balneazione*. Regione Toscana, EDIFIR, Firenze, 77 pp

Melley A., Iozzelli M., 2004 – *Studio sperimentale sulla proposta di direttiva europea relativa alle acque di balneazione: aspetti gestionali*. Ann. Ist. Super. Sanità, in stampa

G. Benedettini, 2004 – *Studio sperimentale sulla proposta di direttiva europea relativa alle acque di balneazione: aspetti metodologici*. Ann. Ist. Super. Sanità, in stampa

5.1.1 Il confronto tra i metodi per EC

Durante la sperimentazione del 2004, di fatto, sono state applicate metodiche differenti ed in parallelo solo per l’analisi di *Escherichia coli*, in quanto il metodo delle membrane filtranti descritto nell’Allegato del DPR 470/82 per l’analisi di Streptococchi fecali differisce dal metodo ISO 7899-2:2000 (quello per gli enterococchi nella proposta di direttiva) sostanzialmente solo per la prova di conferma su bile-esculine-azide agar (BEA), sempre richiesta nel metodo ISO. Si è convenuto, quindi, di adottare il solo metodo ISO 7899-2:2000 (tra l’altro proposto anche a livello nazionale come metodo ufficiale⁹) sia per SF che per EI.

Invece, come si è detto, per l’analisi di *Escherichia coli* è stato fatto il confronto tra la metodica proposta a livello europeo (ISO 9308-3:1998¹⁰) e quella su membrane filtranti¹¹ con Tryptone Bile X-Glucuronide agar (TBX agar), già ampiamente applicata e validata nei laboratori dell’Agenzia. Come stabilito dal protocollo metodologico (par. 3.2), infatti, i 2 metodi

⁹ APAT & IRSA-CNR, 2003 – *Metodi analitici per le acque. Volume terzo. 7040 Streptococchi fecali ed enterococchi. Metodo C*. APAT, Manuali e linee guide, 29/2003: 901-904

¹⁰ vedi anche APAT & IRSA-CNR, 2003 – *Metodi analitici per le acque. Volume terzo. 7030 Escherichia coli. Metodo A*. APAT, Manuali e linee guide, 29/2003: 884-886

¹¹ APAT & IRSA-CNR, 2003 – *Metodi analitici per le acque. Volume terzo. 7030 Escherichia coli. Metodo F*. APAT, Manuali e linee guide, 29/2003: 892-893

sono stati utilizzati contemporaneamente su tutti i campioni prelevati durante tutto il progetto "Balneazione 2004".

Avendo a disposizione un data set completo, sia per copertura spaziale che temporale, sono subito emerse le differenze esistenti tra le metodiche, cosa che nella corsa stagione era stata in parte mascherata dall'estrema omogeneità dei dati disponibili (solo i mesi di fine estate e su un numero limitato di situazioni analoghe). Infatti, i dati tendono a disperdersi maggiormente (Figura 1), rispetto a quanto evidenziato nel 2003: sia la pendenza della retta ($m=6.055$) che il coefficiente di correlazione (0.917) risultano peggiorati, per quanto non in maniera eclatante, e mettono in dubbio la confrontabilità dei due metodi.

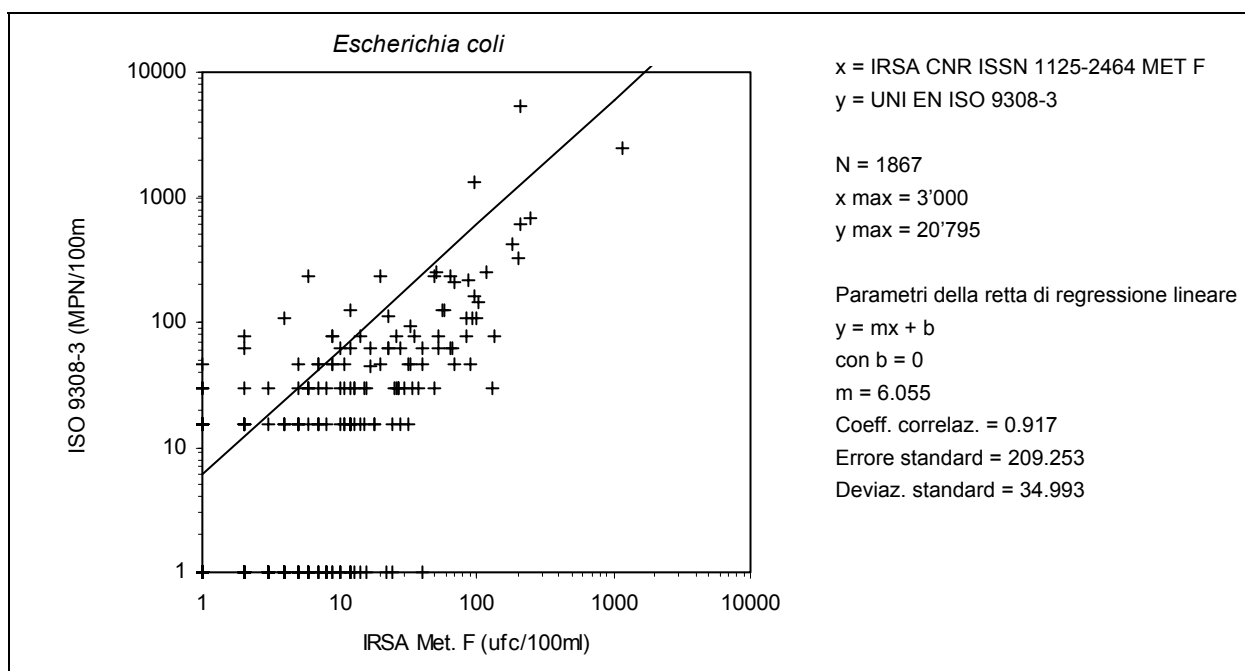


Figura 1 - Confronto statistico tramite il metodo della regressione lineare tra il metodo IRSA Metodo F ed il metodo ISO 9308-3 per l'analisi di *Escherichia coli*

Naturalmente, questa difficoltà nel confronto è determinata dai diversi principi metodologici applicati e, soprattutto, dalla modalità di interpretazione ed espressione dei risultati. In particolare, il metodo MPN, avendo come limite di rilevabilità 15 unità, non permette un reale confronto verso queste basse concentrazioni batteriche, che, nel nostro caso, rappresentano tra l'80 e 90% dei valori rilevati. Inoltre, l'uso delle tabelle statistiche di conversione offre un numero ridotto di valori MPN rispetto alle possibili situazioni evidenziate ed ai corrispondenti valori di UFC: per esempio tra 15 e 90 unità abbiamo solo 10 valori MPN disponibili (15, 30, 45, 46, 60, 61, 75, 76, 77, 90), in base alle diverse combinazioni dei pozzetti positivi nelle 2 diluizioni (16 diverse combinazioni), mentre abbiamo ben 75 valori possibili in UFC. Queste considerazioni, però, essendo di natura metodologica, erano valide anche nel 2003, ma il risultato del confronto sembrava significativamente migliore. Del resto anche eliminando dal nostro data set tutti i valori inferiori a 15 MPN, pur restando 357 dati, non si ottengono sensibili miglioramenti nella correlazione, il che sta a significare la presenza di altri fattori di variabilità.

In definitiva, quindi, la differenza tra il confronto dei metodi effettuato nel 2003 e quello del 2004 deve essere imputata, per la maggior parte, all'estensione temporale e spaziale dei dati e, forse, alle variazioni naturali tra le stagioni balneari. In ogni caso, si tratta di fattori che, in qualche modo, sono legati alla distribuzione ed alla composizione delle popolazioni batteriche marine. Infatti, secondo quanto ipotizzato nel 2003, solo l'esistenza di interferenze nel metodo ISO 9308-3, dovute ad altri microrganismi in grado di “simulare” la presenza di *E. coli*, potrebbe spiegare queste differenze, come si vedrà in seguito (par. 5.1.2).

Un discorso analogo si può fare nel caso del confronto tra i Coliformi fecali (CF) ed *Escherichia coli*, dove lo scostamento maggiore si osserva rispetto al metodo ISO 9308-3, quando alla variabilità dovuta all'uso di un diverso principio metodologico (membrane filtranti e terreno cromogeno, da una parte, e diluizione, inoculo e reazione enzimatica, dall'altra) ed interpretativo (conta delle colonie e numero più probabile), si aggiunge quella determinata da due popolamenti batterici distinti, l'uno (EC) sottoinsieme dell'altro (CF). Infatti, anche i parametri della regressione lineare (pendenza e correlazione) confermano questa ipotesi (Figura 3 e Figura 2), risultando nettamente “migliori” nella relazione tra Coliformi ed *E. coli* espresso come UFC/100ml.

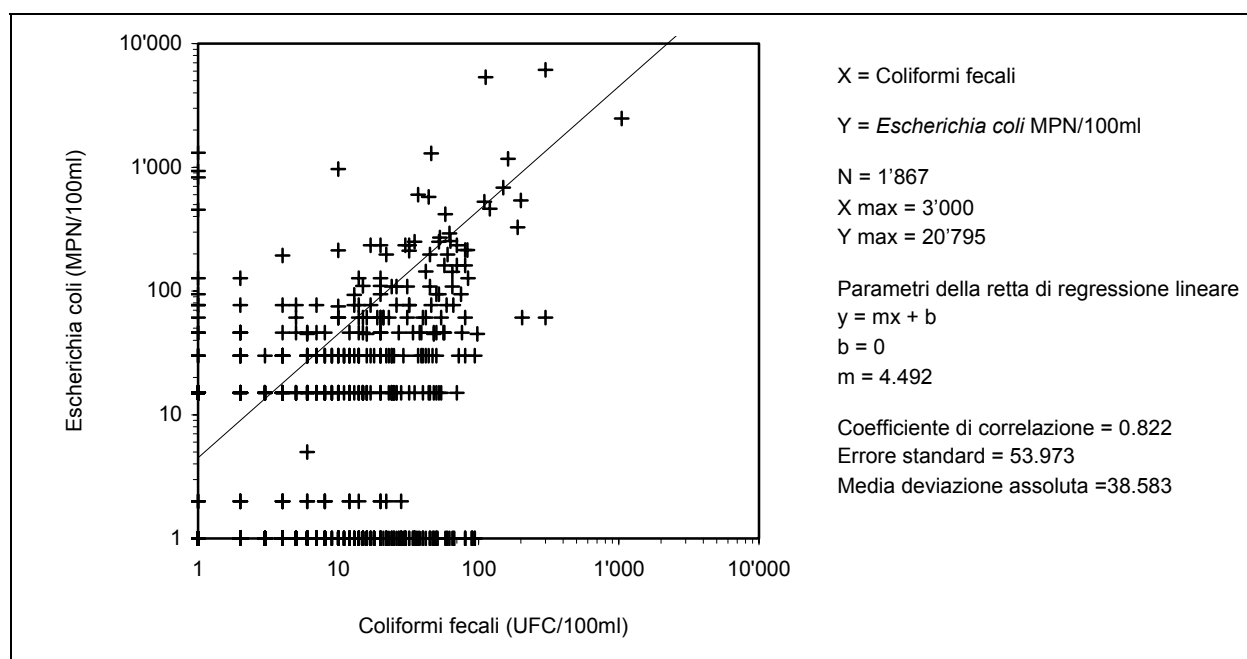


Figura 2 – Confronto statistico tramite il metodo della regressione lineare tra Coliformi fecali e *Escherichia coli* analizzato con il metodo ISO 9308-3

Viceversa, nel caso dei 2 metodi basati sull'uso delle membrane filtranti, si osserva un'ottima correlabilità dei due popolamenti (coeff.= 0.95), soprattutto se consideriamo solo i dati verso concentrazioni medio-alte (>20UFC/100ml), cioè in quel range di valori dove la possibilità di errore di conteggio è notevolmente ridotta rispetto ai valori limite del metodo. Da questo punto di vista, quindi, le differenze sono dovute alla reale composizione del popolamento batterico (si ricorda che *E. coli* fa parte dei coliformi fecali insieme ad altri generi e specie della

famiglia delle *Enterobacteriaceae*, anche se spesso ne è il principale rappresentante) ed alla casualità del campionamento.

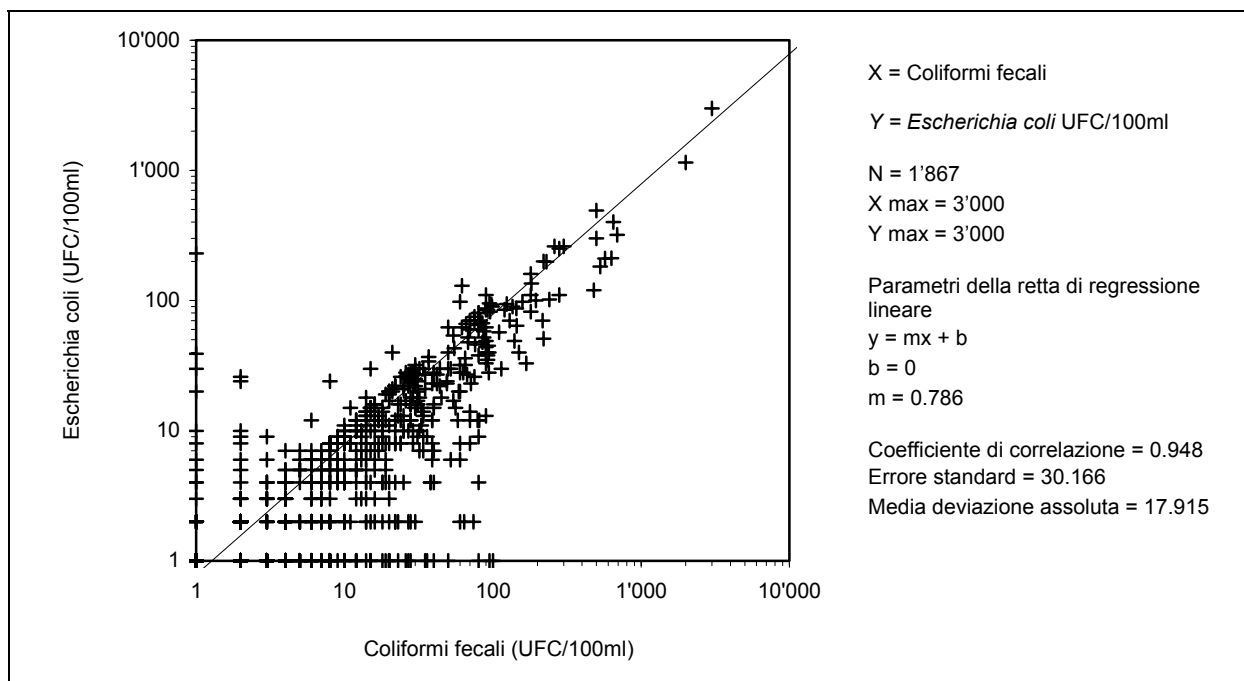


Figura 3 – Confronto statistico tramite il metodo della regressione lineare tra Coliformi fecali e *Escherichia coli* analizzato con il metodo IRSA Metodo F

Nel primo caso, tra l'altro, la diversa composizione del popolamento, almeno come variazione del rapporto tra EC e CF (in UFC/100ml), non sembra avere caratteristiche di stagionalità (Figura 4), anche se, probabilmente, risente di situazioni climatiche e non di tipo locale, non evidenziabili da questa analisi generale.

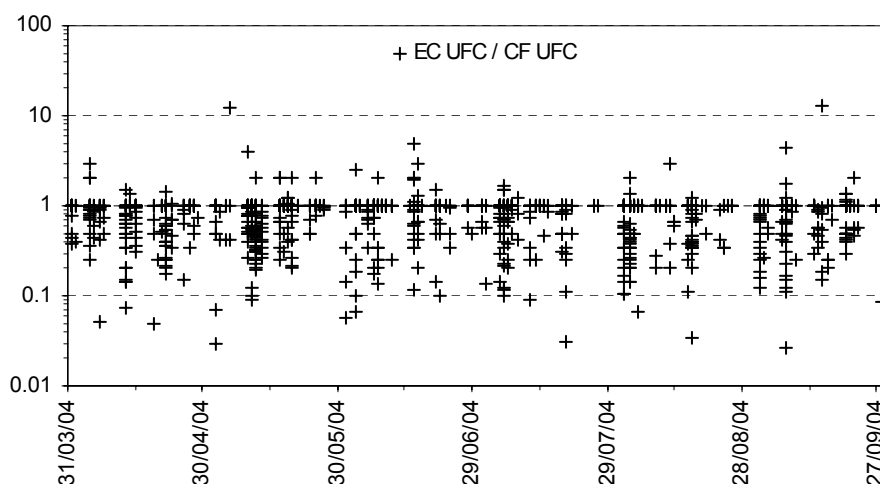


Figura 4 – distribuzione temporale del rapporto tra *E. coli* (EC UFC/100ml) e coliformi fecali (CF UFC/100ml) analizzati con i metodi a membrane filtranti

5.1.2 Le prove di conferma di *E. coli*

Innanzitutto, bisogna considerare che nel 2004 non si sono avuti scostamenti così eclatanti tra valori di EC in MPN/100ml e di coliformi fecali, come nel 2003: i casi superiori di oltre 2 ordini di grandezza sono stati solo l'1% dei campioni analizzati (26 su 1'867 dati), mentre l'anno precedente erano stati l'8% (142 su 2'676 dati). Inoltre, nel 2004 solo 5 campioni sono stati superiori di oltre 1'000 unità, contro ben 30 (quasi il 2%) nel 2003.

Queste differenze, oltre a rientrare in una normale e prevedibile variabilità interannuale delle componenti del batterioplancton marino e delle situazioni di contaminazione da terra, potrebbe essere legata a differenze di tipo climatico. Infatti, va considerato che i mesi centrali dell'estate 2003 sono stati caratterizzati costantemente da temperature molto elevate, condizioni atmosferiche di alta pressione che hanno favorito la stabilità della colonna d'acqua ed assenza pressoché totale di precipitazioni. Nel 2004, invece, si sono avuti lunghi periodi di instabilità meteorologica, con un'estate fresca e umida, che può aver condizionato in modo significativo lo sviluppo dei popolamenti batterici.

Comunque, nel caso dei campioni con dati discordanti, riferibili soprattutto al Servizio di Piombino, come nel 2003, sono state compiute delle prove di conferma, in base al protocollo sperimentale definito in precedenza, e le stesse sono state fatte anche nel caso di sicura presenza di *E. coli* uniti a valori relativamente alti di MPN per avere un controllo positivo. In Tabella 3 si riportano alcuni esempi di queste prove, dove si confrontano i valori ottenuti con i due metodi per *E. coli* con quanto risulta da semina su terreno selettivo per tutti i batteri marini (Marine agar) con l'aggiunta del substrato per l'attività enzimatica specifica di *E. coli*.

Tabella 3 – esempi di prove di conferma su Marine agar con X-gluc per *E. coli*

Tipo di situazione	Punto di prelievo	Data prelievo	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Batteri marini β -glucuronidasi positivi
			ISO 9308-3	IRSA CNR metodo F	Marine Agar con X-gluc
			MPN/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL
1	304	03/06/04	46	0	48
1	347	03/06/04	61	0	46
1	346	09/06/04	46	0	60
2	404	07/07/04	194	4	>3'000
3	440	21/06/04	61	28	30
3	185	28/06/04	46	8	40
4	346	06/07/04	20'795	>3'000	2

In generale, si sono riscontrate 4 diverse situazioni possibili:

1. valori MPN sensibilmente più elevati di quelli in UFC:

la semina dai pozzetti positivi delle micropiastre (ISO 9308-3) su TBX agar dopo 24 h di incubazione a 44° C non ha evidenziato alcuna crescita di *E. coli* e questa assenza è stata confermata da una ulteriore prova effettuata su agar xilosio-lisina-desossicolato (XLD);

la semina su Marine Agar con X-GLUC ha evidenziato una crescita tipica (attività β -glucuronidasica) dopo 24 h di incubazione a 44° C: le colonie cresciute su questo terreno sono positive alla catalasi e si presentano al microscopio come cocci Gram positivi;

2. valori MPN sensibilmente più elevati di quelli in UFC:

la semina su TBX agar ha evidenziato nessuna od una minima crescita di *E. coli*;

la semina su Marine Agar con X-GLUC ha evidenziato una forte crescita con attività β -glucuronidasica;

3. valori MPN mediamente elevati e poco superiori a quelli in UFC:

la semina su TBX agar ha confermato la crescita di *E. coli*;

la semina su Marine Agar ha evidenziato una crescita con attività β -glucuronidasica;

4. valori MPN ed UFC assai elevati:

la semina su TBX agar ha confermato la crescita di *E. coli*;

la semina su Marine Agar ha evidenziato una minima crescita;

Queste diversi risultati delle prove potrebbero corrispondere ad una diversa composizione del popolamento batterico di quelle acque: nel primo caso vi è una presenza significativa dei batteri marini con attività β -glucuronidasica diversi da EC ed una assenza totale di questi ultimi; nel secondo il popolamento è caratterizzato da un'elevata concentrazione di batteri marini con attività β -glucuronidasica diversi da EC maggiormente diversificati rispetto al primo caso ed una scarsa presenza di EC; nel terzo caso sembra che i livelli di EC e dei suoi "imitatori" (in senso enzimatico) siano equivalenti e, comunque, non elevati; infine, l'ultima situazione è quella di una reale presenza abbondante di EC che caratterizza completamente il popolamento.

Tutto ciò porta a escludere la presenza di *Escherichia coli* nei campioni con una significativa differenza di concentrazioni tra i 2 metodi (ISO 9308-3 e IRSA metodo F) ed a confermare la tesi dei batteri marini con attività β -glucuronidasica capaci di crescere a 44° C e di dare dei falsi positivi alla lettura delle piastre MPN per la ricerca di *E. coli*.

Il Dipartimento di Pisa, che si è fatto carico di approfondire le indagini, è riuscito ad isolare da alcuni pozzetti positivi i ceppi batterici responsabili di queste interferenze, identificandoli, in prima ipotesi, come Stafilococchi. Questi batteri, quindi, oltre ad avere attività β -glucuronidasica, riescono a crescere su terreno selettivo per batteri Gram negativi nonostante siano batteri Gram positivi, probabilmente a causa della bassa selettività specifica del terreno MUG-EC utilizzato nell'ISO 9308-3. Gli Stafilococchi, in genere, sono batteri che resistono in condizione anche iperaline o ambientalmente sfavorevoli, abbondanti in mare in alcune situazioni, presentano cioè molte caratteristiche che li farebbero indicare come i principali (probabilmente non i soli responsabili) indiziati dei dati "anomali" osservati anche nel 2003.

Per quanto riguarda, inoltre, l'eventuale presenza di deposito batterico sul fondo del pozzetto delle micropiastre, condizione che, insieme alla fluorescenza sotto luce UV, ne determina la positività, sono state fatte alcune osservazioni.

Inoculando i pozzetti con un ceppo selvaggio di *E. coli*, è stato constatato che il "fondello" formato non è denso e nettamente separato dalla fase liquida, ma piuttosto opaco e diffuso sul fondo. Questo comportamento è stato riscontrato anche in casi in cui il campione di acqua marina analizzato presentava una elevata carica di *E. coli* a causa di contaminazioni fognarie (sicura e provata presenza di *E. coli*!). Tuttavia non è stato provato il contrario, ossia in presenza di deposito opaco nei pozzetti positivi non necessariamente si conferma la presenza di *E. coli* ad una analisi approfondita.

Talvolta, nei pozzetti positivi sono stati osservati dei depositi misti con presenza di grumi più densi insieme al deposito diffuso e opaco. Prelevando un aliquota da questi pozzetti e seminandola sia su TBX che su Marine Agar, solo su quest'ultimo terreno si sviluppano delle colonie atipiche (bianche). Queste colonie mantengono la loro morfologia (assenza di attività β -glucuronidasica) anche nei passaggi successivi a clone isolato e, una volta reinoculate in sospensione nei pozzetti MPN, non mostrano attività β -glucuronidasica. Probabilmente, in questi casi nel pozzetto di partenza la percentuale di batteri positivi alla β -glucuronidasi è talmente bassa e mista ad altri batteri che non è possibile isolarli nei passaggi di conferma successivi. Questo può essere spiegato dal fatto che nei pozzetti della micropiastra viene evidenziata principalmente la presenza di attività enzimatica, mentre su terreno agarizzato è necessaria una attività riproduttiva tale da rendere visibile ad occhio nudo l'unità formante colonia (UFC), attività che può mancare in microrganismi stressati.

Da queste prime considerazioni, sembra ancor più evidente la poca affidabilità del metodo proposto a livello europeo (ISO 9308-3) e, comunque, la sua non applicabilità alle acque costiere tirreniche (probabilmente anche a quelle degli altri bacini italiani o dell'intero mediterraneo).

5.1.3 Il controllo delle aree omogenee

Il criterio di adozione delle aree omogenee, come zone su cui deve essere attuato il controllo delle acque di balneazione, sembra essere corretto, in quanto, quasi tutti i casi di valori non a norma sono stati trovati nei punti considerati dalla sperimentazione (tranne che in 4 occasioni), che risultano rappresentativi dell'intera area omogenea.

Anche nel caso di situazioni sostanzialmente ottimali, non si notano differenze significative tra i diversi punti compresi in una stessa area e, soprattutto, i livelli relativamente più elevati di contaminazione (sempre all'interno dei limiti normativi) sono nel punto scelto come rappresentativo dell'area nel 97% dei casi.

Infatti, confrontando i dati di concentrazioni medie dei parametri microbiologici tra le stazioni scelte come aree omogenee e quelle limitrofe non considerate nello studio, ma controllate ai sensi del DPR 470/82 (Figura 5), si nota un solo caso di valori significativamente più elevati: il punto 441 a Portoferraio ha avuto un episodio di contaminazione intensa il 7 giugno (CF = 32'000 UFC/100ml), di natura imprevista e ancora inspiegabile. Questo solo evento “eccezionale”, che è stato segnalato con un'apposita ordinanza di divieto del Sindaco, è stato sufficiente, visto il valore raggiunto, a determinare la non idoneità del punto a fine stagione, secondo la normativa attuale. Tale caratteristica potrebbe influire in modo ancor più consistente con la nuova direttiva se dovesse essere adottato il criterio del 95° percentile e risultasse difficile non considerare i valori anomali.

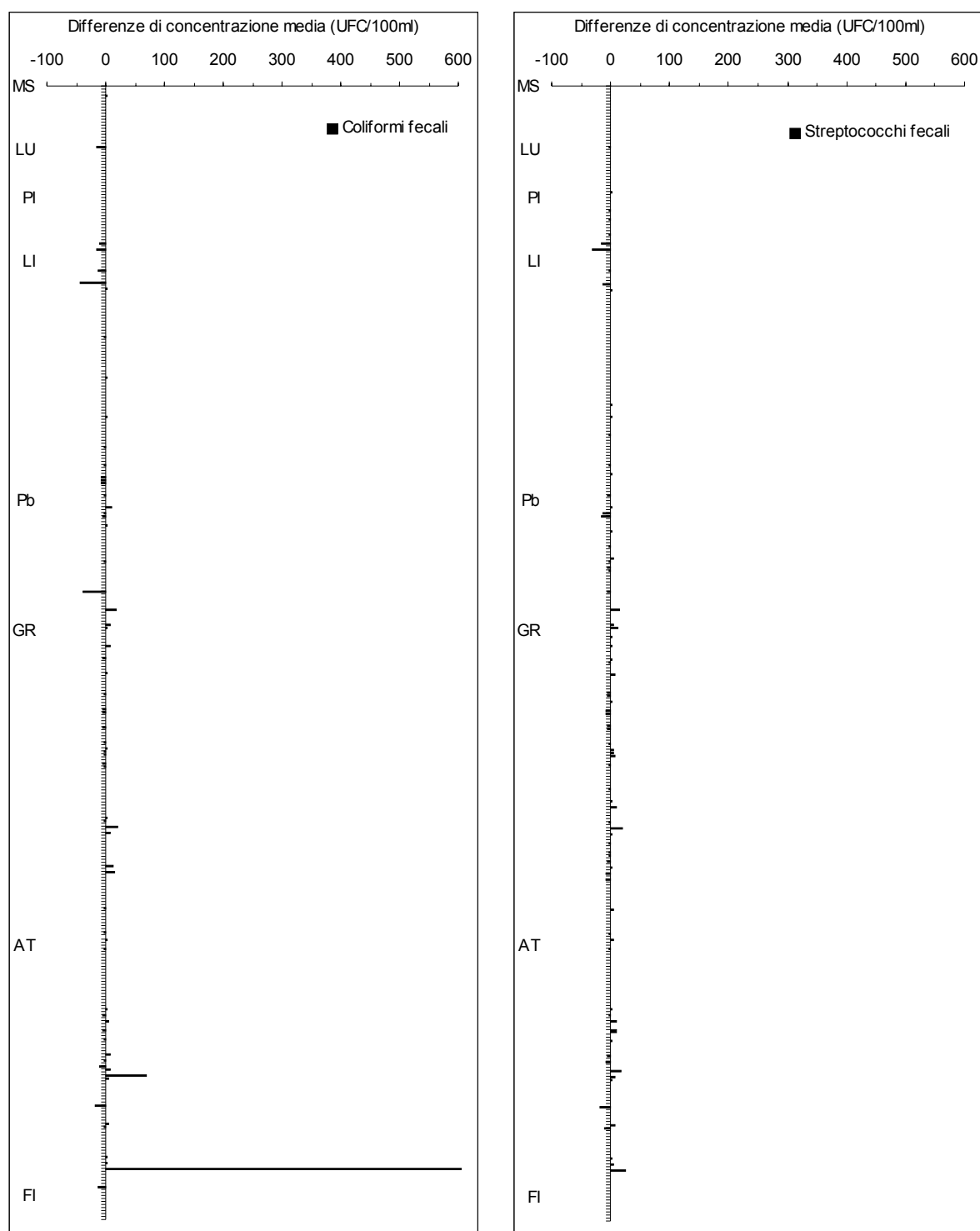


Figura 5 – differenze nelle concentrazioni medie (2004) di Coliformi fecali e Streptococchi fecali tra le stazioni scelte come aree omogenee e quelle limitrofe nei diversi dipartimenti ARPAT (AT = arcipelago toscano = Capraia, Giglio ed Elba)

Se, poi, prendiamo in esame il diverso comportamento dei parametri sperimentali e di quelli stabiliti dall'attuale normativa nelle aree omogenee, utilizzando sia i dati raccolti nel 2003

che nel 2004, possiamo riscontriamo una conferma di quanto precedentemente ipotizzato. Infatti, il numero di valori che superano i limiti “Guida” stabiliti dalla normativa europea, attuale e proposta (Tabella 4), è maggiore per EC analizzato con il metodo ISO 9308-3 rispetto alle membrane filtranti, sia nel 2004 che nell’intero biennio 2003-04, anche se è sempre minore di quanto non risulti per i Coliformi fecali. Invece, nel caso della coppia streptococchi/enterococchi il numero di superamenti è quasi identico, come era logico prevedere per la maggior sovrapposizione dei due raggruppamenti, per i limiti uguali nelle direttive e per l’utilizzo di metodiche analoghe.

Tabella 4 – Limiti normativi per i diversi parametri microbiologici e percentuali di valori oltre i limiti guida nel 2004 e nel 2003-04 nelle aree omogenee

Parametro	Riferimento normativo	Limite Guida UFC/100ml	Limite Imperativo UFC/100ml	Metodo ¹²	Valori > limite Guida	
					2004	2003-04
Coliformi fecali	76/160/CEE	100	2'000	M.F.	1.1%	2.2%
Streptococchi fecali	76/160/CEE	100	¹³	M.F.	0.3%	1.0%
<i>Escherichia coli</i>	COM(2002) 581	250	500	M.F.	0.2%	0.3%
				9308-3	0.6%	2.0%
Enterococchi	COM(2002) 581	100	200	M.F.	0.4%	1.0%

Naturalmente, le differenze sostanziali tra il 2004 ed il 2003, quanto a concentrazioni batteriche ritrovate, comportano un forte innalzamento dei valori “fuori norma” per tutti i parametri ed a questo contribuiscono, nel caso di EC analizzato con il metodo ISO 9308-3, le forti interferenze osservate nel 2003, soprattutto nella zona controllata dal Servizio di Piombino. Di fatto, però, sembra che i limiti proposti siano meno restrittivi di quelli attuali e che ci sia un diverso significato di indicatore tra i parametri sperimentali, più di quanto non sia tra quelli attuali. Infatti, i valori “fuori norma” di enterococchi sono accoppiati a quelli di *E. coli* solo nell’80% dei casi, mentre per coliformi e streptococchi questa coincidenza si ha nel 90% circa e questo può essere spiegato solo ipotizzando che gli EI siano legati a fattori di contaminazione diversi rispetto ad EC.

5.1.4 La classificazione delle aree omogenee

Per arrivare ad una classificazione delle aree omogenee, questa volta non sono stati considerati i coefficienti di conversione da CF a EC e da SF a EI, come nel 2003, in quanto la cosa aveva evidenziato notevoli problemi interpretativi, se si volevano utilizzare i dati sperimentali. Del resto la più recente versione della proposta (Fascicolo interistituzionale: 2002/0254 (COD) del 23 giugno 2004) afferma che «*i parametri 2 e 3 di cui all'allegato della direttiva 76/160/CEE sono ritenuti equivalenti ai parametri 2 e 1 dell'allegato I, parte A, colonna A della presente direttiva*» (Art. 4, comma 4, punto c) e, quindi, sembra superfluo porsi il problema della conversione. Inoltre, dopo 2 anni di sperimentazione il numero di campioni per ogni punto era spesso sufficiente (tra 12 e 26) a permettere una prima valutazione, dato che è previsto un numero minimo di 16 campioni (suddivisi tra 3 o 4 stagioni). Quindi, abbiamo effettuato questa classificazione sull’intero data set di analisi sperimentali, differenziando i 2

¹² M.F. = metodi a membrane filtranti (UFC/100ml); 9308-3= metodo miniaturizzato (MPN/100ml)

¹³ per la classificazione è stato considerato il valore proposto dalla nuova direttiva

metodi per EC e confrontandolo con quanto risulterebbe da una classificazione sui parametri attuali.

Le classi sono state così definite (vedi tabella sotto), prendendo in considerazione solo quelle stabilite dalla prima versione di proposta, cioè senza la classe “sufficiente”, introdotta a giugno 2004:

Classe	COM(2002)581		76/160/CEE	
	Parametro	95° %ile	Parametro	95° %ile
Elevata	<i>Escherichia coli</i>	≤ 250	Coliformi fecali	≤ 100
	Enterococchi intestinali	≤ 100	Streptococchi fecali	≤ 100
Buona	<i>Escherichia coli</i>	≤ 500	Coliformi fecali	≤ 2'000
	Enterococchi intestinali	≤ 200	Streptococchi fecali	≤ 200
Scarsa ¹⁴	<i>Escherichia coli</i>	> 500	Coliformi fecali	> 2'000
	Enterococchi int.	> 200	Streptococchi fecali	> 200

Analizzando il risultato generale, cioè il numero di aree omogenee che ricadono in una o l'altra classe (Figura 6), si evidenzia una qualità sostanzialmente “elevata” secondo tutti i diversi sistemi di classificazione, con una percentuale oscillante tra 85 e 98%. Il dato peggiore mostrato dalla classificazione con EC in MPN, in realtà, è falsato dai dati fortemente “anomali” del 2003 (qui considerati): se si utilizzassero solo i dati del 2004 la percentuale salirebbe ad oltre il 90%, rimanendo sempre e comunque inferiore a quella con EC UFC. Le differenze tra i 2 metodi, quindi, hanno una forte influenza anche sulla classificazione, facendo aumentare sensibilmente il numero di aree omogenee in classe “scarsa”, a conferma di quanto visto nel 2003.

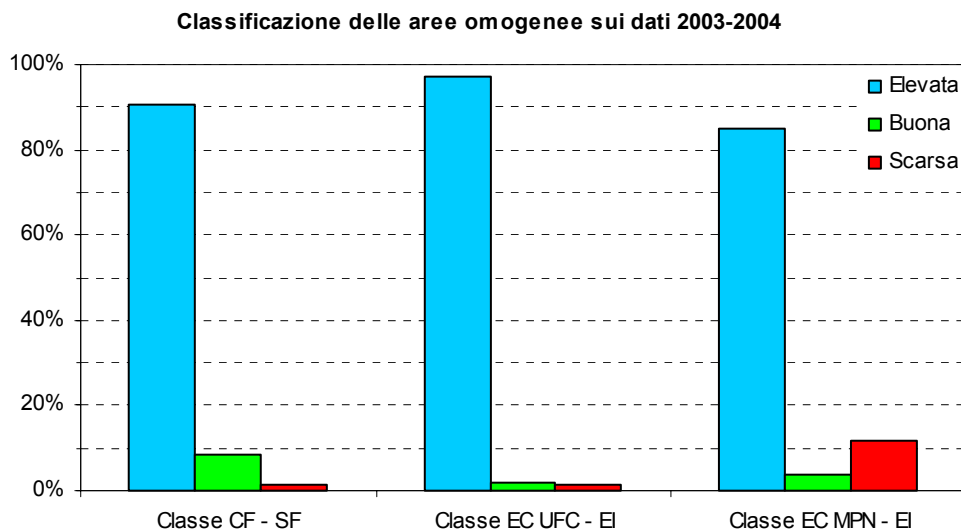


Figura 6 – distribuzione nelle diverse classi delle aree omogenee sulla base del 95° %ile dei dati 2003-04

¹⁴ mentre nelle prime 2 classi (elevata e buona) è necessario che entrambe le condizioni siano soddisfatte, per la classe “scarsa” è sufficiente che uno dei due parametri sia superiore ai limiti

Resta, invece, confermato il netto divario tra la classificazione basata sui parametri e sui limiti attuali e quella della proposta di direttiva, dovuto sia al diverso significato degli indicatori di contaminazione sia ai limiti proposti, ma sembra influire soprattutto su una ridistribuzione tra classe “buona” ed “elevata”, lasciando solo l’1% in classe “scarsa”.

6 CONCLUSIONI GENERALI

Gli Enterococchi intestinali possono tranquillamente sostituire gli attuali Streptococchi Fecali (sono praticamente gli stessi gruppi batterici) per le acque marine senza che questo influisca né sulla classificazione (proposta) né sulla significatività. La metodica utilizzata non ha presentato alcun problema e la relazione tra parametro attuale e proposto è stata sempre ben evidente, sia dal punto di vista delle variazioni spaziali che temporali (qualora ve ne fossero), dimostrando un’assenza di differenze significative.

Tra Coliformi Fecali ed *Escherichia coli* le cose stanno diversamente, sia per una maggior differenza nella composizione specifica sia in base alle metodiche utilizzate, specialmente se basate su diversi principi (terreni selettivi o reazioni enzimatiche). Il problema dei falsi positivi e l’ipotesi di interferenza con altri organismi marini autoctoni hanno portato ad una maggior variabilità delle concentrazioni batteriche. La variazione di condizioni locali e stagionali sembra poter influire in modo significativo su questo parametro, alterandone i risultati, anche al di là dell’indicazione di contaminazione fecale.

Non possiamo affermare con certezza, sulla base dei nostri dati, a quale tipologia di organismi planctonici si riferisca questa interferenza, potendo appartenere sia alla componente eterotrofa (batteri) che autotrofa (fitoplancton), né se si tratti di poche specie o di più vasti raggruppamenti. Di fatto, è stato evidenziato che queste “altre” popolazioni microbiche possiedono lo stesso enzima (β -glucuronidasi) posseduto dall’*E. coli* e riescono a crescere bene anche su un terreno teoricamente selettivo per Gram negativi, quale quello del metodo ISO 9308-3, e in alcuni casi sono stati isolati ceppi di Stafilococchi con queste stesse caratteristiche.

La possibilità di avere questo tipo di interferenze rende problematico l’utilizzo del metodo UNI EN ISO 9308-3:1998 per la classificazione delle nostre acque di balneazione: molto più idoneo sembra essere il metodo IRSA CNR ISSN: 1125-2464 Metodo F. Infatti, i risultati hanno dimostrato che, quando non ci sono discrepanze con le concentrazioni dei Coliformi fecali, i due metodi sono perfettamente sovrapponibili, mentre quando queste si evidenziano il metodo IRSA CNR ha dato i risultati attesi.

Il fatto, quindi, che gli Enterococchi intestinali mostrino una relazione significativa con gli Streptococchi ed una certa corrispondenza di questi ultimi con i Coliformi fecali, sembrerebbe indicare una maggior possibilità di questo nuovo parametro nel sostituire, per significatività complessiva e specifica, gli indicatori di contaminazione microbiologica attualmente in uso, lasciando al parametro *E. coli* un ruolo interpretativo accessorio. Queste considerazioni, però, al momento si scontrano con quanto previsto nella proposta di direttiva, dove i due indicatori vengono valutati in modo identico per tutte le acque, per quanto le stesse indicazioni di tutela della salute dell’OMS fossero riferite alle acque interne e solo per gli enterococchi alle marine.

