


REGIONE
TOSCANA



ARPAT



**STUDIO SPERIMENTALE SULLA NUOVA DIRETTIVA
EUROPEA PER LE ACQUE DI BALNEAZIONE**



... Nell'aria bianca abitava una freschezza
che metteva dei brividi piacevoli nel sangue;
tutta la spiaggia era nascosta da' vapori.
A un tratto un raggio forò la nebbia, come
una saetta d'oro di un dio, poi altri raggi, un
fascio di luce; e là filoni di scarlatto, chiazze
di viola, falde tramontanti di roseo, schiocchi
scialbi di arancio, svolazzi di azzurro si fon-
devano in una stupenda sinfonia di colore.
I vapori, come spazzati da una folata di vento,
sparirono; e il sole folgorò, pari a un grande
occhio sanguigno, sul mare paonazzo da'
largi e placidi ondeggiamenti. Folate di gab-
biani gittavan gridi che parevano scrosci di
risa umane, radendo l'acqua col cenerino
chiaro del loro volo...

da *Terra vergine*
di Gabriele D'Annunzio

**STUDIO SPERIMENTALE
SULLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA
PER LE ACQUE DI BALNEAZIONE**

**EXPERIMENTAL STUDY ON THE NEW
EUROPEAN BATHING
WATER DIRECTIVE**



A cura di:

Marisa Iozzelli & Antonio Melley

**STUDIO SPERIMENTALE SULLA NUOVA DIRETTIVA EUROPEA PER LE
ACQUE DI BALNEAZIONE**

Experimental Study on the New European Bathing Water Directive

A cura di / Edited by:

Marisa Iozzelli e Antonio Melley

Autori / Authors:

Marisa **Iozzelli**, (*Regione Toscana*)

Gioia **Benedettini**, Antonio **Melley** (*ARPAT*)

Hanno collaborato / In collaboration with:

Gilberto Baldaccini, Antonio Benelli, Andrea Bernini, Bruno Borghini, Mario Bucci,
Fabio Gambassi, Gastone Ferri, Ivano Gartner, Giulietta Luchetti, Paolo Righini, Giuseppe Sansoni, Giancarlo Sbrilli, Luigi Spadafina (*ARPAT*)

Paolo Matina (*Regione Toscana*)

Realizzazione editoriale: Edifir - Edizioni Firenze

Finito di stampare nel mese di marzo 2004

In copertina:

Anna Romano, *Paesaggio di Toscana*, tempera grassa, 1975

INDICE - Contents

1. Introduzione

Introduction

pag. 5

1.1. La revisione della direttiva europea

« 8

The Revision of the European Directive

2. Il “Protocollo Balneazione 2000”

« 10

The “2000 Bathing Protocol”

2.1 Lo schema sperimentale

« 11

The experimental plan

2.2 I principali risultati

« 14

Main results

3. La proposta di nuova direttiva

« 16

The Proposal of a New Directive

4. La sperimentazione del 2003

« 21

The 2003 Experimentation

4.1 Gli obiettivi

« 21

Goals

4.2 Materiali e metodi

« 23

Materials and methods

4.2.1 Il campionamento

« 23

Sampling

4.2.2 La scelta delle metodiche analitiche

« 25

Analytical Methods

4.2.3 Il metodo UNI EN ISO 9308-3

« 28

The UNI EN ISO 9308-3 Method

4.2.4 Il personale impiegato

« 31

Staff employed

4.3 Risultati

« 32

Results

4.3.1 Il confronto tra i metodi per EC

« 33

Comparison of the methods used for the determination of EC

4.3.2 Il confronto tra i parametri

« 34

Comparison of parameters

4.3.3 Le variazioni spazio-temporali

« 37

Space-time variations

4.3.4 I dati non attesi di *Escherichia coli*

« 42

The unexpected data found for Escherichia coli

4.4 La qualità delle acque di balneazione	«	52
<i>The quality of bathing water</i>		
4.4.1 Confronto coefficienti 2000-2003	«	52
<i>Comparison of the 2000-2003 coefficients</i>		
4.4.2 Recupero dati storici	«	56
<i>Recovery of historical data</i>		
4.4.3 Il 95° percentile	«	59
<i>The 95° percentile</i>		
4.4.4. La classificazione	«	60
<i>Classification</i>		
4.5 Conclusioni	«	62
<i>Conclusions</i>		
4.5.1 Confronto tra i parametri, attuali e proposti	«	62
<i>Comparison between the current and proposed parameters</i>		
4.5.2 Classificazione e conformità	«	64
<i>Classification and conformity</i>		
5. Gli approfondimenti del progetto sperimentale	«	67
<i>Improvements of the experimental project</i>		
6 Riferimenti normativi	«	75
6.1 Comunitari	«	75
6.2 Nazionali e regionali	«	75
7 Bibliografia	«	77



1. INTRODUZIONE

1. INTRODUCTION

In applicazione alla Direttiva Europea 76/160, la normativa italiana, il DPR 470/82, stabilisce che il giudizio di idoneità alla balneazione venga espresso in base alla conformità a valori-limite di una serie di parametri microbiologici e chimico-fisici.

Sulla base delle attuali normative, di fondamentale importanza è la fase di controllo analitico delle acque che, in particolare mediante la determinazione delle caratteristiche microbiologiche, è stata finora ritenuta in grado di fornire indicazioni sulla potenziale presenza di microrganismi patogeni e, quindi, in grado di segnalare il rischio per la salute dei bagnanti.

Per verificare la qualità microbiologica delle acque di balneazione, le norme, attualmente, prevedono la determinazione di parametri indicatori di contaminazione fecale e, per il giudizio di conformità, la rispondenza ai valori limite stabiliti. Tuttavia alla luce delle attuali conoscenze, le limitazioni di questo tipo di approccio appaiono evidenti.

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

The Italian law DPR 470/82, which acknowledges the European Directive 76/160, states that suitability for bathing should be determined on the basis of the compliance with the threshold values of a set of microbiological and physical-chemical parameters.

Current laws place a strong emphasis on the analytical control of water and in particular on the determination of the microbiological characteristics, which have so far provided details on the potential presence of pathogenic microorganisms and therefore also on the potential hazards for bathers.

The microbiological quality of water is currently assessed by determining the parameters indicative of fecal contamination, whereas its safety is evaluated on the basis of its compliance with threshold values. However, current knowledge has proved that this approach is limited.

The experience gained over the last years in the control of health risks related to bathing water has shown that the adoption of criteria based solely on the analytical evaluation of the quality of water does not provide complete information on the risks of exposure. The variety of factors typical of water and the link between the recreational use of the areas exploited for bathing and specific pathologies render the interpretation of the data of monitoring surveys.

Anche per quanto riguarda i parametri dell'attuale normativa, viene ormai riconosciuto dalla comunità scientifica che alcuni di essi sono poco significativi per la valutazione della qualità delle acque e per la previsione del rischio, e i metodi analitici, spesso diversi da Paese a Paese, non permettono di ottenere risultati completamente comparabili.

Le caratteristiche di variabilità temporale e spaziale, tipiche dell'ambiente acquatico, e in particolare dell'ambiente marino, possono avere come conseguenza la formulazione di valutazioni e giudizi non conformi alle reali condizioni ambientali, penalizzando quindi aree che risulterebbero idonee alla balneazione per gran parte della stagione balneare, rispetto invece ad altre che, contrariamente, sarebbero insalubri in gran parte delle occasioni.

Bisogna, infatti, considerare che gli elementi che intervengono a condizionare la qualità delle acque marine lungo le coste possono essere numerosi e nessuno, singolarmente, risulta determinante per definirne la qualità. Infatti, tutti quei parametri che sono funzione della pressione antropica, derivanti dall'uso del territorio, possono assumere una forte rilevanza.

Quindi l'urbanizzazione, la presenza di fonti potenziali di contaminazione legata ad attività industriali, agricole e zootecniche, l'immissione nei corpi idrici recettori e in mare di fonti puntiformi di contaminazione (fiumi, torrenti e scarichi diretti) e non puntiformi, nonché la presenza di impianti di trattamento delle acque reflue e il grado e la tipologia di trattamento che esse subiscono, ma anche la configurazione fisica dell'area, il clima, le caratteristiche idro-geologiche e meteo-marine (li-

As for as the parameters defined in current laws, the scientific community has now determined that some of these are not sufficiently significant to assess the quality of water and provide indications on potential hazards. The variety of analytical methods adopted in different countries do not offer comparable results.

The variability in time and space, typical of the water environment and in particular of the marine environment, sometimes leads to the formulation of evaluations and assessments that do not correspond to the actual environmental conditions, to the disadvantage of areas that could be suitable for bathing during most of the bathing season if compared to other that, contrarily, are usually unhealthy.

This is because the elements that condition the quality of sea water along coasts are numerous, though none of them alone is significant to define its quality. All parameters related to anthropic pressure, derived by the use of territory, may instead acquire a great importance.

Therefore, urbanization, the presence of potential sources of contamination originating from industrial, agricultural and zootechnical activities, the introduction of punctiform (rivers, streams and direct outlets) and non punctiform sources of contamination into water receptor bodies and into the sea, as well as the presence of plants for the treatment of flowing water; the degree and type of treatment, but also the physical configuration of the area, the climate, the hydro-geological and characteristics of the sea (tide levels, direction of winds and streams, wave motion), weather and

velli di marea, direzione dei venti e delle correnti, moto ondoso), gli eventi meteorologici e tutti quegli elementi biotici e abiotici che caratterizzano un ecosistema possono influenzare e contribuire alle modifiche e/o al deterioramento della qualità igienico-sanitaria e ambientale delle acque [1].

Da queste osservazioni e coerente con le nuove conoscenze tecnico-scientifiche, negli ultimi anni, è andata quindi maturando una filosofia olistica che, basandosi su principi di programmazione e gestione integrata delle risorse, ha permesso di elaborare nuovi criteri di controllo e valutazione dei rischi per la salute che, basati sull'acquisizione della conoscenza di tutti i fattori che possono influenzare le condizioni ambientali nelle aree di balneazione, possono permettere di effettuare una coerente previsione del rischio per la salute e, come conseguenza, l'elaborazione e la pianificazione di programmi di risanamento delle aree critiche.

Poiché non esiste una formula gestionale universalmente applicabile alla previsione del rischio per la salute, tutti gli elementi e i parametri utili nei programmi di controllo e di prevenzione devono quindi considerare, non solo l'influenza di tutti quei fattori ambientali specifici che caratterizzano un dato ambiente o territorio, ma anche gli aspetti sociali, economici, culturali e tecnici.

La conoscenza dei diversi fattori, delle caratteristiche e specificità del territorio, capaci di avere effetto sulla qualità dell'ambiente e di concorrere alla variabilità delle condizioni ambientali, può permettere di promuovere il miglioramento progressivo ai fini della predisposizione delle più appropriate misure di prevenzione e tutela della salute pubblica.

all those biotic and abiotic elements that describe the ecosystem may influence and contribute to the alteration and/or deterioration of the hygienic, health and environmental quality of water [1].

These considerations and the availability of new technical and scientific data has led to the development of an holistic philosophy based on the need of planning and managing resources in an integrated form, which in turn has enabled to formulate new criteria for the control and assessment of health-related risks. The knowledge of the factors that may influence environmental conditions in bathing areas enables in fact to coherently predict health risks and consequently draw and plan programs to reclaim critical areas.

As there is no universal management formula to foresee health-related risks, all the elements and parameters that could prove useful in prevention and control programs should take into account not only the influence of environmental factors, typical of a specific environment or territory, but also the social, economic, cultural and technical aspects.

The analysis of the factors, characteristics and specific nature of the territory, which can influence the quality of the environment and contribute to the variability of its conditions, offers the opportunity of supporting a progressive improvement and of adopting more suitable measures to prevent and protect public health.

1.1. LA REVISIONE DELLA DIRETTIVA EUROPEA

Grazie all'attuazione della direttiva sulle acque di balneazione del 1976 (76/160/CEE), la qualità delle acque di balneazione in Europa è aumentata in maniera evidente, raggiungendo livelli di conformità estremamente elevati (oltre il 95% per le acque marine e superiori al 90% per le acque interne), probabilmente prossimi ai limiti del realizzabile, con questa impostazione.

Nel corso degli anni la direttiva è stata oggetto di critiche sempre maggiori dettate da considerazioni di ordine tecnologico, scientifico e gestionale, e sulla base di tutte queste osservazioni ed altre ancora, fin dal 1994, la Commissione Europea ha iniziato un processo di revisione ed aggiornamento della direttiva sulle acque di balneazione.

Inoltre, con l'emanazione della direttiva quadro sulle acque (2000/60/CEE), che ha introdotto un nuovo approccio nella gestione e nella tutela degli ecosistemi acquatici, si è tentato di riunire in un unico testo tutte le normative ambientali comunitarie riguardanti le acque e di fare in modo che tutte le altre direttive sulle acque (nitrati, potabili, ecc.) devono essere attuate in maniera coerente.

Alla luce dell'approccio combinato introdotto dalla direttiva quadro sulle acque e dei progressi realizzati a livello scientifico, tecnologico e gestionale per quanto riguarda la qualità delle acque, la Commissione, alla fine del 2000, ha presentato una comunicazione relativa ad "Una nuova politica per le acque di balneazione" (COM(2000)860 def.), prima fondamentale tappa nel tentativo di aggiornamento della direttiva.

1.1 THE REVISION OF THE EUROPEAN DIRECTIVE

The implementation of the European Directive concerning bathing water dated 1976 (76/160/ECC) has substantially improved the quality of bathing water in Europe, which has now reached high levels of conformity (above 95% for sea water and above 90% for freshwater), probably the highest attainable with the provisions defined.

Technological, scientific and management issues have unveiled, in the years, the shortcomings of this Directive to the point of convincing the European Commission of the need, in 1994, of reviewing and updating it.

Furthermore, the introduction of the Water Framework Directive (2000/60/ECC), which introduces a new approach in the management and protection of water ecosystems, also represented an attempt of grouping in a single text all the community laws on water and of ensuring the correct implementation of subsequent directives concerning the matter (nitrates, drinking water, etc.).

Following the combined approach, introduced with the new Water Framework Directive, and the scientific and technological improvements in terms of water management, at the end of 2000 the Commission decided to publish a communication – "A new policy for bathing water" (COM (2000) 860 fin), which represents the first important attempt of updating the directive.

In questo documento vengono enunciati i principi ispiratori che staranno alla base anche delle successive fasi di revisione e che così venivano riassunti:

1. *gli standard di qualità delle acque sono elementi indispensabili e devono essere ambiziosi e giuridicamente vincolanti*: non è possibile garantire l'assenza assoluta di rischi, ma riducendo al minimo l'impatto delle attività umane e gli apporti inquinanti in una zona di balneazione è possibile limitare l'impatto di episodi di inquinamento imprevisti;
2. *la gestione della qualità delle acque di balneazione non è solo una questione di controllo della qualità*: è necessario conoscere a fondo tutti i processi che non solo avvengono in una zona di balneazione o nelle sue vicinanze, ma anche in tutto il bacino di riferimento, in termini di utilizzo del territorio, di scarichi a monte e di altri fattori, integrando i piani di gestione previsti dalla direttiva quadro sulle acque;
3. *è necessario disporre di informazioni di buona qualità sulle zone di balneazione*, per i cittadini che devono poter fare scelte informate e per le autorità competenti per adottare decisioni di lungo termine sulla gestione della qualità delle acque.

This document describes the main principles that would later be used for the following revision steps, which can be summarized as follows.

1. Water quality standards are essential and must therefore be severe and legally mandatory. *The reduction to the minimum of the impact of human activities and of pollution in bathing areas does not eliminate risks, but can be helpful in limiting the impact of unforeseen pollution.*
2. The control of the quality of bathing water is not just a matter of water control. *A correct management of quality requires the availability of detailed data on all the processes that occur not only in the bathing area or nearby, but also in the reference basin. Said data include the use of the territory, upstream drains and other factors and the integration of the management plans referred to in the directives.*
3. It is absolutely essential to have reliable data *on bathing areas to allow citizens to take informed decisions and competent authorities to adopt long-term decisions concerning the management of the quality of water.*



2. IL “PROTOCOLLO BALNEAZIONE 2000”

2. “THE 2000 BATHING PROTOCOL”

Alcune delle considerazioni presenti nella comunicazione della Commissione, soprattutto sulla valutazione di parametri, metodi e costi, furono basate su alcuni studi specifici condotti tra il 1999 ed il 2000 in varie parti d’Europa.

Una di queste sperimentazioni ha visto il coinvolgimento anche dell’Italia come caso studio e le attività inerenti furono coordinate dall’Istituto Superiore di Sanità, per conto del Ministero della Sanità di allora. Tale sperimentazione, denominata “Protocollo Balneazione 2000”, seguì le indicazioni del Comitato per le acque di balneazione della CE (riunione del 28/10/99) e quanto emerso da precedenti studi di Francia, Olanda ed Inghilterra, con un protocollo predisposto dall’Organizzazione Mondiale della Sanità.

Alla sua applicazione sperimentale hanno partecipato, durante la stagione balneare 2000, tre Regioni italiane, Emilia Romagna, Marche e Toscana, avvalendosi dei Laboratori delle Agenzie Regionali per la Protezione dell’Ambiente competenti sulle aree prescelte.

Il protocollo di indagine per le diverse aree costiere considerate è stato sviluppato in fasi diverse, ma contemporanee secondo lo schema presentato di seguito:

- descrizione dell’area di balneazione sulla base di dati sulla località, tipo di acqua, caratteristiche territoriali e geografiche con cartografia dell’area, ecc.;

Some of the considerations mentioned in the communication of the Commission, especially those concerning the evaluation of parameters, methods and costs, were based on specific studies carried out between 1999 and 2000 in different parts of Europe.

One of these experimentations involved also Italy as case of study, where the relevant activities were managed by the Institute of Health, on behalf of the Ministry of Health. The experimentation, known as “The 2000 Bathing Protocol”, was based on the recommendations of the Committee for bathing water of the European Commission (meeting of 28/10/99) and on the results of the previous studies carried out in France, Holland and England, according to a protocol set forth by the World Health Organization.

Its experimental application during the bathing season 2000 involved three Italian Regions – Emilia Romagna, Marche and Tuscany –. Along with the Workshops of the Regional Agencies for the Protection of the Environment competent for the selected areas.

The research protocol for the selected coastal areas was developed in different stages, but simultaneously according to the following plan:

- *Description of the bathing area: details of the location, type of water, territorial and geographical characteristics with a map of the area, etc.;*

- raccolta di dati sulla qualità igienico-sanitaria dell'acqua derivati dai risultati delle campagne effettuate, secondo la normativa vigente (DPR 470/82) negli ultimi 5 anni dai laboratori preposti al controllo;
 - raccolta di informazioni sulle fonti potenziali di contaminazione delle acque (uso del territorio, presenza di scarichi trattati e/o non trattati, concentrazione microbica negli scarichi, ecc.);
 - monitoraggio della qualità dell'acqua tramite analisi microbiologiche (20 campioni per ogni punto di prelievo prescelto) svolto nell'arco di circa un mese.
- *Acquisition of data concerning the hygienic-sanitary quality of water originating from surveys carried out in the last 5 years by competent laboratories, in compliance with current laws (DPR 470/82);*
 - *Acquisition of information on potential sources of contamination of water (use of the territory, presence of treated and/or no treated drains, microbial concentration in drains, etc.);*
 - *Monitoring of the quality of water through microbiological analysis (20 samples for every place of taking chosen) effected within one month about.*

Successivamente, in funzione della verifica del livello di contaminazione delle acque, delle infrastrutture rilevate sul territorio e delle eventuali fonti di contaminazione individuate, le aree sono state classificate e sono stati determinati, quando necessari, i tipi più appropriati di intervento per migliorare la qualità delle acque e delle aree costiere indagate, al fine di minimizzare il rischio per la salute dei bagnanti e migliorare la qualità ambientale.

After assessing the level of contamination of water, the infrastructures of the territory and the potential sources of contamination, the areas were classified and the most appropriate measures, when necessary, to improve the quality of water and of the coastal areas selected were determined, in order to limit the risk for the health of bathers and improve environmental quality.

2.1 LO SCHEMA SPERIMENTALE

Le zone costiere interessate dall'indagine sono state selezionate sulla base della qualità delle acque di balneazione, individuando 5 siti per ciascuna regione (15 in totale) rappresentativi di condizioni di qualità delle acque "buona", "intermedia" e "scarsa", come definite dal Rapporto della Commissione Europea.

I controlli della qualità dell'acqua hanno previsto lo svolgimento di 20 campionamenti per ciascun sito di prelievo e per ogni cam-

2.1 THE EXPERIMENTAL PLAN

The coastal areas examined during the survey were selected on the base of the quality of their bathing water; 5 sites for each region (15 in total), representative of the "good", "intermediate" and "poor" water quality were chosen as recommended in the Report of the European Commission.

The quality of water was assessed by testing 20 samples for each site; the microbiological parameters for the total

pione sono stati determinati i parametri microbiologici Coliformi totali, Coliformi fecali, streptococchi fecali, *Escherichia coli*, enterococchi intestinali.

Questi ultimi due sono quelli più indicati per sostituire i parametri attuali (presenti sia nella Comunicazione del 2000 che, come vedremo, nella proposta del 2002), in quanto più validi e specifici indicatori di contaminazione fecale e in grado di segnalare, in misura più appropriata, l'esposizione a condizioni di rischio.

I prelievi dei campioni sono stati effettuati sulla base di un Codice di Buona Pratica di Laboratorio stabilito sotto forma di linee guida per armonizzare le procedure di campionamento, trasporto e conservazione dei campioni.

I metodi analitici utilizzati per la ricerca dei Coliformi totali, Coliformi fecali, streptococchi fecali sono stati quelli indicati dalla normativa italiana sulle acque di balneazione (DPR 470/82), mentre per la determinazione dei parametri *Escherichia coli* ed enterococchi intestinali sono stati utilizzati i metodi standardizzati: ISO 9308-3 e ISO 7899-1, rispettivamente.

La valutazione dei requisiti igienico-sanitari delle acque, necessaria alla previsione del rischio sanitario e all'individuazione degli interventi di miglioramento della qualità dell'acqua da realizzare sul territorio, è stata effettuata in funzione di ciascuno dei tre diversi livelli di qualità stabiliti e basati su valori limite sempre più rigorosi, considerando, in parallelo, tutte le caratteristiche specifiche di ciascuna area considerata.

I 5 punti oggetto di studio per la Regione Toscana sono stati scelti all'interno dei confini amministrativi dei Comuni di S. Vincen-

amount of Coliforms, faecal Coliforms, faecal streptococci, Escherichia coli and intestinal enterococci were determined for each sample.

The latter two parameters are those that can more suitably replace current parameters (mentioned in the Communication dated 2000 as well as in the proposal dated 2002), since they provide a more specific indication of faecal contamination and therefore of potential risk.

Samples were collected according with the Good Laboratory Practice established as guidance to harmonize the sampling, transport and preservation procedures of the samples.

The analytical methods used for the determination of the total amount of Coliforms, the faecal Coliforms, faecal streptococci were those referred to in the Italian laws concerning bathing water (DPR 470/82), while Escherichia coli and intestinal enterococci were determined using standard methods: ISO 9308-3 and ISO 7899-1, respectively.

The hygienic-sanitary requirements of water, essential to be able to determine health risks and decide the most appropriate improvement measures was evaluated taking into account each of the three different levels of quality, severe threshold values, and all the specific characteristics of the selected areas.

The 5 sites examined in Tuscany were located within the administrative boundaries of the Municipalities of S. Vincenzo and Piombino (both in the province of Livorno) as they were representative of the

zo e Piombino (entrambi in provincia di Livorno) e rappresentativi di qualità delle acque "buona", "intermedia" e "scarsa":

- 137 Calamoresca (Piombino): qualità buona
- 123 Punta sud in (S.Vincenzo): qualità intermedia
- 134 La Torraccia (S.Vincenzo): qualità buona
- 398 Botro dei Marmi sud (S.Vincenzo): qualità scarsa
- 399 Botro dei Marmi nord (S.Vincenzo): qualità scarsa

"good", "intermediate" and "poor" water quality":

- 137 Calamoresca (Piombino): good quality
- 123 Punta Sud (S. Vincenzo): intermediate quality
- 134 La Torraccia (S. Vincenzo): good quality
- 398 Botro dei Marmi south (S. Vincenzo): poor quality
- 399 Botro dei Marmi north (S. Vincenzo): poor quality

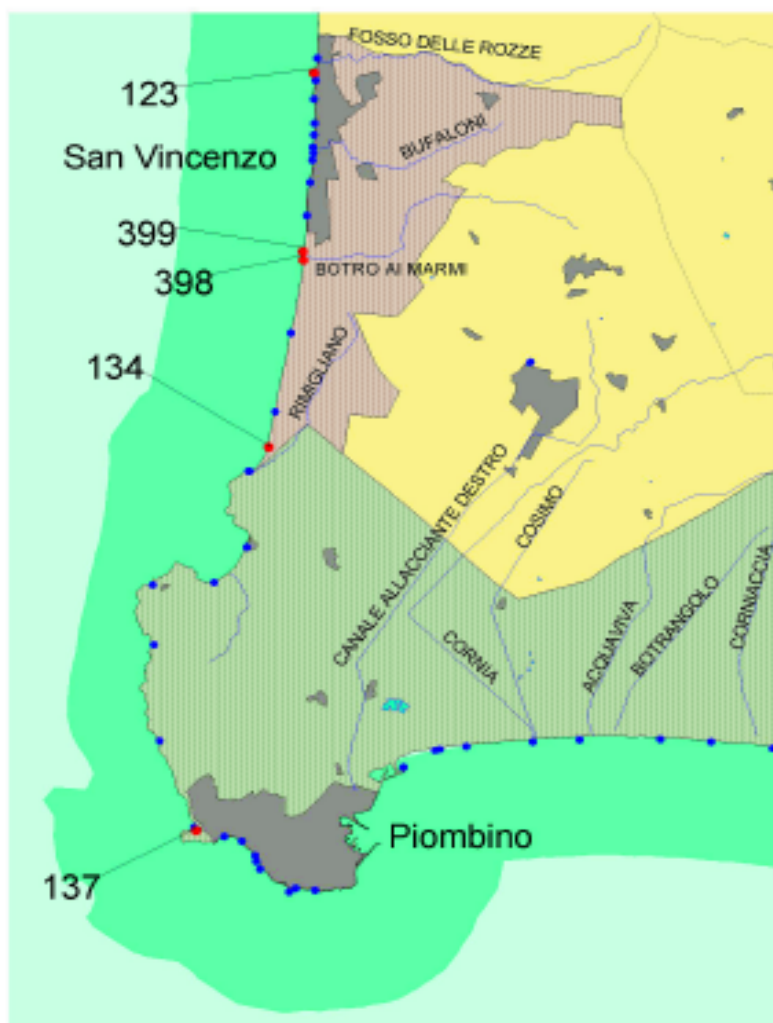


Figura 1

I punti di controllo della sperimentazione 2000 in Toscana.

Survey sites chosen for the experimentation carried out in 2000 in Tuscany.

Per ciascuno dei siti di prelievo considerati sono state raccolte e fornite tutte le informazioni necessarie alla caratterizzazione delle

For every site of collection, detailed information was acquired in order to determine the characteristics of the

aree esaminate al fine di individuare il livello di rischio, i processi e le pressioni antropiche che entrano in gioco nella determinazione della qualità delle acque, verificando anche, sulla base delle determinazioni analitiche, l'osservanza degli standard proposti.

2.2 I PRINCIPALI RISULTATI

Lo specifico protocollo di indagine, attraverso lo studio dei territori interessati e unitamente ai dati analitici di controllo delle acque ricavati dalle campagne di monitoraggio pregresse e della stagione balneare 2000, se da una parte ha consentito di ottenere un quadro d'insieme, elaborato sulla base dei diversi elementi, delle diverse aree considerate e di individuare le potenziali fonti di contaminazione, dall'altra ha permesso di verificare la fattibilità e la congruenza della nuova metodologia di controllo e gestione delle acque di balneazione.

È stato, peraltro, riscontrato che, rispetto a quelle con caratteristiche di qualità “intermedia”, le aree di studio che si differenziavano per condizioni di qualità delle acque ben definite (“scarse” o “buone”), sono risultate più facilmente caratterizzabili. Infatti, in aree che si contraddistinguevano per una “buona” qualità delle acque, i risultati analitici, favorevoli, sono rimasti costanti nel tempo, anche in relazione ai controlli pregressi e in funzione degli elementi distintivi del territorio. D'altra parte, nelle aree con qualità “scarsa”, l'individuazione di fonti e cause di contaminazione è risultata immediata e l'elaborazione gli eventuali piani di risanamento delle aree critiche,

selected areas and the related levels of risk, the processes and the anthropic pressures which influenced the quality of water, along with the compliance of analytical results with the recommended standards.

2.2. MAIN RESULTS

The specific protocol of research, based on the study of the territories involved and on the analytical data resulting from the surveys carried out in previous years and in 2000, has offered the opportunity of gaining a general overview along with more specific knowledge on specific factors, on the areas examined and on potential sources of contamination, but has also enabled to verify the feasibility and suitability of the new control and monitoring methods proposed.

The research revealed that it was far easier to characterize areas with a specific quality of water (“poor” or “good”) rather than intermediate ones. In the areas with a good quality of water, analytical results continued to be good, even when compared to previous results and referred to the specific elements of the territory. In the specific case of areas characterized by a scarce quality of water, the research enabled instead to immediately identify the sources and causes of contamination and to consequently adopt effective reclaiming plans for the most critical areas.

quando necessaria, di più facile predisposizione e programmazione.

Lo studio condotto sulla base del nuovo approccio di valutazione delle aree adibite a balneazione rappresenta la prima applicazione in Italia dei principi sui quali è stata elaborata la futura Direttiva Europea sulla qualità delle acque di balneazione che, mediante l'interpretazione delle interrelazioni tra caratteristiche del territorio e determinazioni analitiche di un più ristretto numero di specifici parametri a carattere sanitario, potrà permettere di elaborare modelli più coerenti e significativi di previsione, valutazione e gestione del rischio associato alla balneazione.

Su questa stessa linea è stata formulata la Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE che rappresenta, senza dubbio, un passaggio decisivo nell'unificazione di tutte le normative ambientali di settore a livello europeo. Tuttavia, se i criteri stabiliti nella Direttiva Quadro sulle Acque permettono di valutare la qualità ambientale/ecologica in base a specifici standard, i principi per il controllo delle acque di balneazione devono, mantenendo una identità separata, costituire l'elemento trainante per la tutela ambientale ai fini della salute pubblica, e contemporaneamente, contribuire alla integrazione delle politiche in materia ambientale per l'attuazione mirata della Direttiva stessa.

The research carried out in accordance with the new approach for the assessment of bathing areas represents the first example of application of the new directive requirements in Italy. More specifically the research shows that a correct interpretation of the characteristics of the territory in combination with a smaller number of analytical parameters offers the opportunity of developing more suitable and significant models for the estimate, evaluation and management of risks associated to bathing. The Water Framework Directive 2000/60/ECC, which follows this guideline, undoubtedly represents a significant attempt of standardizing all the European environmental laws. However, while the criteria of the Water Framework Directive will offer the means for evaluating the environmental/ecological quality on the basis of specific standards, the principles for the monitoring of bathing water should maintain a separate role, and become therefore the leading element to safeguard the environment and public health, and to contribute, at the same time, to the integration of the environmental policies required to support the implementation of the directive itself.



3. LA PROPOSTA DI NUOVA DIRETTIVA

3. THE PROPOSAL OF A NEW DIRECTIVE

Durante il convegno “Le acque di Balneazione”, tenutosi a Lido di Camaiore l’11 ottobre 2002, che ha visto la partecipazione di rappresentanti delle Regioni, del Ministero della Salute, dell’ISS, dell’APAT, dell’ARPAT e di altre Agenzie, il rappresentante della Commissione europea ha illustrato [2] le ultime novità sulla prossima direttiva sulle acque di balneazione, stimolando un intenso dibattito. Sulla base di queste informazioni è incominciato un confronto tra Regione Toscana ed ARPAT per valutare le prospettive di lavoro, i cambiamenti e le azioni che si possono attivare per essere preparati all’emanazione della nuova normativa.

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), direttiva che prevede un approccio innovativo e conforme alle più recenti politiche di programmazione e gestione delle risorse ambientali nell’ambito di quanto proposto dall’OMS e congruente alle disposizioni inserite nella Direttiva Quadro sulle acque.

In questo documento, recependo i suggerimenti dell’OMS, vengono introdotti 2 nuovi parametri microbiologici, enterococchi intestinali (EI) ed *Escherichia coli* (EC), considerati più sensibili e significativi per valutare il rischio per la salute pubblica durante l’attività di balneazione e gli altri usi ricreativi della risorsa idrica (surf, windsurfing, kayaking). Infatti, nella relazione introduttiva alla proposta vera e propria, la Commissio-

The convention “Bathing Water”, held at Lido di Camaiore on 11th October 2002, with the participation of the representatives of the Regions, the Ministry of Health, ISS, APAT, ARPAT and other Agencies, offered the representative of the European Commission to illustrate the new directive concerning bathing water and to stimulate a lively debate. The new guidelines have led the Region of Tuscany and ARPAT to evaluate potential work plans, implement changes and decide the actions required to ensure full compliance with the new directive.

On 24th of October 2002 the Commission for the Bathing Water of the European Community has presented the draft of the “European Parliament and Council Directive concerning the quality of bathing water” (COM(2002) 581 final). This directive outlines a new approach planning and management in compliance with the most recent policies of environmental resources, the WHO’s recommendations and the provisions of the water framework directive.

*This document, which acknowledges the recommendations of WHO introduces new microbiological parameters – intestinal enterococci (EI) and *Escherichia coli* (EC) – that are considered to be more sensible and significant for the evaluation of the risks for public health during the bathing and the other recreational uses of the water supplies (surfing, windsurfing, kayaking). In the introductory of the proposal report explains that the new parameters*

ne specifica di aver operato questa scelta sulla base di studi epidemiologici svolti in Germania¹, Francia² e Olanda³ e di uno specifico rapporto dell'OMS⁴ 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 (Figura 2).

have been chosen on the basis of the results of to epidemiological studies effected in Germany¹, France² and The Netherlands³ and following a specific report by WHO⁴, because these parameters “represent the best available correspondence between pollution of faecal origin and consequences for health in the water destined to recreational uses”.

Current italian laws (DPR470/82 and subsequent amendements) and the European (76/160/ECC) laws, establishe the suitability of bathing water according to 11 parameters, 4 of which microbiological origin (total Coliforms, faecal Coliforms, faecal streptococci and Salmonella).

Although all these parameters have the same importance for the determination of the conformity, they practically differ in terms of influence: in Italy about 90% of no conformity cases are related to bacteriological parameters only (Figure 2).

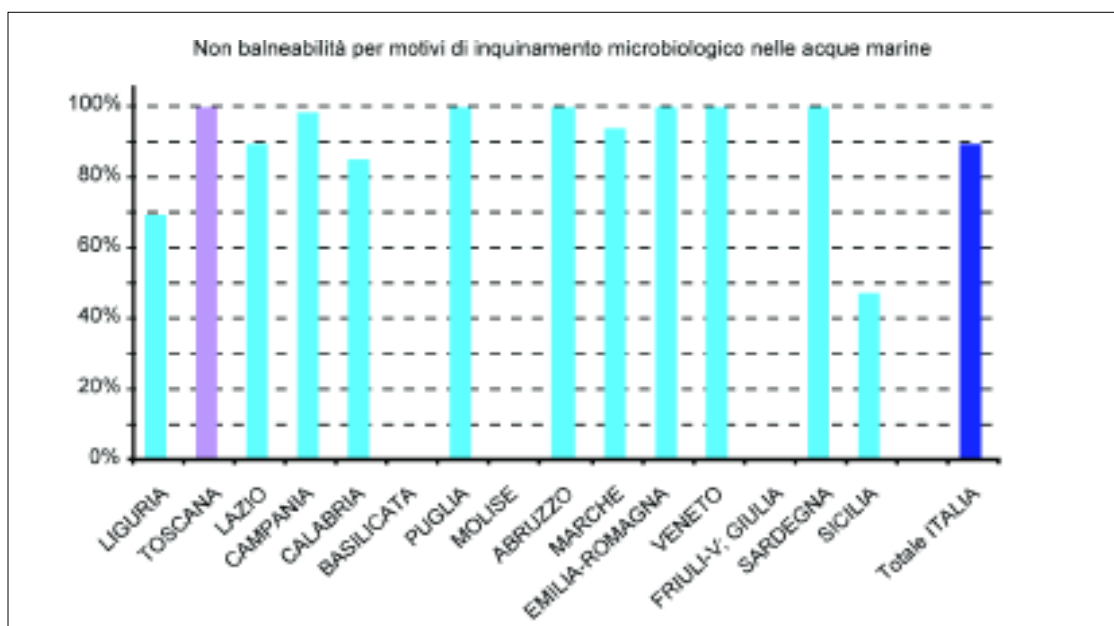


Figura 2

Campioni non conformi (%) per i parametri microbiologici sul totale di quelli analizzati per il controllo delle acque di balneazione nelle regioni costiere italiane (anno 2001)

Samples with not compliant microbiological parameters, as compared to the total parameters examined for the purpose of determining the suitability of bathing water along italian coasts.

¹ Istituto di igiene e di igiene ambientale dell'Università di Tubinga (Germania).

² Institut de Veille Sanitaire (Francia), 2001.

³ Istituto nazionale della salute pubblica e dell'ambiente (Paesi Bassi), 1997.

⁴ Organizzazione Mondiale della Sanità (rapporto Farnham), 2001.

¹ Institute of Health and of Environmental Health of the University of Tubingen (Germany).

² Institut de Veille Sanitaire (France), 2001.

³ National Health Public Institute and of the Environment (The Netherlands), 1997.

⁴ World Health Organization (Farnham report), 2001.

La nuova direttiva, invece, di fatto, sostituisce tutti quelli utilizzati finora con i soli 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 “eccellente”).

The new Directive, actually replaces all parameters used so far with the intestinal enterococci and Escherichia coli only, which are the only ones that can be used for compliance and classification purposes.

The first term (conformity) refers to the “mandatory” limits fixed by the WHO for the protection of the health of bathers (200 ufc/100ml for EI and 500 ufc/100ml for EC). Water can therefore be classified as compliant or non compliant.

The classification offers a general assessment of environmental quality of bathing water both when not compliant with (“poor quality”) or compliant (“good quality”). Non compliant water is divided into additional classes, depending on whether it meets the reference limits (100 ufc/100 ml for EI and 2500 ufc/100 ml for EC) in order to offer a higher protection (excellent quality).

Tabella 1

Confronto tra i parametri da controllare nelle acque di balneazione in base alla normativa in vigore ed alla proposta di nuova direttiva.

Comparison between the parameters used to assess the quality of bathing water, according to current Italian laws and the new proposed directive.

Parametri in vigore DPR 470/82 – 76/160/CEE	Parametri indicati dalla COM(2002)581.def
<p><u>TUTTI VALIDI PER CALCOLO CONFORMITÀ</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coliformi totali/100 ml¹. 2. Coliformi fecali/100 ml 3. Streptococchi fecali/100 ml 4. Salmonelle/l L⁵ 5. pH 6. Colorazione 7. Trasparenza m 8. Oli minerali mg/l 9. Sostanze tensioattive che reagiscono al blu di metilene mg/l (laurilsolfato) 10. Fenoli mg/l (C₆H₅OH) 11. Ossigeno disciolto % saturazione O₂ 	<p><u>VALIDI PER CALCOLO CONFORMITÀ</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Enterococchi intestinali (EI) in ufc/100 ml 2. Escherichia coli (EC) in ufc/100 ml <p><u>VALIDI PER VALUTAZIONE DI CONTAMINAZIONI E PER INTERVENTI DI RISANAMENTO</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Oli minerali 2. Residui bituminosi 3. pH⁶ 4. Materiale galleggiante come legname, plastica, vetro, gomma o altri rifiuti 5. Fioriture di fitoplancton o proliferazione di macroalghe⁷

⁵ La ricerca di salmonelle sarà effettuata quando, a giudizio della sanità di controllo, particolari situazioni facciano sospettare una loro eventuale presenza.

⁶ Il pH è previsto solo per le acque dolci.

⁷ Solo per i siti sensibili a specifiche fioriture di alghe (ad es. Dinophysis, Alexandrium, alghe blu).

⁵ *The presence of salmonella is investigated only if the health control authorities suspect potential sources of contamination.*

⁶ *pH is measured for freshwater only.*

⁷ *Only for sites sensitive to specific sea-weed flowering (for instance Dinophysis, Alexandrium, blue sea-weeds).*

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. Questo tipo di approccio alla gestione della balneazione è sicuramente innovativo in materia di normativa sanitaria, andando nella direzione di una valutazione complessiva dell'ambiente, intendendo con questo termine non solo le componenti fisiche, chimiche e biologiche degli ecosistemi, ma anche le attività umane (sia come fattori di pressione che come azioni mitigatorie e di risanamento) e la tutela della salute.

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 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 na-

The classification is not only a mere different “formal” expression, but consists in a set of time (frequency of collections, updating of information concerning the outline of the beach, etc.) and of management measures (arrangement of plans and measures to reduce/eliminate the pollution, determination of the causes and of the factors of risk, implementation of actions, information for citizens, etc.), which can be extremely “expensive” in economic, politic and social terms. This approach is undoubtedly innovative as compared to previous laws, as it takes into account the whole environment, meaning by this word not only the physical, chemical and biological components of the ecosystems, but also human activities (both as factors of pressure as well as actions of mitigation and reclaiming) and the protection of health.

All this means, that the proposal can be regarded as part of the general water framework directives (2000/60/EC; 91/271/ECC; 91/676/ECC), as it somehow coordinates their principles and explicitly refers to them (paragraph 8). What is even more important is the reference to the scope (Art. 1); the directive pursues in fact the aim “to preserve, to protect and to improve the quality of the environment and the human health protection” and to integrate “the scope and the provisions established by the directive 2000/60/EC” as stated in the opening of the subsequent paragraph.

The new directive (Enclosure II) actually lists other physical-chemical parameters which are in part present in current laws

tura fisico-chimica, alcuni già presenti nelle norme attuali (oli minerali e pH⁸), 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 imprevisti.

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».

(mineral oils and pH), or new (bituminous residues, tar; floating material), but are assigned an incidental role. These parameters are in fact not relevant in terms of conformity or classification, but can be used for specific researches and corrective actions (Art. 14 paragraph 2) in areas at risk of contamination or after unforeseen events.

The introduction of the concept of control of “flowering of phytoplankton and of the proliferation of macro sea weeds” is applicable only to those areas which are affected by these phenomena, and relevant only in terms of evaluation or for the purpose of determining specific actions (Art. 14 paragraph 1).

The same Commission points out (par. 4.4 of the introductory report), however, that “the drastic reduction of the selected parameters in the new directive on the bathing water shall significantly reduce costs and avoid duplications, while offering citizens the same degree of protection”.

⁸ Il pH è previsto solo per le acque dolci.

⁸ pH is measured for freshwater only.



4. LA SPERIMENTAZIONE DEL 2003

4. THE 2003 EXPERIMENTATION

4.1 GLI OBIETTIVI

Le principali novità, dal punto di vista della gestione della fascia costiera 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 del-

4.1 GOALS

The main novelty, from the point of view of coastline management and of bathing water controls, resides in the differences between the two systems of attribution of suitability (conformity) and the introduction of the concept of quality (class) in the ambit of health protection.

The reduction of the number of the basic parameters, the lack of information about the concentrations in our waters, the fact that the new microbiologic parameters and the relevant "mandatory" and "reference" limits are difficult to compare with the set of the present limits and parameters, whether microbiologic and of other nature, influence the reliability of forecasts on the quality of bathing water. Furthermore, the time range for the processing of data, which can extend from 1 to 3 years, and the new method of calculation (95° percentile) introduce a further variability in the evaluation of the impact of this directive on the Tuscan situation.

From the operative point of view, the classification involves selecting a frequency of the monitoring according to classes. Unlike today, where differences can consists in 12 or 6 season samplings, it may be possible to attain, in the best of cases (excellent quality), only 3-4 samples for a bathing season of 5 months, as applies to Italy. This condition, if present in a significant number of sites (as it is the case of the coast in Tuscany, in which already more than 75% of sites can rely on the reduction of sampling), could lead to a decrease of the

lo 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 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.

Quindi, dopo una preliminare fase di messa a punto, che ha visto lavorare insieme l'Area per la Tutela delle acque interne e costiere della Regione Toscana e le diverse strutture dell'Agenzia, il 14 marzo 2003 è stata stipulata una convenzione tra la Regione Toscana ed ARPAT per lo "Studio sperimentale sulla nuova direttiva europea per le acque di balneazione", con un finanziamento regionale di Euro 97.711,20, affidando ad ARPAT tutta la parte operativa.

Lo studio è stato focalizzato sull'utilizzo dei due nuovi parametri microbiologici proposti dalla direttiva europea, per vedere le relazioni possibili con quelli attualmente in uso, per ottimizzare le metodiche analitiche, valutando quelle emerse dalla proposta europea, e, infine, per capire come potrebbe modificarsi la situazione di balneabilità delle acque costiere.

effort and of the required resources for the control of bathing water, thus ensuring a higher efficiency and a more effective protection of the environment.

The Commission in the same proposal of directive, realizing that its enforcement could change in a substantial way the system of control and the situation of many bathing areas, has tried to meet with the requirements of the operators and the local administrations, simplifying the tasks and the use of resources, by introducing the possibility of anticipating the implementation of the directive at a national level (paragraph 3, Art. 7).

These considerations have led to the development of a pilot project aimed at experimenting the new directive, in parallel, with the ordinary control foreseen by DPR 470/82, in order to evaluate in Tuscany and in the control system adopted by the region.

Therefore, after a preliminary preparation stage, in which the Area for the Protection of the internal and coastal waters of the Region of Tuscany and the different structures of the Agency have worked together, on the March 14th 2003 a convention between the Region of Tuscany and Arpat for the "Experimental Study on the new European Bathing water Directive" was stipulated, with a regional financing of Euro 97,711,20, entrusting ARPAT with the whole operating side.

The study, focused on the use of the two new microbiological parameters proposed by the European directive, aimed at investigating the possible relations with those currently used parameters, in order to improve the analytical methods by evaluating those mentioned in the European proposal, and, finally, at understanding the influence of the new proposal on the bathing suitability of coastal water.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Il campionamento

Come stabilito dalla succitata convenzione e come specificato nel progetto operativo, i campionamenti sono stati svolti in concomitanza dei normali controlli “routinari” sulle acque marine di balneazione toscane, rispettando le modalità stabilite dalla vigente norma (DPR 470/82 e successive modifiche) e dalla possibilità di dimezzamento delle frequenze.

I prelievi hanno interessato tutti i punti identificati dalla Regione con delibera GR 225 del 10 marzo 2003, all. 2 tab. 8, per un totale di 364 punti nelle acque costiere e 2 nelle acque interne (Lago dell’Accesa e Laghetto Calidario), come riportato in tab. 1 dell’allegato. Inoltre, per poter dare una prima valutazione anche di situazioni particolarmente critiche o a rischio, sono stati effettuati alcune analisi in corrispondenza dei punti di controllo dei divieti permanenti di balneazione (tab. 2 dell’allegato) e nel caso di campioni suppletivi dovuti ad un inquinamento microbiologico particolarmente pronunciato (campioni contrassegnati con “S” nella tab. 3 dell’allegato).

Dal 1° aprile al 30 settembre 2003, che corrisponde all’intero periodo di attività dello studio, sono stati analizzati per lo studio sperimentale nelle aree di competenza dei 6 Dipartimenti/Servizi costieri:

- 2.753 campioni nei punti di controllo “routinario” ai sensi del DPR 470/82, su un totale di 2.773 prelievi effettuati (99%) nelle acque costiere toscane;

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 SAMPLING

As established in the above mentioned convention and specified in the operating project, samples here collected during the ordinary controls of sea bathing water in Tuscany, following the procedures set forth in current laws (DPR 470/82 and subsequent amendments) and taking into account the possibility of halving the frequencies.

Samples were collected in all the sites identified by the Region with resolution GR 225 dated 10th March 2003, encl. 2 tab. 8, for a total of 364 sites along the coast and 2 sites in inland waters (Lago dell’Accesa and Laghetto Calidario), as mentioned in tab. 1 of the enclosure. Furthermore, in order to be able to gain an initial evaluation even of extremely critical or risky situations, additional analysis were carried out close to the check points where bathing was forbidden (tab. 2 of the enclosure) and in presence of particularly severe cases of microbiological pollution (samples marked with “S” in tab. 3 of the enclosure).

From the April 1st up the September 30th 2003, which corresponds to the whole period of activity of the duration of the study, the experimental study carried out in the areas of competence of the 6 Departments/coastal Services analyzed the following:

- *2,753 samples in the routine check points in accordance with DPR 470/82, out of a total of 2,773 samples collected (99%) in the coastal waters of Tuscany;*
- *138 samples for the confirmation of the*

- 138 campioni prelevati per la conferma dei valori “fuori norma” (analisi suppletive) e la valutazione dell’idoneità alla balneazione (art. 6 DPR 470/82) su un totale di 190 analisi suppletive (73%);
- 93 campioni nei punti di controllo dei divieti permanenti per motivi di inquinamento (foci fluviali) su un totale di 126 prelievi (74%)
- 90 campioni per il controllo “straordinario” delle zone non previste dalla DGR 225/2003 (in genere, coste insulari e rocciose), di cui 56 su 56 prelevati (100%) lungo le coste dell’Isola d’Elba (di competenza del Servizio Sub-provinciale di Piombino) e 34 su 68 (50%) nella provincia di Grosseto, isole comprese.

In totale, quindi, sono stati analizzati oltre 3.000 campioni (per l’esattezza 3.074) per lo studio sui nuovi parametri microbiologici, nelle diverse situazioni e condizioni, andando persino al di là di quanto previsto nell’Allegato “A” alla suddetta Convenzione, dove erano stati preventivati, sia come attività che come costi, 2.892 campioni con una percentuale di realizzazione del 106%.

Infine, si deve ricordare che, come riportato in seguito (par. 4.3.1) alcuni (461) campioni sono stati analizzati con due diverse metodiche per *Escherichia coli*, portando il totale delle analisi sperimentali ad oltre 6.600 (3.074 per EI e 3.535 per EC), invece che le preventivate 5.784 (+14%). Questa attività supplementare (non specificata dalla Convenzione) è stata volontariamente effettuata nei laboratori di Pisa e Livorno per una verifica della miglior tecnica analitica e della eventuale confrontabilità dei dati rilevati.

“out of range” (additional analyses) and the evaluation of bathing suitability (art. 6 DPR 470/82) out of a total of 190 additional analyses (73%);

- *93 samples in check points with permanent bathing prohibition due to pollution (mouths of river) out of a total of 126 samples (74%);*
- *90 samples for the “extraordinary” control of the not included in the areas DGR 225/2003 (generally, insular and rocky coasts), of which 56 out of 56 taken (100%) along the coasts of the Elba Island (competence of the Piombino Department) and 34 out of 68 (50%) in the province of Grosseto, islands included.*

Thus, a total of 3,000 samples were analyzed (3,074 to be exact) in order to study the new microbiological parameters, in the different situations and conditions. The analyses carried out were therefore much more extensive than those specified in Enclosure “A” of the above named Convention, which included, both as activity and costs, 2,892 samples with a percentage of realization of 106%.

*It is also useful to remember that, as specified below, (par. 4.3.1) some samples (461) were analyzed with two different methods for *Escherichia coli*, with a total of experimental tests above 6,600 (3,074 for EI and 3,535 for EC), as compared to scheduled 5,784 samples (+14%). This additional activity (not mentioned in the Convention) was carried out voluntarily in the laboratories of Pisa and Livorno, aimed at determining the best analytical technique and at enabling the comparison of data.*

4.2.2 LA SCELTA DELLE METODICHE ANALITICHE

Per quanto riguarda le metodiche utilizzate per l'analisi dei nuovi parametri è necessario fare alcune premesse che illustrino l'evoluzione del progetto.

Nel documento della Commissione europea i metodi indicati nell'Allegato 1 della proposta erano, rispettivamente, ISO 7899⁹ per gli enterococchi intestinali (EI) e ISO 9308-1¹⁰ per *Escherichia Coli*. Quindi, in base a queste informazioni il metodo degli EI è stato identificato più precisamente nell'ISO 7899-2:2000, in quanto era specificato che i valori dovevano essere espressi nelle unità di misura UFC/100ml, un metodo già ampiamente sperimentato e conosciuto per l'analisi delle acque: questo è il metodo utilizzato per tutte le analisi effettuate.

Invece, il metodo indicato per EC non sembrava essere il più idoneo per le acque marine ed i dubbi aumentavano se si considerava che in sede di dibattito successivo alla proposta di direttiva, erano state sollevate molte obiezioni sull'adozione del metodo ISO 9308-1, come avevano riportato i colleghi del Ministero della Salute e dell'Istituto Superiore di Sanità, che avevano partecipato ai vari gruppi di lavoro.

4.2.2. ANALYTICAL METHODS

As for the methods used for the analysis of the new parameters, it is necessary to make a few premises in order to be able to illustrate the evolution of the progress.

The method named in Enclosure 1 of the draft of directive drawn by the European Commission were, respectively, ISO 7899⁹ for the intestinal enterococchi (EI) and ISO 9308-1¹⁰ for Escherichia Coli. As a result, the method chosen for EI was ISO 7899-2:2000, as the enclosure specified that the values were to be expressed using UFC/100 ml as unit of measure, a method largely experimented and employed in the past for the analysis of water. Therefore, this was the method used for all the tests carried out.

On the contrary, the method recommended for EC did not appear to be particularly suitable for sea water. This appeared evident during the debate on the proposed directive; many objections on the suitability of method ISO 9308-1 were in fact raised by the colleagues of the Ministry of Health and the Institute of Health who had taken active part in the workgroups.

⁹ **ISO 7899-1:1998** Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water - Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium
ISO 7899-2:2000 Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method.

¹⁰ **ISO 9308-1:2000** Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method
ISO 9308-1:1990 Water quality - Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* — Part 2: Multiple tube (most probable number) method
ISO 9308-3:1998 Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water - Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium.

⁹ **ISO 7899-1:1998** Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water – Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium
ISO 7899-2:2000 Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 2: Membrane filtration method.

¹⁰ **ISO 9308-1:2000** Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method
ISO 9308-1:1990 Water quality – Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* – Part 2: Multiple tube (most probable number) method
ISO 9308-3:1998 Water quality – Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium.

Inoltre, durante una sperimentazione effettuata nel 2000, promossa dall'ISS e rispondente a preciso mandato della Commissione europea, in una precedente fase di revisione della direttiva sulle acque di balneazione, nel protocollo operativo, comune a tutti gli altri stati membri coinvolti, il metodo previsto era quello enzimatico cosiddetto “miniaturizzato” (ISO-9308-3). I risultati di quello studio, raccolti a livello europeo ed utilizzati per la messa a punto della proposta del 2002, dimostravano come questo metodo fosse estremamente specifico per l'individuazione dei batteri EC.

Ciò nonostante nella stesura definitiva del progetto di studio sperimentale presentato da ARPAT alla Regione Toscana, avendo come unico riferimento normativo “certo” (sebbene solo a livello di proposta) il metodo con membrane filtranti, si era deciso di adottare appunto il metodo ISO 9308-1 per l'analisi dell'EC.

Successivamente, avendo portato a conoscenza del Ministero della Salute e dell'Istituto Superiore di sanità, sia l'imminente inizio della sperimentazione sia le perplessità circa la metodica più idonea da utilizzare, si è avviato un serrato confronto tra tutti i maggiori esperti dei diversi enti. Al termine è stato concordato di proporre al tavolo europeo, come posizione ufficiale dell'Italia, l'uso del metodo ISO 9308-3 e, di conseguenza, ARPAT e Regione Toscana hanno deciso di modificare la metodica dello studio sperimentale, informandone il Ministero della Salute (lettera della Regione Toscana n. 104/15292/27.02 del 08.04.2003).

Così a pochi giorni dall'inizio della stagione balneare, sono state avviate le procedure per acquisire il materiale e la strumentazione necessaria al metodo ISO 9308-3, dato che non è una metodica normalmente utiliz-

In the operating protocol of the experimentation of 2000, promoted by the Institute of Health in response to a specific order of the European commission, which was drawn by all the member countries involved on the occasion of a previous review phase of the directive on bathing water, the method chosen was the so-called enzymatic “miniaturized” method (ISO 9308-3). The results attained, acquired at a European level and subsequently used to draft the proposal of 2002, showed that this method was extremely specific for the determination of the EC bacteria.

Despite this, during the final review of the project for the experimental study presented by ARPAT to the Region of Tuscany, the parties involved decided to adopt the ISO 9308-1 method for the analysis of EC due to the fact that the only reference available (though in a draft phase) was the method based on filtering membranes.

At a subsequent stage, that is after having informed the Ministry of Health and the Institute of Health of the forthcoming start of the experimentation and of the doubts regarding the suitability of methods, the parties involved decided for the matter to be investigated by a pool of experts. The results of the investigation led the parties involved to recommend the adoption of method ISO 9308-3 at a European level. Thus, ARPAT and the Region of Tuscany consequently decided to modify the methods of the experimental study, informing the Ministry of Health thereof (letter of the Region of Tuscany no. 104/15292/27.02 dated 08.04.2003).

The procedures for the acquisition of the material and the definition of the instrumentation for the implementation of method ISO 9308-3, not customarily em-

zata nei Dipartimenti ARPAT. Il tempo necessario all'aggiudicazione delle forniture alle diverse ditte e alla consegna di tutti i quantitativi richiesti non è stato poco e questo fatto ha comportato una inevitabile fase di ritardo sull'adozione di questa metodica.

Di fatto, quindi, per almeno i primi due mesi di prelievi (aprile e maggio) non è stato possibile utilizzare il metodo prescelto, ma si è dovuto lasciar libertà ai diversi Dipartimenti ARPAT di usare il metodo già disponibile e conosciuto nei loro laboratori di analisi delle acque.

In pratica, da tutti è stata utilizzata la metodica segnalata dal CNR-IRSA nel Manuale dei metodi analitici per le acque (IRSA CNR ISSN 1125-2464 Metodo F) basata sull'uso di membrane filtranti e composto cromogeno (TBX), tranne il Servizio di Piombino che ha utilizzato il metodo UNICHIM 1185:2000, analoga alla precedente eccetto per il cromogeno (EC X – GLUC AGAR).

A partire dal primo campionamento di giugno è stata usata la metodica nuova (UNI EN ISO 9308-3), tranne nel Dipartimento di Lucca, che ha iniziato col secondo campionamento di giugno, e nel Dipartimento di Pisa, dal primo di luglio, a causa di ulteriori ritardi nella consegna del materiale.

Tutti questi metodi, comunque, si basano sullo stesso principio per il rilevamento di *Escherichia coli*, sfruttando la capacità di questa specie batterica, grazie ad un enzima specifico (b-glucuronidasi), di attuare l'idrolisi di b-glucuronidi cromogeni o fluorogeni (presenti nell'apposito terreno di coltura) con rilascio di composti colorati o fluorescenti.

Per semplicità, i dati, espressi nelle due unità di misura, sono stati trattati insieme, sia nel calcolo delle medie, sia nel confronto tra

employed by ARPAT's departments, were therefore decided just a few days before the start of the bathing season. The time required to award supplies to contractors and deliver the required materials caused an inevitable delay.

As a result of the unavailability of the selected method for at least the first two months (April and May), ARPAT's departments were forced to adopt the methods available and in use in their laboratories.

All the departments basically used the method recommended by CNR-IRSA in the Manual of the methods for the analysis of water (IRSA CNR ISSN 1125-2464 Method F), based on filtering membranes and chromogenic compounds (TBX), except the Department of Piombino that decided to use the UNICHIM 1185:2000 method, which similar to the previous one except for the chromogen (EC X–GLUC AGAR).

The new method (UNI EN ISO 9308-3) was first used for the June sampling, with the only exception of the Department of Lucca, which started the second sampling in June, and the Department of Pisa, which started it in the first days of July due to further delays in the delivery of materials.

All the methods described are based on the same principle used to determine the presence of Escherichia Coli, as they exploit the capacity of this bacterial species of causing the hydrolysis of chromogenic or fluorogenic b-glucuronides (which are found in agaves) and releasing colored or fluorescent compounds thanks to the release of an enzyme (b-glucuronidase).

i diversi parametri, sia nell'elaborazione a livello comunale e provinciale, separandoli espressamente solo nel caso del confronto tra le metodiche. A questo proposito, però, occorre fare una precisazione relativamente ai valori più bassi di *E. coli*.

4.2.3 IL METODO UNI EN ISO 9308-3

Il metodo ISO 9308-3, il cui campo di applicazione sono le acque superficiali e reflue, prevede l'inoculo del campione, previa diluizione, in una serie di pozzetti su micropiastre (metodo miniaturizzato) contenenti il terreno di coltura disidratato. Le micropiastre sono esaminate sotto lampada di Wood (UV a 366 nm), al buio dopo un periodo di incubazione da 36 a 42 h a $44 \pm 0,5$ °C. La presenza di *E. coli* è indicata dalla fluorescenza blu risultante dall'idrolisi del 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG) ed i risultati sono espressi come "numero più probabile" (Most Probable Number, MPN).

Nella Tabella 2 sono riportati per ciascuna tipologia di campione (acque di balneazione, acque superficiali, acque reflue), in funzione del presunto grado di contaminazione, il numero di diluizioni da effettuare ed il numero di pozzetti da inoculare per ciascuna diluizione. Le diluizioni ed il numero di pozzetti inoculati stabiliscono i limiti inferiori e superiori del numero più probabile di batteri su 100 ml di campione.

Le istruzioni allegate al kit del metodo commercializzato da BIORAD (utilizzato in questa indagine) indicano che devono essere considerati positivi quei pozzetti che oltre

For the purpose of simplicity, data expressed in both units of measure have been taken into account for the calculation of averages and for the comparison of parameters, at a provincial and municipal level, but maintained separate only for the purposes of comparing the methods. In relation to this, it is, however, necessary to clarify the meaning of the lowest E. Coli values.

4.2.3 THE UNI EN ISO 9308-3 METHOD

*The ISO 9308-8 method, which is usually employed in the analysis of surface and waste water, consists in the inoculation of an adequately diluted sample, in a set of microplate wells (miniaturized method) containing dehydrated agave. Microplates are then examined with a Wood lamp (UV at 366 nm), in darkness, after a period of incubation ranging from 36 to 42 h at 44 ± 0.5 °C. The presence of *E. coli* is indicated by the appearance of a blue fluorescence caused by the hydrolysis of the 4-methylumbelliferil- β -D-glucuronidase (MUG), while the results are expressed as "most probable number" (MPN).*

Table 2 shows, for each type of sample (bathing water, surface water, waste water) the number of dilutions that have to be carried out in function of the degree of contamination, along with the number of wells that have to be inoculated for each dilution. The dilutions and number of inoculated wells determine the upper and lower limits for the most probable number on 100 ml of sample.

Origine del campione	Numero di diluizioni	Numero di pozzetti/diluizione	Limite di misura batteri/100 ml
Acque di balneazione	2	64 pozzetti 1/2 32 pozzetti 1/20	da 15 a $3,5 \times 10^4$
Acque dolci superficiali	4	24 pozzetti 1/2 24 pozzetti 1/20 24 pozzetti 1/200 24 pozzetti 1/2000	da 40 a $3,2 \times 10^6$
Acque residuali e di depurazione	6	16 pozzetti 1/2 fino 16 pozzetti 1/200000	da 60 a $6,7 \times 10^8$

Tabella 2

Diluizioni da effettuare in funzione della tipologia del campione con il metodo UNI EN ISO 9308-3 per la ricerca di *E. coli*.

Dilutions that have to be carried out with method UNI EN ISO 9308-3 in function of the type of sample in order to determine the presence of E. coli.

alla fluorescenza presentano crescita a 44 °C (fondello di crescita).

A questo proposito va sottolineato che mentre il metodo UNI EN ISO 9308-3:1998 non fa riferimento a questo aspetto, nella nostra esperienza è impossibile valutare la crescita con micropiastre opache che hanno la funzione di eliminare eventuali interferenze della fluorescenza da un pozzetto all'altro, ma che impediscono di apprezzare la torbidità dovuta alla crescita batterica. Questa invece potrebbe essere apprezzata con piastra trasparenti, peraltro disponibili e meno costose, senza incidere più di tanto sulla lettura della fluorescenza. In questa indagine per l'impiego di piastre opache e perché, comunque, la norma UNI EN ISO 9308-3:1998 non lo prevede non è stato valutato l'aspetto della crescita batterica.

Per ogni diluizione deve essere annotato il numero di pozzetti positivi per l'identificazione del numero caratteristico, che nel caso siano state effettuate tre o più diluizioni, sarà una combinazione di tre numeri dove possibilmente l'ultima cifra sia 0. Dal numero caratteristico si ottiene il numero più probabile di batteri in 100 ml di campione mediante l'ausilio delle tavole statistiche o di idonei

The instructions enclosed to the kit of the method marketed by BIORAD (i.e. the one used for this investigation) indicate that to be considered positive, microwells must show signs of fluorescence and a bacterial growth at 44°C (growth base).

It is worth underlining that while method UNI EN ISO 9308-3: 1998 does not specifically refer to this aspect, it is generally impossible to evaluate the growth with opaque microplates, which are effective in preventing fluorescence related interference between the wells but unsuitable to enable the evaluation of turbidity originating from bacterial growth. This can instead be evaluated using transparent plates, which are commonly available, far less expensive and do not affect fluorescence. Bacterial growth was not specifically examined in this investigation, as standard UNI EN ISO 9308-3:1998 does not specifically foresee it.

In order to identify the characteristic number of each dilution, it is necessary to count the number of positive wells. Thus, if three or more dilutions have been made, the result will be a combination of three numbers with 0 as a last digit. The characteristic number is then used to calculate

software che forniscono anche l'intervallo di confidenza al 95%.

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* il risultato era inferiore a 15 MPN/100ml abbiamo operato secondo lo schema seguente, sulla base della concentrazione di Coliformi fecali riscontrate nello stesso campione:

the most probable number of bacteria in 100 ml of sample. This calculation is carried out by means of statistical tables and software programs that ensure a reliability value around 95%.

Considering that 2 dilutions (64 wells with a 1:2 and 32 to 1:20 dilution) are normally used for sea water in absence of positive wells, the resulting value, according to the conversion tables, should be equivalent to a value below the method limit (15 bacteria/100 ml). Although these tables also show the limits of reliability of these tables (specifically 2 and 108 bacteria/100 ml), concentrations should always be expressed as <15, without further specifications.

In this specific case, it was necessary to adopt a convention in order to ensure the closest possible similarity of the units of measure and enable the comparison of these values with those in UFC/100 ml, which were likely to reach even "0" (no colonies), also due to the high number of samples with concentrations ranging from 0 to 15 UFC/100 ml.

*In other words, every time the result of the *E. coli* analysis was below 15 MPN/100 ml, the following procedure, based on the concentration of faecal Coliforms found in the same sample, was used:*

Escherichia coli MPN/100ml <u>Dalle analisi</u>	Limite tabellare inferiore MPN/100ml	Coliformi fecali UFC/100ml <u>Dalle analisi</u>	Escherichia coli MPN/100ml <u>Per convenzione</u>
<15	<2	0	0
<15	<2	1	1
<15	<2	2	2
<15	<2	>2	2

Quindi il valore di *E. coli*, in queste condizioni di concentrazioni, riportato in tutte le tabelle e figure ed usato per tutte le elaborazioni è quello nella colonna più a destra (“per convenzione”).

Thus, the E. coli value in these concentrations, shown in all tables and figures and used for all analyses, is the one listed in the last column on the right (“per convenzione”).

4.2.4 IL PERSONALE IMPIEGATO

Nella fase operativa del progetto sono state impiegati operatori di 5 Dipartimenti provinciali (Massa Carrara, Lucca, Pisa, Livorno e Grosseto) e del Servizio Sub-provinciale di Piombino, per tutta la parte dei prelievi e delle analisi.

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, che si è rapportato con l’Area “Tutela dell’ambiente marino, lagunare, lacustre, costiero e dell’ittiofauna” (Area “Mare”), struttura che ha coordinato e gestito il progetto insieme all’Area “Tutela delle acque interne e costiere” della Regione Toscana.

Inoltre, in considerazione del notevole aumento del carico di lavoro dovuto al sovrapporsi dello studio sperimentale con le normali attività di monitoraggio, 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, ben 29 unità di ARPAT, tra dirigenti biologi, tecnici e collaboratori esterni, oltre al personale amministrativo per la parte di acquisto di materiale e strumentazione.

4.2.3. STAFF EMPLOYED

During the active stage of the project we employed operators of 5 provincial departments (Massa Carrara, Lucca, Pisa, Livorno and Grosseto) and of the department of Piombino, who collaborated for the whole length of the acquisition and testing phase.

One or more referents for the project were chosen, for each territorial structure, among the staff responsible for to the control of water resources and of bathing water, that who reported to the Area for the Protection of the marine, lagoon, lacustrine, coastal environment and of the fish fauna (Area “Mare”), the structure that coordinated and managed the project, together with the Area for the Protection of the inland and coastal waters of the Region of Tuscany.

Due to increased workload, resulting from the need of meeting the deadlines of the project and of carrying out ordinary monitoring activities, some Departments, also have employed external professional experts specialized in biological and microbiological analysis.

In short, the activities of the experimental study, which included laboratory tests and sampling as well as the collection and the processing of data and its coordination, involved 29 units of ARPAT, including biologist managers, technicians and external collaborators, and the administrative staff responsible for the purchase of material and instrumentation.

4.3 RISULTATI

Innanzitutto si deve chiarire un po' meglio di questi parametri microbiologici, mettendo in luce le differenze ed il significato e tenendo conto che si tratta sempre e comunque di batteri utilizzati come indicatori di contaminazione fecale più o meno recente, con riferimento alla potenziale presenza di altri microrganismi anche patogeni.

I "Coliformi fecali" sono la parte termotollerante dei "Coliformi totali", cioè sono batteri a forma di bastoncello, gram-negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, non sporigeni che fermentano il lattosio in 48 ore a 44-45 °C in 24 ore, invece che già a 36 °C (Coliformi totali). Appartengono tutti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, vari generi e specie, ma quella più rappresentativa è *Escherichia coli*, che raggiunge spesso oltre il 90% dei CF ed il cui habitat originale è unicamente l'intestino umano o animale, fornendo, pertanto, indicazioni certe di contaminazione fecale.

Per "streptococchi fecali" si intendono i batteri appartenenti al genere *Streptococcus* (*S. bovis*, *S. equinus*) ed *Enterococcus* (*E. avium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, ...), sono batteri Gram-positivi a localizzazione intestinale; gli "enterococchi intestinali", quindi sono solo una porzione degli streptococchi, maggiormente presente nell'uomo. Tutti questi batteri hanno una discreta resistenza alla salinità, maggiore dei coliformi.

In pratica, quindi, i due nuovi parametri sono dei sottoinsiemi, più o meno rappresentativi e sicuramente più specifici per la contaminazione fecale in ambiente marino, degli analoghi ancora in vigore.

4.3. RESULTS

It is necessary, in the first place, to clarify the meaning of these microbiological parameters, describe their differences and significance and take into account that these are always to be considered as bacteria used as indicators of a recent or past contamination and therefore of the potential presence of other microorganisms, including pathogenic ones.

"Faecal Coliforms" represent the thermotolerant side of "total Coliforms". These are rod shaped, gram-negative, optional aerobics and anaerobic, and no sporogenic bacteria which ferment the lactose in 48 hours at 44-45 °C in 24 hours, instead of at 36° C (total Coliforms). They all belong to the family of the Enterobacteriaceae, which groups several gendres and species, though the most representative is undoubtedly Escherichia coli, which reaches very often beyond 90% of CF and can originally be found only in the human or animal intestine. It is mainly for this reason that its presence can be indicative of faecal contamination.

*"Faecal streptococci" belong to the gendre of Streptococcus (*S. bovis*, *S. equinus*) and Enterococcus (*E. avium*, *E. faecalis*, *E. faecium*,...). These are gram-positive bacteria located in the intestine; therefore "intestinal enterococci" are only a portion of the streptococci, and are mainly found in man. These bacteria are generally more resistant to salt than Coliforms.*

Thus, the two new parameters are, more or less representative subsets that provide more specific indications of faecal contamination as compared to the ones in use.

4.3.1 IL CONFRONTO TRA I METODI PER EC

Il confronto tra le due metodiche utilizzate per l'analisi di *Escherichia coli* è stato fatto su un numero limitato di campioni (461) che i Dipartimenti di Livorno (398) e Pisa (66) hanno raccolto e “volontariamente” analizzato in doppio.

Proprio in virtù di questa decisione, presa in autonomia dai 2 Dipartimenti¹¹, di procedere ad una verifica delle risposte analitiche utilizzando i 2 metodi contemporaneamente, i campioni sono stati “scelti” in modo casuale e rappresentano, quindi, un test ottimale dal punto di vista statistico, con una numerosità non elevatissima, ma sicuramente sufficiente allo scopo.

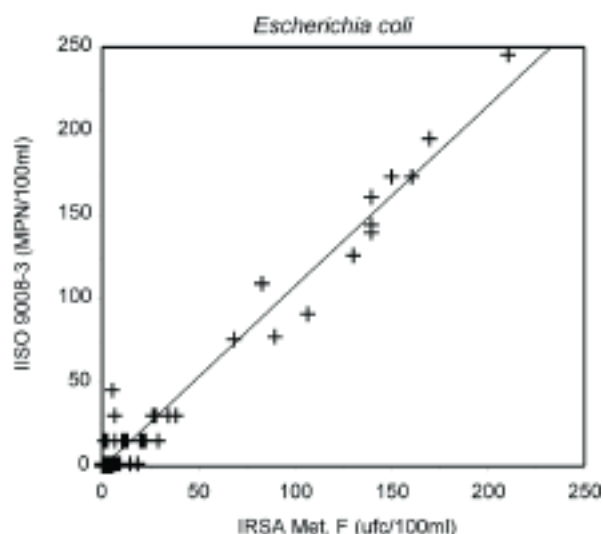
Il confronto è stato realizzato su campioni raccolti da luglio a settembre lungo il litorale pisano e da giugno a settembre in quello livornese (escluse le zone dell'Isola d'Elba e dei comuni di S. Vincenzo e Piombino, tutte di competenza del Servizio di Piombino), con concentrazioni batteriche variabili e tutte inferiori al limite di riferimento (qualità “eccellente”) previsto dalla nuova direttiva (=250 UFC/100ml).

4.3.1 COMPARISON OF THE METHODS USED FOR THE DETERMINATION OF EC

The comparison between the two methods used for the analysis of Escherichia coli was drawn using the limited number of samples (461) “voluntarily” the Departments of Livorno (398) and Pisa (66) collected and analyzed in double by.

The decision, taken autonomously by the 2 departments¹¹, of verifying the analytic results by simultaneously using the 2 methods, guarantees the random selection of samples and therefore the availability of a numerically united but statistically relevant set of data.

The comparison was carried out on the samples, collected between July and September along the coastline of Pisa and between June and September along the coastline of Livorno (with the exception of the areas of the Elba Island and the municipalities of S. Vincenzo and Piombino, which are all under administration of the department of Piombino), with varying bacterial concentrations below the reference limit



x = IRSA CNR ISSN 1125-2464 MET F
y = UNI EN ISO 9308-3

N = 461
y max = 245
x max = 210

Parametri della retta di regressione lineare
 $y = mx + b$
con $b = 0$
 $m = 1.078$

Coefficiente di correlazione = 0.988
Errore standard = 3.824
Media deviazione assoluta = 8.213

Test T di Student = 2.148
differenza non significativa ($P < 0.05$)

Figura 3

Confronto statistico tramite il metodo della regressione lineare tra streptococchi fecali ed enterococchi intestinali, utilizzando tutti i dati del 2003.

Statistical comparison, based on the linear regression method, between faecal streptococci and intestinal enterococci found in 2003 data.

¹¹ È importante sottolineare la volontà di approfondimento tecnico e scientifico dimostrata dal personale coinvolto nello studio, in particolare dei Dipartimenti di Livorno e Pisa, e di apprezzarne l'ulteriore sforzo operativo.

¹¹ *It is important to praise the determination of the staff, in particular of the departments of Livorno and Pisa, in carrying out these additional technical and scientific examinations.*

I risultati prodotti dai due metodi, per quanto espressi in unità di misura diverse (UFC/100ml e MPN), appaiono (Figura 3) ben allineati lungo tutta la retta di regressione, soprattutto nel tratto corrispondente ai valori più elevati (>50 ufc/100ml). Sia la pendenza della retta ($m=1.078$) che il coefficiente di correlazione (0.988) fanno pensare ad un'ottima confrontabilità dei due metodi ed anche il test di Student evidenzia una differenza statisticamente non significativa, con una probabilità del 95%.

4.3.2 IL CONFRONTO TRA I PARAMETRI

Come era logico prevedersi, le differenze statisticamente più significative si osservano tra la coppia di parametri CF-EC piuttosto che tra SF-EI. Infatti, nel primo caso alla variabilità dovuta a due popolamenti batterici distinti si aggiunge quella determinata dall'uso di una nuova metodica per EC in corso di analisi (l'ISO 9308-3), basata su diversi principi metodologici (membrane filtranti e terreno cromogeno, da una parte, e diluizione, inoculo e reazione enzimatica, dall'altra) ed interpretazione dei dati (conta delle colonie e numero più probabile). In realtà, come abbiamo visto, le due metodiche sembrano fornire risultati abbastanza simili, ma considerando i valori assoluti più elevati si nota una deviazione dalla linearità e ciò potrebbe aver determinato una certa variazione.

Infatti, utilizzando tutto il data set disponibile (quasi 3'000 dati), anche i parametri della regressione lineare (pendenza e correlazione) confermano questa ipotesi (Figura 4) e

(“excellent” quality scheduled in the new direction (= 250 UFC/100ml).

The results obtained with the two methods, even though expressed in different units of measure (UFC/100ml and MPN), appear (picture 3) well aligned along the whole regression line, especially in the section that corresponds to the highest values (50 ufc/100ml). Both the inclination of the line ($m=1,078$) and the correlation coefficient of (0,988) confirm the good comparability of the 2 methods, which is further supported by student's test that shows a statistically irrelevant difference with a probability of 95%.

4.3.2. COMPARISON OF PARAMETERS

As it was logical to foresee, the statistically more significant differences can be found between the pair of parameters CF-EC rather than between the SF-EI ones. In fact, in the first case the variability of the the two different populations of bacteria was further enforced by the use of a new method (ISO 9308-3), based on different methodological (filtering membranes and chromogenic agave, on one side, and dilution, inoculation and enzymatic reaction, on the latter side) and data interpretation methods count of colonies and calculation of the most probable number. Although the two methods, as seen above, seem to offer almost equivalent results, the highest absolute values shows a deviation from linearity that could account for the reported differences.

In fact, if we use all the data set available (almost 3,000 data), we notice that even the parameters of linear regression (inclination and correlation) confirm this hypothesis

le differenze tra i due parametri (CF e EC) sono statisticamente molto significative (T di Student**). Questa mancanza di correlazione lineare è, in gran parte, dovuta ad un consistente numero di campioni che mostrano valori elevati di EC (fino ad alcune migliaia di unità) in corrispondenza di livelli di coliformi inferiori a 20. In modo analogo, ma meno numeroso, vi sono casi con un rapporto CF/EC elevato, mentre nella parte centrale dei valori (tra 20 e 1.000) l'allineamento sembra maggiore.

*(Figure 4) and that the differences between the two parameters (CF and EC) are statistically very significant (Student's T test**). This lack of linear correlation originates from the substantial number of samples with show very high values of EC (u to several thousands of units) in correspondence of levels of Coliforms below 20. Similarly, there is a smaller number of results with a very high CF/EC relation, which show a higher degree of alignment in the central range of values (between 20 and 1,000).*

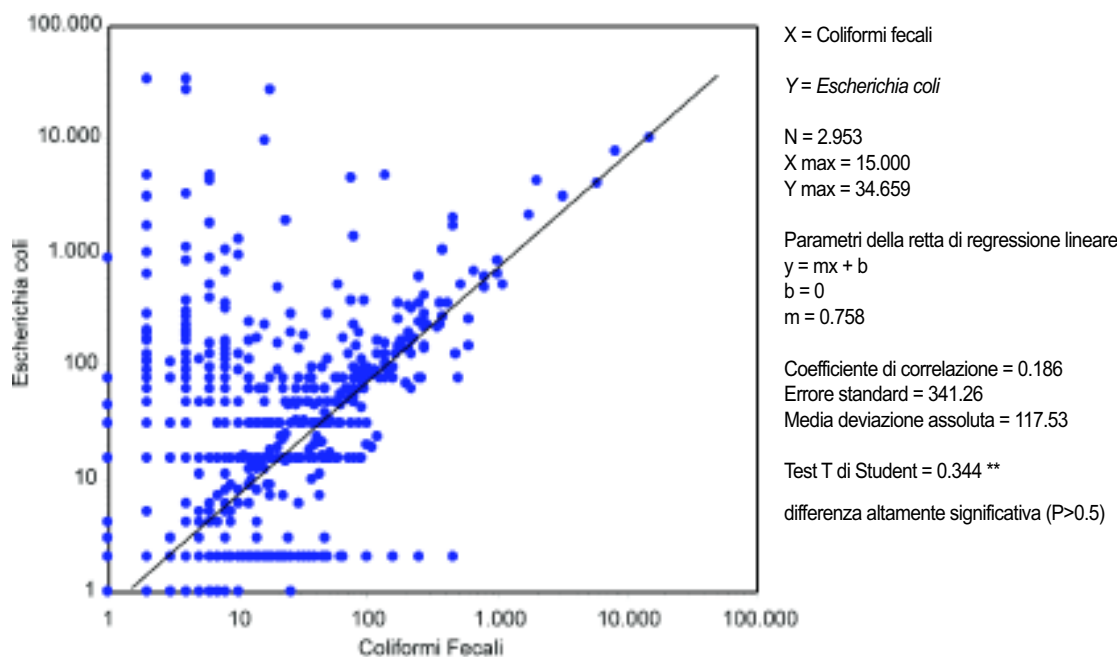


Figura 4

Confronto statistico tramite il metodo della regressione lineare tra Coliformi fecali e Escherichia coli, utilizzando tutti i dati del 2003.

Statistic comparison, based on the linear regression method, between faecal coliforms and Escherichia coli, found in 2003 data.

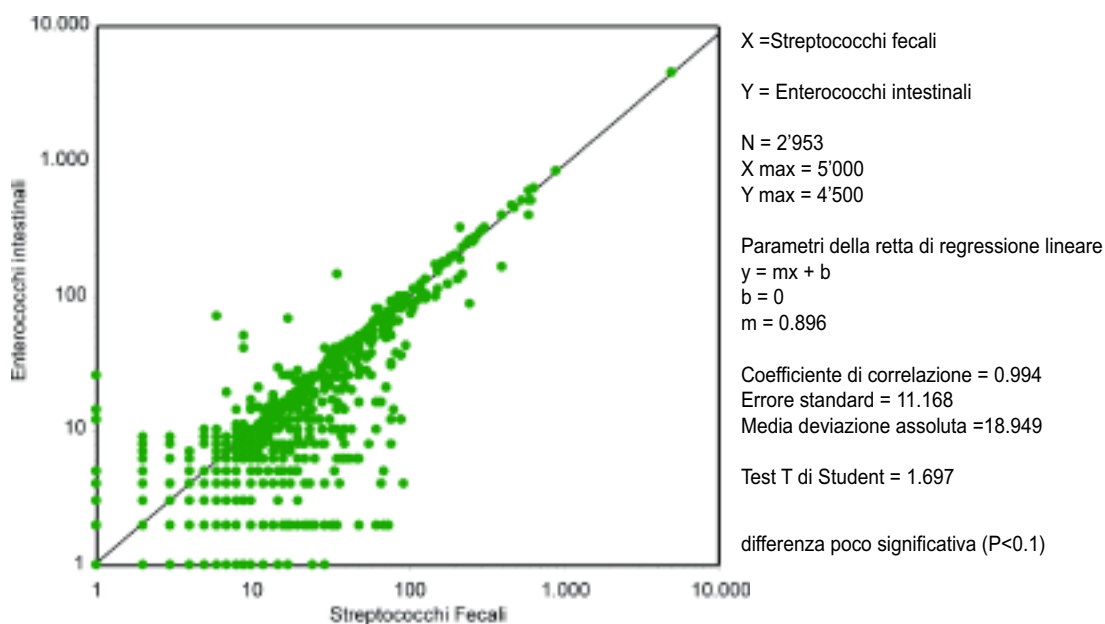
Al contrario, il confronto tra streptococchi ed enterococchi evidenzia (Figura 5) la buona linearità della regressione ($m = 0,9$) ed un'elevata correlazione (0,994), dimostrando che le differenze sono non significative. Anche in questo caso, la linearità migliora si ritrova per valori compresi tra 10 e 1.000 UFC/100ml, mentre per valori vicini allo zero, aumentando la possibilità di errore nel conteggio delle colonie, la variabilità è maggiore.

On the contrary, the comparison between streptococci and enterococci (Figure 5) showed a good linearity of regression ($m=0.9$) and an high correlation (0.994), thus revealing the existence of non significant differences even in this case, linearity improves around values ranging between 10 and 1,000 UFC/100ml, while for values close to zero, that corresponds to a higher probability of incorrect colony count, variability is significantly higher.

Figura 5

Confronto statistico
tramite il metodo
della regressione lineare tra
streptococchi fecali ed
enterococchi intestinali,
utilizzando
tutti i dati del 2003.

*Statistical comparison, based on
the linear regression method,
between faecal streptococci and
intestinal enterococci found in
2003 data.*



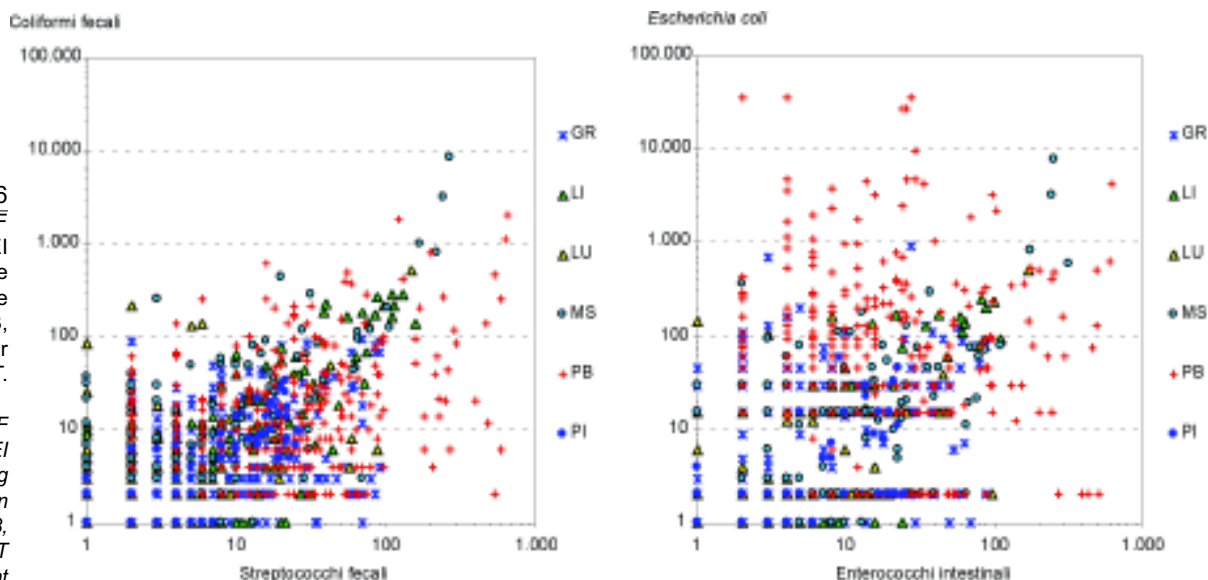
Se si analizza, poi, il significato dei due nuovi indicatori, confrontando i dati di EC ed EI per ogni campione (Figura 6), queste differenze di comportamento vengono messe ancor più in evidenza. Infatti, seppure il confronto tra i dati di coliformi e streptococchi non mostri una relazione significativa, si può notare come i dati tendano ad allinearsi secondo una relazione

These differences in behaviour are even more evident when analyzing the meaning of the two new indicators by comparing the details of EC and EI for every sample (Figure 6). In fact, although the comparison of the data of Coliforms and streptococci does not show a significant relations data tend to align according to 1:1, especially for the

Figura 6

Variazione di SF-CF
(a sinistra) e di EC-EI
(a destra) nelle acque
di balneazione toscane
tra aprile e settembre 2003,
suddivise per
Dipartimento ARPAT.

*Variation of SF-CF
(on the left) and of EC-EI
(on the right) in the bathing
water of Tuscany between
April and September 2003,
divided by ARPAT
Department*



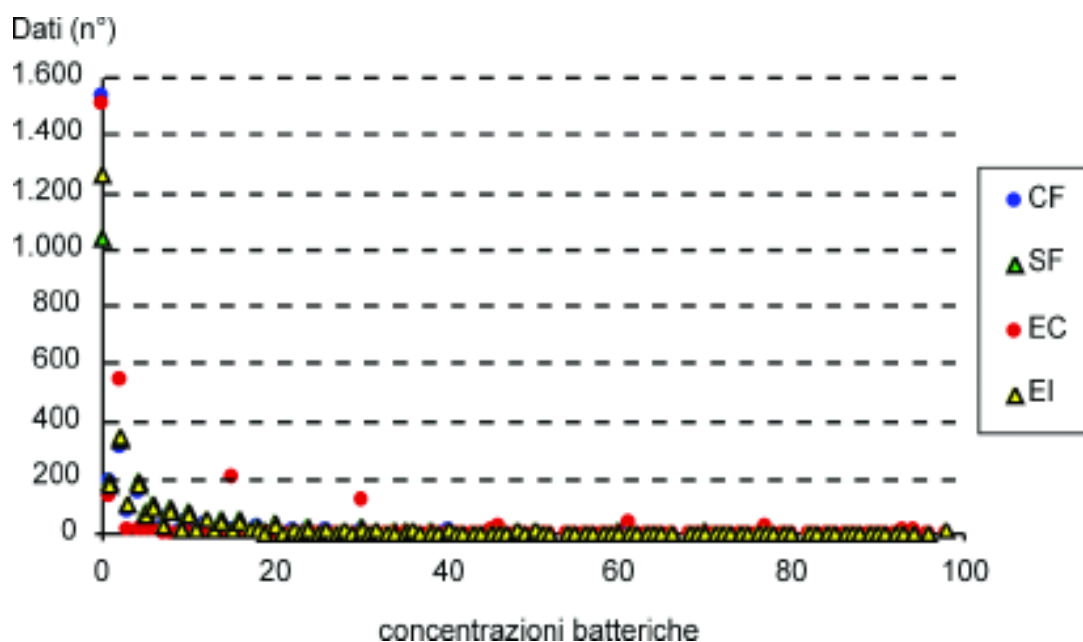


Figura 7
Distribuzione di frequenza delle classi di concentrazione batterica per coliformi fecali (CF), streptococchi fecali (SF), *E. coli* (EC) ed enterococchi intestinali (EI) nei campioni del 2003.

Distribution of frequency of classes of bacterium concentration for faecal coliforms (CF), faecal streptococci (SF), E. coli (EC) and intestinal enterococci (EI) in the samples of 2003.

1:1, soprattutto per i valori compresi tra 10 e 200 unità. Invece, tra *E. coli* ed enterococchi non si può osservare alcun tipo di distribuzione né tanto meno una qualche relazione significativa.

La distribuzione dei valori di densità batterica ci propone (Figura 7) un andamento pressoché analogo per i diversi parametri microbiologici, con moltissimi campioni a concentrazioni molto basse e pochi con livelli elevati. In particolare, le classi comprese tra 0 e 50 unità rappresentano oltre il 95% dei campioni, tranne che per *E. coli* (90%), per il quale si deve arrivare fino a 150 per ottenere lo stesso risultato (per gli altri 3 parametri questo valore va a comprendere il 99% dei dati).

values included between 10 and 200 units. On the contrary, no distribution or remarkable relation was found between E. coli and enterococci.

The distribution of the values of bacterial density shows (Figure 7) a similar trend for different microbiological parameters, with several samples with very low concentrations and a few with high levels. Especially, the classes included between 0 and 50 units represent more than 95% of the samples, except for E. coli (90%), for which it is necessary to reach 150 to attain the same result (for the other 3 parameters this value includes 99% of data).

4.3.3 LE VARIAZIONI SPAZIO-TEMPORALI

Prima di analizzare una qualche relazione tra condizioni locali (antropiche, idrologiche,

4.3.3. SPACE-TIME VARIATIONS

Before analyzing the possible relations between local conditions (anthropic,

morfologiche, ecc.) o climatiche ed caratteristiche microbiologiche delle acque di balneazione, si deve tener conto del tipo di stagione estiva è stata quella del 2003.

In genere, le condizioni climatiche lungo la costa toscana consentono un certo numero di fenomeni piovosi, anche intensi ed a carattere temporalesco, durante tutta la stagione balneare, con una maggior frequenza nel periodo tardo-primaverile (maggio-giugno) e nella zona della Toscana settentrionale. Tali precipitazioni, provocando un forte aumento della portata dei corsi d'acqua, che sono quasi tutti a regime torrentizio, veicolano a mare una gran quantità di contaminanti, andando ad influenzare sensibilmente le caratteristiche delle acque costiere.

Durante il 2003 tutto ciò non si è verificato, con una situazione anomala di persistenza di zona di alta pressione per oltre 3 mesi, accompagnata da temperature oltre le medie tipiche del periodo e quasi totale assenza di precipitazioni. Queste condizioni, che per le acque costiere hanno comportato temperature superficiali elevatissime (fino a 30°C), stabilità e stratificazione della colonna d'acqua con una limitata capacità di rimescolamento e ricambio, devono necessariamente aver influito anche sulle caratteristiche chimiche e sulle componenti biologiche degli ecosistemi. Una probabile conferma di queste ripercussioni, per esempio, si è avuta con la comparsa di fenomeni di proliferazione algale, talvolta con presenza di specie potenzialmente tossiche, lungo il tratto apuo-versiliense con una estensione ed una diffusione inusuale anche per queste zone.

Fatte queste premesse e prendendo in esame la distribuzione spaziale (nella Figura 8 i

hydrologic, morphologic, etc.) or the climatic and the microbiological characteristics of bathing water, it is necessary to take into account the kind of summer season we have had in 2003.

The summer along the coast of Tuscany is usually characterized by a few rain showers, some of which of great intensity and in the form of storms, during the whole bathing season and in particular in the period between late spring (May-June) and in the northern area of Tuscany. These rains tend to substantially increase the flow of streams, mainly torrential, that carry into the sea a large quantity of pollutants, thus significantly altering thereby the characteristics of coastal water.

This condition did not occur during the summer of 2003, due to the unusual persistency of high pressure in the whole area for over 3 months, the presence of temperatures above the average and the absence of rain. This conditions, which have remarkably increased the superficial temperatures of coastal waters (up to values of 30°C) causing the stability and stratification of the water column, have evidently influenced the chemical characteristics and the biological composition of the ecosystems. This was somehow confirmed by the appearance of sometimes potentially toxic seaweeds, along the coast of the Apuan Alps and Versilia, with unusual distribution and concentration for these areas.

By examining the spatial distribution of bacterial concentrations on the basis of these premises (Figure 8 shows the points

punti sono ordinati da Nord a Sud lungo la costa, evidenziando in modo separato quelli dell'Isola d'Elba) delle concentrazioni batteriche, calcolate come media e come 95%ile, si nota che l'andamento non è uniforme.

In particolare i valori di *E. coli* mostrano un andamento "sinuoso", con una prima zona a densità relativamente elevate nel litorale apuano (Massa) che scendono lentamente procedendo verso la Versilia, prima, e la costa pisana. Tutto il tratto settentrionale della Toscana, a causa di una forte pressione dei fattori antropici (industria, turismo, portualità, ecc.) e di alcune particolari condizioni ambientali (scarso idrodinamismo, basse profondità, importanti apporti fluviali), è da sempre considerato una delle zone a maggior rischio per la qualità delle acque costiere, sia rispetto a fenomeni di eutrofizzazione che per la tutela della salute pubblica.

Successivamente, per gran parte del tratto livornese si hanno valori estremamente bassi, al limite di una totale assenza di contaminazione fecale. Entrambe queste situazioni possono essere ritrovate, anche se con minor evidenza, considerando gli enterococchi.

Verso la parte meridionale del tratto controllato dal Dipartimento ARPAT di Livorno (Castagneto Carducci) i valori ritornano ad aumentare e questa tendenza si mantiene fino al limite della provincia di Grosseto (San Vincenzo e Piombino, nelle figure "Pb"). Il litorale maremmano segnala, invece, un ulteriore e definitivo calo delle densità batteriche, che, progressivamente, si stabilizzano intorno a valori "normali" (5-20 UFC/100ml) per zone comunque sottoposte ad una certa pressione antropica (turismo).

affected by the phenomenon arranged from North to South, and those of the Elba Island separately), it is possible to notice the lack of a standard trend, despite the average concentration of 95%.

The values of E. coli specifically show a sinusoid trend, with an initial area characterized by a relatively high density along the coastline of the Apuan Alps (Massa) that tends to progressively decrease near Versilia and the coast of Pisa. The coastline water of northern Tuscany has always been considered at risk due to the high pressure of anthropic factors (industry, tourism, ports, etc.) and the presence of specific environmental conditions (low hydrodynamics, low depths, presence of important waterways), both in terms of eutrophication and public health protection.

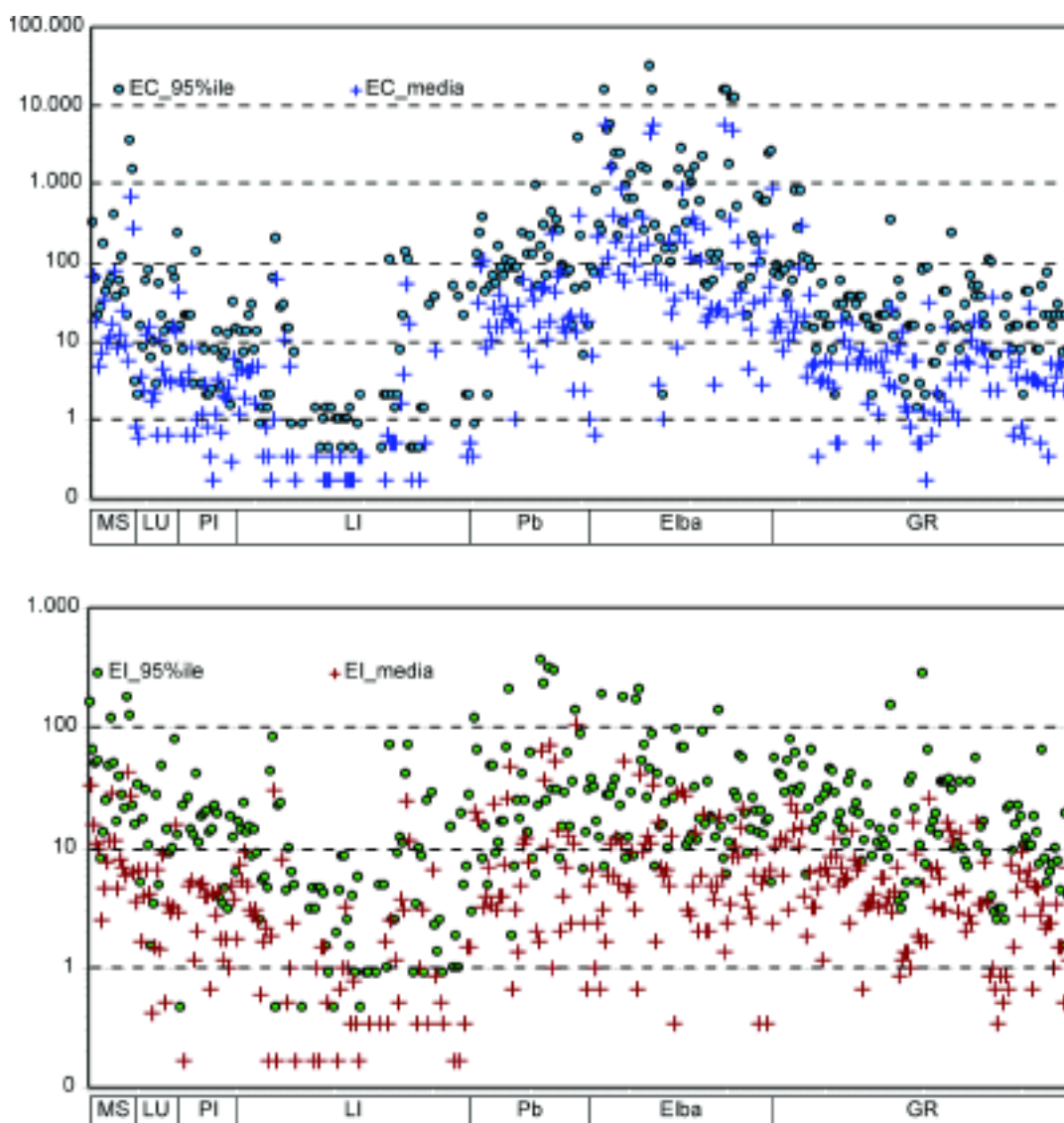
The values along the coast of Livorno were generally very low and showed no signs of faecal contamination. The data found for enterococci confirm these considerations.

Values increase once more in the southern part of the coast section controlled by the ARPAT's Department of Livorno (Castagneto Carducci) and continue to be high as far as the boundaries with the province of Grosseto (San Vincenzo and Piombino, marked as "Pb" in the figures). The coastline of Maremma, on the contrary, shows no sign of bacterial density, which increase, however, reaching standard values (5-20 UFC/100 ml) in the areas affected by a considerable anthropic pressure (tourism).

Figura 8

Distribuzione spaziale
del 95°ile e della media
delle concentrazioni
di E. coli
ed enterococchi
nelle acque di balneazione
toschane nel 2003

*Spatial distribution
of 95thile and of the average
of the concentrations of E. coli
and enterococci
in the bathing water
of Tuscany in 2003*



Da questo quadro si distacca nettamente il gruppo di punti localizzati lungo le coste elbane che presentano valori spesso superiori a 100 EC/100ml e talvolta anche oltre i limiti proposti dalla direttiva. Questa situazione non sembra facilmente spiegabile, se si considera che, a parte quelli legati al turismo, non si possono individuare altri fattori di rischio per queste acque e che le caratteristiche idrologiche sono estremamente favorevoli per mitigare anche questi pochi impatti.

Dal punto di vista temporale, invece, la situazione appare assai più confusa, sia considerando i diversi parametri insieme sia, come presentato nella Figura 9, prendendo in

The sites along the Elba Island stand clearly aside, as they often show values above 100 EC/100 ml and sometimes even above the thresholds recommended by the Directive. This situation is not easy to explain, if we consider that there are no risk factors for these water, with the only exception of tourism, and that their hydrogeological characteristics are extremely suitable to mitigate potential impacts.

The situation is even more confused if we take into account the time factor, regardless of whether we examine the data as a group or as shown in Figure 9, i.e. analyzing only the data of E. coli, which showed the great-

esame il solo *E. coli*, cioè il parametro maggiormente variabile durante la stagione 2003.

In questa figura, abbiamo, per maggior chiarezza, suddiviso i dati nei diversi tipi di monitoraggio delle acque di balneazione: controllo “routinario” (indicati come “R/S” nella legenda e “Pb” per quelli analizzati dal Servizio di Piombino), controllo “straordinario” (“Str.”) delle zone insulari e rocciose, controllo dei divieti permanenti per motivi di inquinamento (“Foci”).

est variations during the whole 2003 season.

For clarity purposes, the data of this figure have been divided according to the different kinds of monitoring actions carried out: “routine” controls (referred to as “R/S”), controls carried out by the Department of Piombino (referred to as “Pb”) and “extraordinary” controls (referred to as “Str.”), which included controls in insular and rocky areas, monitoring of the areas with permanent bathing prohibitions due to pollution (mouths of rivers).

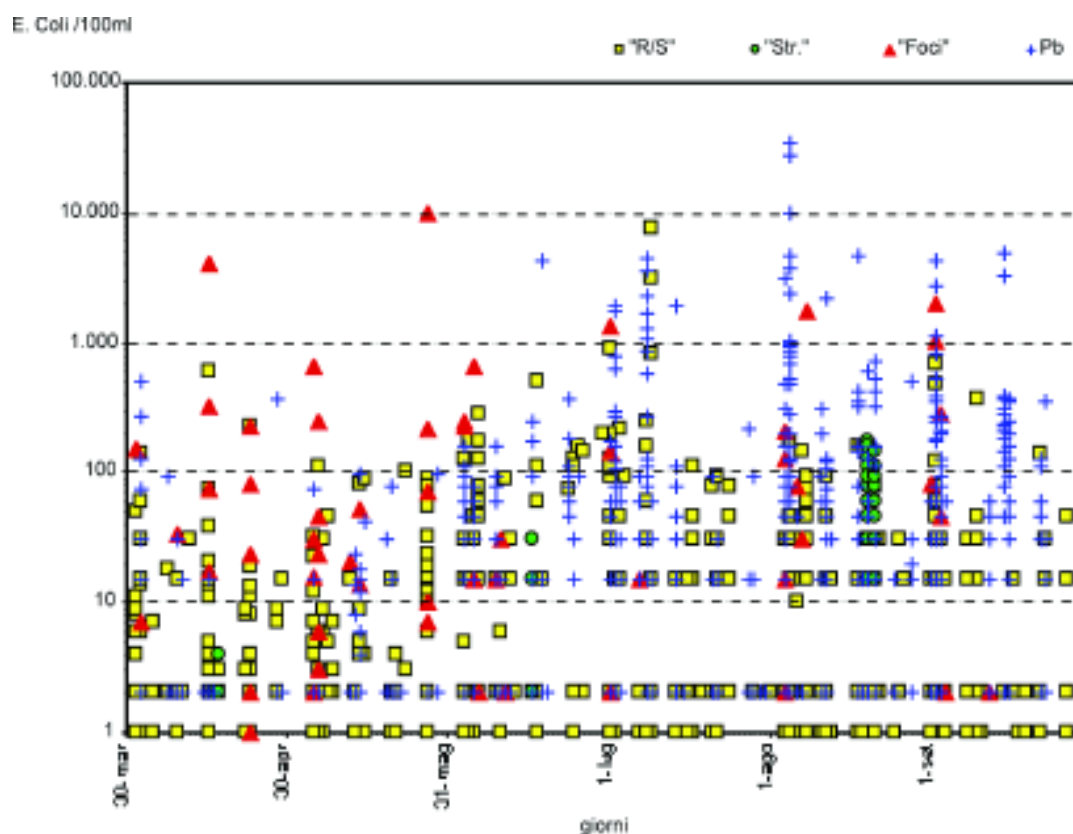


Figura 9

Variatione temporale da aprile a settembre 2003 degli EC nei campioni prelevati per il controllo “routinario” (R/S), “straordinario” (Str.), dei divieti permanenti per inquinamento (Foci) delle acque di balneazione toscane, con evidenziati i dati del Servizio di Piombino (Pb).

Time variation from April to September 2003 of the EC in the samples taken for the “routine” controls (R/S), “extraordinary” controls (Str.), and in the areas characterized by permanent bathing prohibition due to pollution.

Sebbene risulti difficile “vedere” un qualsiasi tipo di andamento legato all’evoluzione temporale, si può notare come le concentrazioni tendano leggermente ad aumentare verso il periodo di maggior frequentazione balneare (luglio-agosto). Questo potrebbe essere giustificato, oltre che da una maggior presenza di turisti, che possono mettere a du-

Although it appears difficult to identify a trend in time, it is, however, possible to notice that the concentrations tend to slightly increase in the period characterized by higher tourism flows (July – August). Thus, the phenomenon could be justified by the greater number of tourists that can really stretch to the full the purification systems

ra prova i sistemi di depurazione dei comuni costieri, anche da condizioni di temperatura dell'acqua più favorevoli per la sopravvivenza e/o proliferazione batterica. Quest'ultima condizione, durante la stagione 2003, è stata particolarmente importante.

Però, la gran parte dei campioni elevati appartiene alle zone controllate dal Servizio di Piombino (comuni di San Vincenzo e Piombino ed Isola d'Elba), che, come visto in precedenza, presentano anche i valori mediamente più elevati di tutta la Toscana.

Inoltre, se si tratta di condizioni climatiche ed antropiche generali (l'aumento del turismo balneare riguarda tutta la costa toscana) avremmo dovuto trovare lo stesso tipo di andamento per gli altri indicatori microbiologici. Invece, né i coliformi né streptococchi od enterococchi mostrano un analogo incremento in questo periodo (neppure in altri mesi), seppure debbano essere influenzati dagli stessi fattori.

4.3.4 I DATI NON ATTESI DI *ESCHERICHIA COLI*

I risultati non attesi come ricordato sopra, riguardano il parametro *E. coli* con una distribuzione non omogenea dei dati, la maggior parte essendo riferiti alle coste dell'isola d'Elba.

L'incertezza dei risultati di *E. coli* relativi ai metodi che utilizzano la tecnica delle membrane filtranti è stato calcolato nel seguente modo: per i valori di conteggio minore di 15 è stata utilizzata la Tabella A.1 allegata ad ISO 7218 Microbiology General rules for microbiological examinations, al valore 0 è stato attribuito per convenzione l'in-

of coastal municipalities, but also by the temperature of water that was more favorable to the survival and/or proliferation of bacteria. The latter condition was particularly important in the 2003 season.

The vast majority of the samples taken belong, however, to the areas controlled by the Department of Piombino (municipalities of San Vincenzo and Piombino, Elba Island), which, as mentioned above, show the highest values of the whole of Tuscany.

If the phenomenon were imputable to climatic and anthropic conditions (the number of tourists tends to increase along the whole coast of Tuscany), other microbiological indicators would show the same trend. However, neither the data of Coliforms nor those of streptococci show a similar increase in this period (or in the other months), though they have been influenced by the same factors.

4.3.4 THE UNEXPECTED DATA FOUND FOR *ESCHERICHIA COLI*

*Unexpected data as mentioned above, were found for the parameter of *E. coli* though data was non homogeneously distributed, as it was mainly referred to the coasts of the Elba island.*

*The uncertainty of the results of *E. coli* attained with methods using the technique of the filtering membranes was calculated as follows: Table A.1, enclosed to ISO 7218 Microbiology General rules for microbiological examinations was used for values below 15, by convention, range 1 was assi-*

tervallo del valore 1, per valori di conteggio maggiori di 15 UFC/100 ml è stato utilizzato il seguente intervallo:

$$C \pm 2 \sqrt{C}$$

dove C è il valore del conteggio riscontrato nel campione. Per ogni campionamento e per stazione, sono stati considerati risultati non attesi quelli relativi alla concentrazione di *E. coli* MPN/100 superiori rispetto a quelli relativi alla concentrazione di coliformi fecali e senza alcuna sovrapposizione tra i rispettivi intervalli di confidenza. Le stazioni interessate almeno una volta durante il periodo della balneazione, sono state oltre il 90% (59 su 65), i risultati non attesi sono stati il 20% sul totale dei campionamenti effettuati. Nella Tabella 3 sono riportati quelli relativi alle stazioni che hanno evidenziato concentrazioni di *E. coli* maggiori di 500 MPN/100 m. Dai pozzetti positivi relativi al campionamento di agosto della stazione n° 159 è stato isolato un ceppo batterico che è stato identificato come *Vibrio alginolyticus* (identificazione automatica, Vitek-Biomerieux).

Il fenomeno si è presentato con una certa consistenza nel mese di luglio ed ha interessato principalmente le stazioni situate nella parte occidentale dell'isola (Figura 10) a partire da Marina di Campo fino a Marciana Marina. Durante agosto si sono avuti la maggior parte dei casi, che hanno interessato la parte nord-orientale da Capo d'Enfola fino a Porto Azzurro. Il successivo calo a settembre ha visto concentrarsi i dati inattesi soprattutto lungo la costa che partendo dal Golfo Stella va verso punta della Calamita (Capoliveri).

Nel resto della Toscana questo fenomeno è stato molto contenuto, dove le stazioni interessate almeno una volta durante la stagione balneare 2003 sono state:

igned to value 0, while values above 15 UFC/100ml were assigned to the following range:

$$C \pm 2 \sqrt{C}$$

*where C represents the count found in the sample. For every sampling and station, unexpected results included all results with concentrations of *E. coli* MPN/100 above those of faecal coliforms, without overlapping the corresponding reliability ranges. The stations examined at least once during the bathing period, were more than 90% (59 out of 65), and the unexpected results were 20% of the total of the samplings carried out. Table 3 shows the data for the stations with concentrations of *E. coli* above 500 MPN/100 m. The positive wells of the August sampling of station no. 159 was used to identify the bacterial stock named *Vibrio alginolyticus* (automatic identification, Vitek-Biomerieux).*

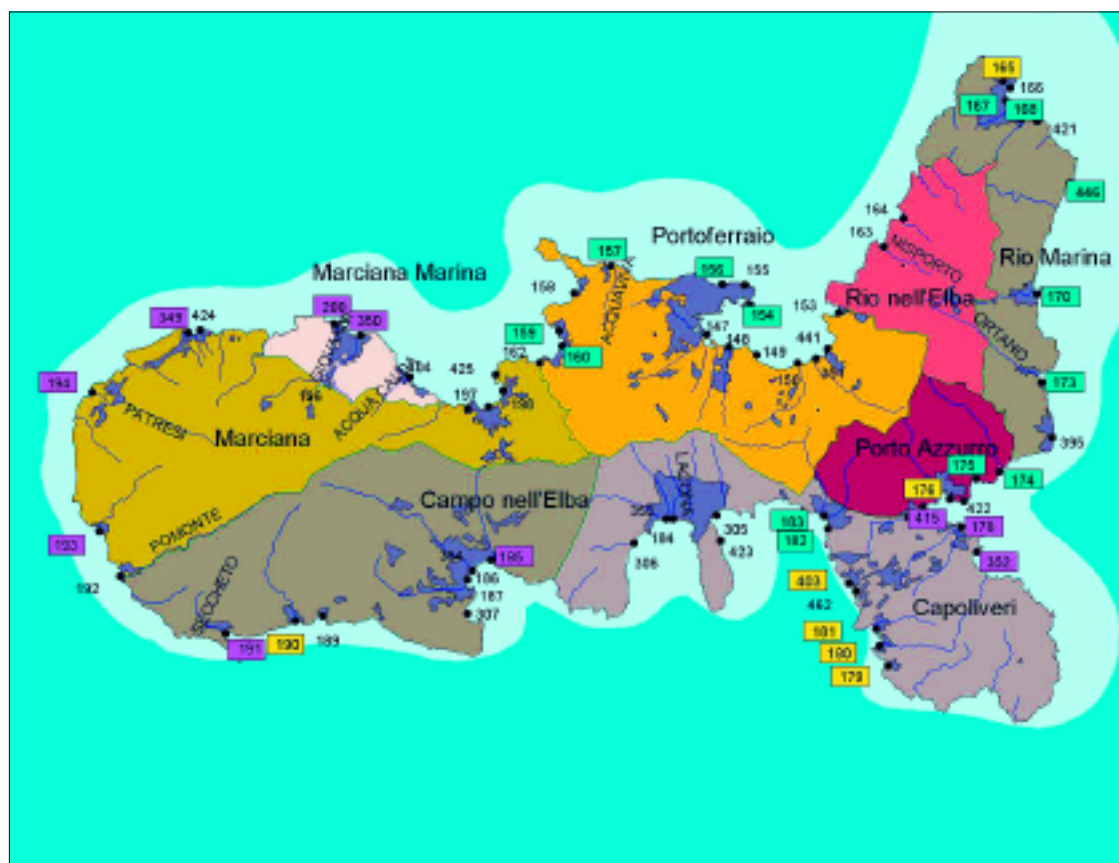
This phenomenon occurred with a substantial consistency during the month of July, mainly in the stations located in the western side of the island (Figure 10), from Marina di Campo to Marciana Marina. The vast majority of cases were reported in August, along northern-east coast from Capo d'Enfola to Porto Azzurro. In September, characterized by a decrease of values, the unexpected data were mainly concentrated along the coast, from Golfo Stella to Punta della Calamita (Capoliveri).

In the rest of Tuscany this phenomena was very limited, and the stations affected at least once during the bathing season 2003 were the following:

Figura 10

Rappresentazione cartografica dei punti con valori inattesi di *E. coli* lungo le coste dell'Isola d'Elba nei mesi di luglio (n), agosto (ri) e settembre (n) 2003

Cartographic representation of the sites with unexpected E. coli data along the coasts of the Elba Island, in the months of July, August and September 2003.



- 4 su 21 (2% sul totale dei campionamenti routinari e suppletivi) nella provincia di Massa Carrara ;
 - 0 su 16 nella provincia di Lucca;
 - 6 su 21 nella provincia di Pisa (3% dei campionamenti);
 - 0 su 85 nella provincia di Livorno esclusa l'Elba, Piombino e S. Vincenzo;
 - nei comuni di Piombino e S. Vincenzo le stazioni sono state 7 su 43, ma con una incidenza maggiore, circa il 19%, rispetto al totale dei campionamenti;
 - nella provincia di Grosseto 25 stazioni su 111 (4% dei campionamenti).
- 4 out of 21 (2% of the total of the routine and additional samplings) in the province of Massa Carrara;
 - 0 out of 16 in the province of Lucca;
 - 6 out of 21 in the province of Pisa (3% of samplings);
 - 0 out of 85 in the province of Livorno except Elba, Piombino and S. Vincenzo;
 - in the municipalities of Piombino and S. Vincenzo 7 out of 43 were affected, though with a greater incidence, involving about 19%, of the total samples;
 - 25 stations out of 111 (4% of samplings) in the province of Grosseto.

In alcuni casi, le differenze di concentrazione rispetto ai coliformi fecali sono state notevoli, raggiungendo anche 4 ordini di grandezza, e sicuramente non spiegabili con le diverse metodologie (MPN e MF) utilizzate.

In some cases, the differences of concentrations of faecal coliforms were remarkable, as they sometimes reached 4 orders and could definitely not be explained on the basis of the methods (MPN and MF) used.

Stazioni di campionamento		Data prelievo	Coliformi fecali (UFC/100mL) DPR 470/82	E. coli (MPN/100 mL) Metodo ISO 9308-3
Isola d'Elba (LI)	178	02/07/03	0	7.84 x10 ²
	153	02/07/03	2	6.33 x10 ²
	352	02/07/03	6	1.75 x10 ³
	415	02/07/03	0	1.93 x10 ³
	350	08/07/03	7.6 x10 ¹	4.50 x10 ³
	349	08/07/03	4	3.56 x10 ³
	185	08/07/03	2	1.71 x10 ³
	190	08/07/03	1.40 x10 ²	8.58 x10 ²
	191	08/07/03	8	1.06 x10 ³
	193	08/07/03	0	5.65 x10 ²
	194	08/07/03	0	2.28 x10 ³
	200	08/07/03	10	1.27 x10 ³
	181	14/07/03	2.4 x10 ¹	1.88 x10 ³
	176	05/08/03	10	9.55 x10 ²
	168	05/08/03	2	9.81 x10 ²
	170	05/08/03	8	6.90 x10 ²
	174	05/08/03	0	2.43 x10 ³
	175	05/08/03	0	1.03 x10 ³
	471	05/08/03	6	5.19 x10 ²
	154	05/08/03	0	7.78 x10 ²
	157	05/08/03	0	3.72 x10 ³
	160	05/08/03	6	8.65 x10 ²
	182	05/08/03	4	2.77 x10 ⁴
	183	05/08/03	4	>3.46 x10 ⁴
	167	05/08/03	2	4.75 x10 ³
	446	05/08/03	2	>3.46 x10 ⁴
	173	05/08/03	1.6 x10 ¹	9.83 x10 ³
	159	05/08/03	1.0 x10 ¹	>3.46 x10 ⁴
	156	05/08/03	1.0 x10 ¹	2.77 x10 ⁴
	179	02/09/03	6.0 x10 ¹	5.24 x10 ²
	180	02/09/03	0	8.05 x10 ²
	165	02/09/03	4	1.13 x10 ³
	181	02/09/03	0	2.71 x10 ³
	176	03/09/03	6	4.18 x10 ³
	190	15/09/03	1.4x10 ²	4.83 x10 ³
	403	15/09/03	0	3.28 x10 ³
Scarlino (GR)	216	02/09/03	0	6.90 x10 ²
	216	01/07/03	1	9.04 x10 ²
Piombino (LI)	346	18/06/03	2.0 x10 ³	4.18 x10 ³
	347	04/08/03	2	3.16 x10 ³
	347	18/08/03	6	4.75 x10 ³
	445	20/08/03	2.5 x10 ²	6.12 x10 ²
	141	21/08/03	6	5.24 x10 ²
S. Vincenzo	123	21/08/03	0	7.04 x10 ²

Tabella 3

Punti di campionamento che hanno evidenziato concentrazioni di *E. coli* superiori a 500 MPN/100 ml e significativamente maggiori rispetto a quelle di coliformi fecali.

Sampling sites with concentrations of E. coli above 500 MPN/100 ml, which were significantly higher than those of faecal coliforms.

Nella provincia di Pisa i risultati non attesi sono stati evidenziati soltanto nel mese di agosto impiegando il metodo ISO 9308-3, ma non con il metodo IRSA-CNR ISSN: 1125-2464 Metodo F, che ha fornito sempre valori uguali o inferiori ai coliformi fecali (Tabella 4).

Dal momento che i risultati di *E. coli* con IRSA-CNR ISSN:1125-2464 - metodo F erano compatibili con le concentrazioni di coliformi fecali, da ciascun pozzetto fluorescente, positivo cioè per *E. coli*, si è proceduto alla semina su Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX), terreno specifico per *E. coli* e previsto dal metodo F.

Il terreno TBX contiene il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-b-D-glucuronide (X-Gluc), che mette in evidenza la stessa attività enzimatica b-D-glucuronoidasica. In questo caso le colonie di *E. coli* sono evidenziate da una colorazione blu-verde: non tutti i pozzetti fluorescenti hanno poi evidenziato crescita di *E. coli* su TBX (Tabella 4).

Calcolando il valore di MPN considerando positivi soltanto quei pozzetti fluorescenti

In the province of Pisa unexpected results were found only in the month of August with the method ISO 9308-3, but not with method IRSA-CNR ISSN: 1125-2464 Method F, which always yielded values equivalent or below those of faecal coliforms (Table 4)

*Since the results of *E. coli* with IRSA-CNR ISSN:1125-2464 – method F were compatible with the concentrations of faecal coliforms, from every fluorescent well, that is positive to *E. coli*, an inoculation was carried out with Tryptone Bile X-glucuronic agar (TBX), considered specific for *E. coli* and referred to in method F.*

*Agar TBX contains the chromogenic compound 5-Br-4-Cl-3-indolil-b-D-glucuronide (X-Gluc), which has the same enzymatic b-D-glucuronidase activity. In this case the colonies of *E. coli* had a blue-green coloration: not all the fluorescent wells showed signs of growth of *E. coli* with TBX (Table 4).*

By calculating the value of MPN and considering positive only the fluorescent

Tabella 4

Punti di prelievo lungo il litorale pisano dove la concentrazione di *E. coli* con il metodo ISO 9308-3 è risultata superiore a quella dei coliformi fecali: confronto tra il metodo ISO 9308-3 classico, lo stesso dopo conferma su TBX ed il metodo IRSA-CNR ISSN:1125-2464 metodo F. Sono contrassegnate con * le stazioni per quali non si evidenzia alcuna sovrapposizione degli intervalli di confidenza, evidenziati tra parentesi.

*Sampling sites along the coast of Pisa where the concentration of *E. coli* measured with method ISO 9308-3 was above that of faecal coliforms: comparison between the traditional ISO 9308-3 method, after confirmation on TBX, and method IRSA-CNR ISSN: 1125-2464 method F. The asterisks (*) refer to sites without overlapping of reliability ranges, provided in brackets.*

Punti di prelievo	Coliformi fecali UFC/100mL	<i>E. coli</i>		
		Metodo ISO 9308-3 MPN/100mL	Metodo ISO 9308-3 dopo conferma su TBX MPN/100mL	IRSA-CNR ISSN:1125-2464 - metodo F UFC/100mL
33*	5 (2-12)	46 (15-142)	46 (15-142)	5 (2-12)
34	3 (<1-9)	15 (2-106)	<15	0
449	7 (3-14)	15 (2-106)	<15	7 (3-14)
36*	5 (2-12)	15 (2-106)	<15	5 (2-12)
366	29 (18-40)	61 (23-163)	15 (2-106)	29 (18-40)
367*	10 (5-18)	61 (23-163)	<15 5	(2-12)
368	26 (16-36)	30 (8-121)	<15 18	(9-26)
369*	15 (8-25)	234 (138-394)	<15 9	(4-17)
370*	6 (2-13)	77 (32-186)	<15 2	(<1-7)
44	4 (1-10)	15 (2-106)	15 (2-106)	3 (<1-9)
46	7 (3-14)	30 (8-121)	30 (8-121)	7 (3-14)
48*	2 (<1-7)	30 (8-121)	<15	0
372	14 (8-24)	46 (15-142)	<15	14 (8-24)

che avevano evidenziato crescita su TBX, i risultati ottenuti sono comparabili con quelli relativi al metodo IRSA. È interessante notare che proprio la stazione n° 369, che aveva dato il valore più elevato, è confermata con una concentrazione al di sotto del limite di rilevabilità del metodo ISO 9308-3.

È da sottolineare, inoltre, che il passaggio dal terreno liquido previsto del metodo ISO 9308-3, meno selettivo a quello solido, più selettivo, è stato effettuato dopo ben 72 h di incubazione nel terreno liquido, tempo sufficiente per far recuperare eventuali cellule stressate, e che i sali biliari, presenti nel TBX, sono universalmente riconosciuti come agenti selettivi per coliformi ed *E. coli*. Proprio sulla base di questa specifica capacità di crescita in presenza di sali biliari è formulata la definizione di *E. coli*.

Nel loro insieme, questi risultati indicano che particolari condizioni ambientali potrebbero interferire in maniera anche drammatica sui risultati ottenuti con questo metodo. Escludendo che vi possano essere stati errori nell'applicazione del metodo e non conformità relative ai reattivi utilizzati, la procedura metodologica è stata rigorosamente rispettata dal personale altamente qualificato, così come sono stati effettuati controlli di qualità sui reattivi, le ipotesi che possono essere fatte sono essenzialmente tre.

La prima ipotesi è che cellule di *E. coli* metabolicamente attive, ma incapaci di crescere, siano responsabili delle positività riscontrate. Questa evenienza è stata dimostrata da studi recenti che hanno evidenziato come condizioni di stress possano indurre la comparsa di cellule attive metabolicamente, ma non coltivabili.

wells only with a TBX growth, the results appear are comparable with those attained with method IRSA. It is very interesting to notice that station no. 369, which had the highest value, revealed a concentration below the threshold of method ISO 9308-3.

*It is useful to notice also that the transition from the liquid agar of method ISO 9308-3, less selective than the solid, was carried out after 72 hours of incubation in the liquid agar, i.e. after the time required to recover stressed cells, and that the bilious salts, present in TBX, are universally recognised as selective agents for coliforms and *E. coli*. The definition of *E. coli* has been formulated just according this specific capacity of growth in presence of the bilious salts.*

All in all, these results show that specific environmental conditions may significantly alter the results attained with this method. As the method was applied correctly the reagents used were compliant, the methodological procedure were strictly observed and carried out by fully qualified staff, and the quality controls were performed on reagents, three hypothesis that can be essentially made.

*The first hypothesis is that the metabolically active cells of *E. coli*, unable to growth, were responsible for the positive results found. This has been demonstrated by recent studies which have proved that conditions of stress may cause the appearance of metabolic active cells, but cannot, however, be reproduced in agar.*

Infatti, inoculando cellule di coliformi in acqua superficiale sterile, si evidenzia come aumentando il tempo di incubazione, la concentrazione batterica diminuisca, mentre i livelli di attività enzimatica rimangono costanti [3].

Se questa ipotesi fosse vera, dovremmo accettare l'idea che concentrazioni di *E. coli*, seppure stressate e danneggiate dall'acqua salata e/o da eventuali trattamenti disinfettanti, possano essere presenti nell'acqua di mare, almeno in alcune stazioni di campionamento, in concentrazioni paragonabili a quelle dei liquami.

È pur vero che nei mesi estivi, soprattutto agosto, l'incidenza del turismo sulla popolazione dell'isola d'Elba sia notevole e che, quindi, in conseguenza dell'aumento dei carichi inquinanti, si possano instaurare situazioni critiche per gli ecosistemi marini (scarichi di emergenza della pubblica fognatura, aumento delle portate delle condotte a mare di reflui non depurati, presenza di scarichi a dispersione retro-spiaggia che nei periodi di punta potrebbero interessare lo specchio acqueo ecc.). Inoltre, gli scarichi potrebbero, favoriti dalle condizioni meteorologiche, stratificarsi sulla superficie dell'acqua salata e concentrarsi in alcune aree. Tuttavia, è difficile pensare che concentrazioni così elevate di *E. coli* non siano accompagnate dalla presenza di altri indicatori, come gli enterococchi intestinali, che sono considerati gli indicatori più idonei per le acque marine, perché più resistenti. Questa ipotesi potrebbe, semmai spiegare quelle situazioni in cui *E. coli* raggiunge concentrazioni più elevate dei coliformi fecali, ma questi sono comunque presenti a livelli di attenzione.

Nel valutare le possibili interferenze non deve trascurato il possibile ruolo svolto dalle

In fact, the inoculation of cells of coliforms in sterile superficial water, shows that bacterial concentration decreases as incubation time increases, while the levels of enzymatic activity remain constant [3].

*If this hypothesis were true, we should accept the idea that concentrations of *E. coli*, although stressed and damaged by the salted water and/or eventual disinfectant treatments, could be present in the marine water, at least in some stations of sampling, in concentrations which are comparable to those of the sewage.*

*It is worth considering that during summer and in particular in August, the influence of tourism on the population of the Elba Island is remarkable and may cause, due to the increase of the polluting loads, critical situations for the marine ecosystems (emergency drains for public sewers, increase of in the flow of the pipes that convey non purified sewage to the sea, presence of drains in the rear of the beach which during the rush periods could also be conveyed into the sea etc.). Furthermore, climate conditions, could stratify drains on the surface of salted water with higher concentration in some areas. However, high concentrations of *E. coli* like those reported are generally associated to other indicators, as the intestinal enterococci, which are considered to be the most suitable indicators for the sea water, as they are more resistant. This hypothesis could explain, in some cases, why the concentrations of *E. coli* are higher than those of the faecal coliforms, which are always present with concentrations close to threshold values.*

The analyse of potential interferences must necessarily take into account the con-

alghe. Alcuni autori, infatti, hanno dimostrato che estratti di piante ed alghe possono significativamente interferire nei tests enzimatici per la ricerca di coliformi e *E. coli* sulla base della loro produzione di β -D-galattosidasi e β -D-glucuronidasi [4].

L'interferenza dipende dai livelli enzimatici rilasciati in condizioni naturali, dal fattore di diluizione, dal numero di cellule algali, ma potrebbe essere molto significativa in presenza di bloom algali. Proprio la presenza di particolari alghe in concentrazioni idonee potrebbe essere la spiegazione di una probabile interferenza nel metodo UNI EN ISO 9308-3:1998.

Infine, la terza ipotesi che può essere formulata è quella che prende in considerazione batteri non target, diversi cioè da *E. coli*, ma con attività β -D-glucuronidasica capaci di generare risultati falsi positivi. D'altra parte, interferenze di questo tipo sono state documentate in altri sistemi che mettono in evidenza la stessa attività enzimatica [5]. Alcuni microrganismi, inclusi *Aeromonas* spp. [6], *Pseudomonas* spp. [7], alcune *Salmonella* e *Shigella* spp. [8] [9], *Flavobacterium* spp. [10], possono produrre reazioni MUG-positive e portare, quindi, a risultati falsi positivi.

Va sottolineato che un fenomeno analogo al nostro è stato osservato nelle acque marine subtropicali della Florida [11], dove le concentrazioni di *E. coli* ottenute con un sistema enzimatico (Colilert 18) erano mediamente più elevate di 10 volte e contrastavano marcatamente con quelle dei coliformi fecali rilevate con il sistema delle membrane filtranti. Dopo una verifica, soltanto dal 17,1% dei pozzetti positivi era stato possibile coltivare *E. coli*, mentre molto facilmente veniva-

tribution of algae. Some authors have shown that extracts of plants and algae may remarkably interfere with the enzymatic tests of coliforms and E. coli, because of their capacity of producing β -D galactosidase and β -D- glucuronidase [4].

The interference originates from on the enzymatic levels released in natural conditions, the dilution factor, and the number of the algae cells, but could be very remarkable in presence of algae blooms. The presence of specific sea-weeds in suitable concentrations could explain the possible interference with method UNI EN ISO 9308-3:1998.

*Finally, there is a third hypothesis: the presence of non target bacteria, different from E. coli, but with a β -D glucuronidase activity able to produce false positive results. Some interferences of this kind have been found in other systems with the the same enzymatic activity [5]. Some microorganisms, including *Aeromonas* spp. [6], *Pseudomonas* spp. [7], some *Salmonella* and *Shigella* spp. [8] [9], *Flavobacterium* spp. (10), may produce MUG positive reactions and therefore we could obtain some false positive results.*

It is worth underlining that this phenomenon, similar to the one examined, has been observed in the sub tropical sea water of Florida [11], in which the concentrations of E. coli obtained with an enzymatic system (Colilert 18) were in average 10 times higher and in significant contrast with those of faecal coliforms found with the system of filtered membranes. After the control, only 17.1% of the positive wells enabled to cultivate E. coli,

no isolati *Vibrio alginolyticus* e *Photobacterium damsela*.

In questo lavoro, si rimarcava la scarsa conoscenza del plancton marino e delle sue variazioni spazio-temporali e la poca esperienza di questi metodi enzimatici su campioni di acque costiere, attribuendo i valori di *E. coli*, rispetto a quelli rilevati con il metodo classico delle membrane filtranti, ad interferenze con batteri autoctoni delle loro acque. Gli autori, inoltre, mettevano in evidenza il fatto che lo stesso metodo testato nelle acque più fredde della California non aveva dato problemi e che questo fatto poteva dipendere dalle particolari caratteristiche della zona di mare considerata.

Dal momento che proprio *Vibrio alginolyticus* è stato isolato da una stazione dell'isola d'Elba e che durante la stagione balneare 2003 è stato registrato un aumento significativo della temperatura dell'acqua, ci sono elementi sufficienti per ritenere che, anche in questo caso, batteri marini autoctoni abbiano potuto causare risultati "falsi positivi", magari favoriti dalle particolari condizioni climatiche.

Quindi, la nostra ipotesi è che si sia trattato di un fenomeno locale determinato da una particolare composizione del batterioplankton marino di queste acque. Infatti, a prescindere dai contaminanti fecali, il normale popolamento batterico delle acque costiere è molto ricco e diversificato, per quanto poco conosciuto, e, come tutte le altre componenti biologiche, subisce l'influenza dei fattori abiotici sia di tipo stagionale che non. Inoltre, le zone meno soggette all'impatto delle attività umane e dove il ricambio delle acque è sufficiente a mantenere elevata la qualità ambientale degli ecosistemi costieri possono,

while *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* were easy to isolate.

This work, was, however, characterized by a limited knowledge of marine plankton and of its space-time variations, and by a limited experience in the use of enzymatic methods with samples of coastal water; which explains why the values of E. coli, compared to those surveyed with the classic method of filtering membranes, were linked to interference with autochthonous bacteria present in the examined water. The authors themselves pointed out that the same method used in the coldest waters of California did not cause any problems probably because of the characteristics of the sea area examined.

The identification of Vibrio alginolyticus in one of the sampling sites of the Elba Island and the substantial increase of the temperature of the water during the 2003 bathing season provide sufficient grounds to assume that, even in this case, some marine autochthonous bacteria could have caused "false positive" results, perhaps also because of the favourable climatic conditions.

Therefore, our hypothesis is that this can be regarded a local phenomenon determined by a particular composition of the marine bacteria plankton of these waters. In fact, in spite of the faecal pollutants, the usual population of bacteria of the coastal waters is very rich and diversified, even if not very well-known, and, as all the other biological components, is affected by abiotic factors both seasonally and throughout the year. Besides, the areas which are less affected by the impact of the human activities and in which the change of water is sufficient to ensure a high environmental quality

meglio di altre, garantire una normale successione delle specie dominanti del popolamento batterico, così come di quello fitoplanctonico.

Le acque dell'Arcipelago Toscano, infatti, sono tra le più trasparenti e ricche in biodiversità, sono in gran parte sottoposte a vincoli di tutela ambientale (Santuario dei Cetacei, Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano, Riserva integrale dell'Isola di Montecristo, ecc.) e la stessa Isola d'Elba è circondata da praterie di *Posidonia oceanica*, che è considerata a buon titolo il miglior indicatore di uno stato ambientale elevato.

Non bisogna dimenticare, poi, che la distribuzione dei fattori biotici in natura non è omogenea e continua, come spesso si ha per i fattori chimici, e che una zona può differire anche sensibilmente da una vicina per l'insieme delle componenti animali e vegetali, senza che in questo vi sia nulla di straordinario o anomalo.

Sembra plausibile che, per quanto non abbiamo elementi certi su cui fondare questa ipotesi, nel periodo luglio-agosto 2003 nelle acque della zona di mare compresa tra l'Isola d'Elba e la costa prospiciente vi sia stato un cambiamento nella composizione del plancton, batteri e microalghe, che ha portato alla dominanza di una o poche specie, prima poco rappresentate. Queste "nuove" popolazioni microbiche potrebbero possedere lo stesso enzima (β -glucuronidasi) posseduto dall'*E. coli* e, quindi, interferire con l'analisi dei campioni sulla base del metodo ISO 9308-3. Di fatto, quindi, si andrebbero a contare come *Escherichia coli* anche ciò che non lo è, falsando il risultato analitico e, soprattutto, non avendo nessun legame con l'indicazione di contaminazione fecale.

of coastal ecosystems can guarantee, more than others, a normal succession of the ruling species of the bacteria population, as well as of phytoplankton.

The waters of the Archipelago of Tuscany, are in fact among the most transparent and rich in bio variety. Most of them are environmental protected (Sanctuary of the Cetacean, National Park of the Archipelago of Tuscany, Integral Reserve of the Island of Montecristo, etc.) and the Elba Island itself is surrounded by prairies of oceanic Posidonia, which is properly considered the best indicator of a qualitatively healthy environment.

Besides, it is useful to remember that the distribution of biotic factors in nature is not homogeneous and continuous, as for the chemical factors. Therefore an area may vary considerably from a neighbouring one in terms of the animal and vegetal components, without this being extraordinary or unusual.

*Despite the lack of supporting elements, it is reasonable to assume that, during the period July-August 2003, in the sea area between the Elba Island and the facing coast, there was a change in the composition of the plankton, bacteria and micro sea-weeds, which led to the dominion of one or some species, that had been very representative until then. These "new" microbial populations may have the same enzyme (β -glucuronidase) of *E. coli* and could have, therefore, interfered with the analysis of the samples with the method ISO 9308-3. Consequently, this could have led researchers to consider *Escherichia coli* other elements producing false analytic results and, overall, suggesting non existant lines with faecal contamination.*

The data available does not allow us to determine the planktonic organisms responsible for

Non possiamo affermare, 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. Non possiamo escludere, neppure, che vi possa essere l'apporto di organismi superiori (piante e macroalghe), considerando che la profondità estremamente ridotta delle acque di balneazione e la vicinanza alla riva potrebbe favorire una presenza significativa di sostanze in sospensione.

the interference, which could belong to the heterotrophic component (bacteria) as well as the autotrophic (phytoplankton) components. For the same reason, it is not possible to know whether there are a few species or larger groups. We cannot exclude that there could be the contribution of superior organisms (plants and macroalgae), as the shallowness of the bathing water and the proximity with the shore could provide ideal conditions for the development of high concentrations of suspended substances.

4.4. THE QUALITY OF BATHING WATER

4.4 LA QUALITÀ DELLE ACQUE DI BALNEAZIONE

4.4.1 COMPARISON OF THE 2000-2003 COEFFICIENTS

4.4.1 CONFRONTO COEFFICIENTI 2000-2003

Durante una precedente fase di revisione della direttiva europea, tra il 1999 ed il 2000, furono avviati alcuni studi specifici su cui basare alcune delle considerazioni presenti nella comunicazione della Commissione su “Una nuova politica per le acque di balneazione” (COM(2000)860 def.), soprattutto su valutazione di parametri, metodi e costi. In particolare una di queste sperimentazioni ha visto il coinvolgimento anche dell'Italia come caso studio e le attività inerenti furono coordinate dall'Istituto Superiore di Sanità, per conto del Ministero della Sanità di allora. Tale sperimentazione, denominata “Protocollo Balneazione 2000”¹², seguì le indicazioni del Comitato per le acque di balneazione della CE (riunione del

During a previous revision stage of the European Directive, around 1999-2000, specific studies were commissioned in order to analyze the considerations expressed in the Commission's communication regarding “A new policy for bathing water” (COM (2000)680 fin.), with specific reference to parameters, methods and costs. One of these studies was carried out in Italy also, where activities were co-ordinated by the Institute of Health on behalf of the Ministry of Health. The experimentation, known as “The 2000 Bathing Protocol”¹² was based on the recommendations of the Bathing Water Committee of the European Commission (established with the meeting of 28/10/99) and on the results of previous studies carried out in France, The Netherlands and United Kingdom.

¹² I risultati di questo studio, forniti nel 2001 alla CE, saranno presentati il 16 dicembre 2003, in uno specifico convegno organizzato dall'ISS a Roma.

¹² The results of this study, released in 2001 to EC, were presented on 16th December 2003, during convention organized by ISS in Rome.

28/10/99) e quanto emerso da precedenti studi di Francia, Olanda ed Inghilterra.

In Italia presero parte a questo Protocollo le Regioni Toscana, Marche ed Emilia Romagna, che si avvalsero per la parte operativa delle rispettive Agenzie ambientali. Le attività si svolsero durante la stagione balneare 2000 e riguardarono, in particolare, l'analisi di *Escherichia coli* ed enterococchi intestinali in alcuni punti (5 per ogni regione), selezionati in base alla qualità delle acque.

Oltre alla sperimentazione dei parametri e dei metodi (ISO 9308-3 per EC e ISO 7899-1 per EI) ed alla stesura di un profilo di spiaggia, con valutazione del rischio sanitario e dei costi previsti, furono indicati dei coefficienti di conversione per recuperare i dati preesistenti. Infatti, sia il profilo che la scelta delle stazioni dovevano essere basati sui risultati degli ultimi 5 anni di campionamento (1995-1999), durante i quali erano stati analizzati solo i parametri attualmente in vigore. Così, furono adottati dei coefficienti fissi per convertire i valori di Coliformi fecali in *Escherichia coli* e quelli di streptococchi fecali in enterococchi intestinali, che erano rappresentativi di un rapporto teorico tra questi parametri nel modo seguente:

$$EC/CF = 0.6 \quad 1 \text{ EC} = CF \times 0.6$$

$$EI/SF = 0.76 \quad 1 \text{ EI} = SF \times 0.76$$

Durante quella stessa sperimentazione, per quanto il numero di punti e di campioni non consentisse un'analisi conclusiva, si incominciò a dubitare della possibile applicabilità di questi coefficienti alle nostre acque, a causa, probabilmente, di caratteristiche ambientali (climatiche, biologiche, antropiche, ecc.) del tutto diverse rispetto alle coste atlantiche. Tale impressione viene confermata dai dati raccolti nel 2003 ed i rapporti risultano sperimentalmente assai diversi.

The Italian study actively involved the regions of Tuscany, Marche and Emilia Romagna, along with their respective environmental agencies that were responsible for following the operating aspects. The activities connected with the study were all carried out during the bathing season of 2000 and consisted in particular in the analysis of Escherichia Coli and intestinal enterococci in specific sites (5 for each region), selected on the basis of the quality of their water.

In addition to the experimentation of parameters and methods (ISO 9308-3 for EC and ISO 7899-1 for EI) and the preparation of a beach profile, which included evaluations on health risks and scheduled costs, the studies also aimed at determining specific conversion parameters for the recovery of existing data. Both the profile and the stations were to be selected according to the results attained in the samplings carried out in the previous 5 years (1995-1999), during which only the parameters in use had been examined. Fixed coefficients were therefore adopted in order to convert the values of faecal coliforms into those of Escherichia Coli and those of faecal streptococci into those of intestinal enterococci, which were considered representative of a theoretical relation between the parameters, as shown below:

$$EC/CF = 0.6 \quad 1 \text{ EC} = CF \times 0.6$$

$$EI/SF = 0.76 \quad 1 \text{ EI} = SF \times 0.76$$

Despite the impossibility of drawing a final conclusion due to the number of sites and samples, it was soon evident that these coefficients could not be applied to Italy, probably because of the specificity of the environmental (climatic, biological, anthropical, etc.) characteristics that substantially differed from those of the Atlantic coast. An impression that was later confirmed by the results attained in 2003 and by the substantial difference in the reports.

Considerando l'intero data set disponibile (sia del controllo "routinario", sia di quello "straordinario", sia del controllo dei divieti permanenti), si osserva come il rapporto EC/CF sia estremamente più variabile di quello EI/SF (Tabella 5), sia in termini di valori limite, tra minimo e massimo ci sono ben 6 ordini di grandezza nel primo (da 0.01 a 17.330) e solo 2 nel secondo (da 0.03 a 26), sia come deviazione standard. Se sulla base di questi dati volessimo calcolarci i fattori di conversione, in modo analogo a quelli proposti nel 2000, avremo dei risultati di difficile interpretazione e, certamente, assai diversi.

An analysis of the whole set of data (i.e. of the data referred to "routine" and "extraordinary" controls and to the controls carried out in areas with permanent bathing prohibitions) reveals that the EC/CF ration is extremely more variable than the EI/SF ratio (Table 4.1), in terms both of threshold values – there are 6 orders between the minimum and maximum value for the first ratio (from 0.01 to 26) and 2 only for the second one (from 0.03 to 26) – and of standard values. If these data were used to calculate the conversion factors, as occurred for the 2000 data, the results would undoubtedly be difficult to interpret and would vary considerably

Tabella 5

Caratteristiche dei rapporti EC/CF e EI/SF, calcolati su diversi data set del 2003.

Characteristics of the EC/CF and EI/SF ratios calculated on different data sets referred to 2003.

Data set	EC/CF						EI/SF					
	N	Max	Min	Dev.st	Media	95°ile	N	Max	Min	Dev.st	Media	95°ile
Tutti i dati	2676	17'330	0.01	524.9	25.89	10.17	2715	26	0.03	0.72	0.95	1.00
Senza Pb	1800	904	0.01	21.6	1.87	1.88	1792	26	0.03	0.86	0.99	1.24
Senza Pb e divieti Balneazione	1740	904	0.01	22.0	1.88	1.77	1713	26	0.03	0.81	0.98	1.17
					0.60						0.76	

Il rapporto EI/SF si stabilizza intorno ad 1, sia utilizzando la "media" che il 95° percentile, con una variabilità estremamente ridotta (dev. Std. 0.72), con un valore cioè che confermerebbe la sostanziale equivalenza dei due parametri (anche dal punto di vista tassonomico c'è chi usa i due termini senza distinzione), anche se leggermente più elevato di quello del 2000. Viceversa EC/CF è sempre molto superiore all'unità (ed al coefficiente del 2000), ed il fatto che la media sia oltre il doppio del 95% percentile segnala, insieme all'elevata deviazione standard, una distribuzione non omogenea dei dati.

Infatti, raggruppando i dati di EC/CF per classi discrete (intervallo di 0.1 unità), la distribuzione di frequenza (numerosità di ciascuna classe) mostra (Figura 11) un addensarsi dei valori verso le classi con rapporto inferiore ad 1, vicino a quello proposto nel 2000: ben il 95% dei dati ha un rapporto inferiore a 8 ed il 90% inferiore a 2. La classe EC/CF=1 rappresenta da sola il 65%

The data show that the EI/SF ratio stabilizes around 1, both when using the average and the 95° percentile, with an extremely low variability (standard deviation 0.72), which confirms the substantial similarity of the parameters (these two terms are used indistinctly also from a taxonomic standpoint, though the 2003 values are slightly higher than those referred to 2000. Vice versa, the EC/EF ratio is always significantly greater than 1 (and of the coefficient referred to year 200). The fact that the average is above the double of 95% percentile and the high standard deviation is indicative of a non homogenous distribution of data.

If the EC/CF data are grouped by discrete classes (ranges of 0.1 units), the frequency distribution (numerousness of each class) shows (Figure 11) a higher concentration of values in the classes with a ratio below 1, close to the one suggested for year 2000. Over 95% of the data has a ratio below 8, while 90% of data has ratio below 1. The EC/CF class repre-

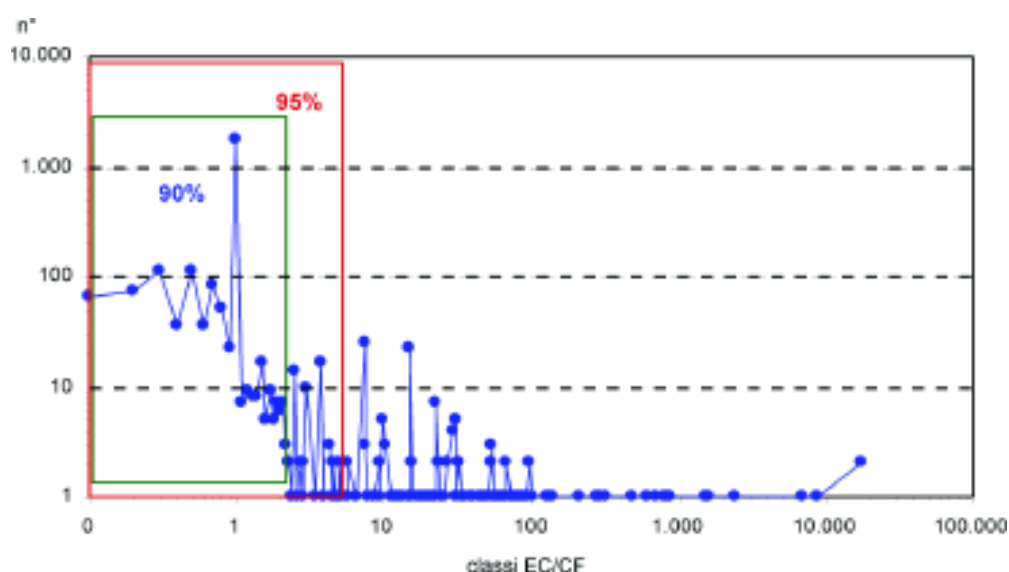


Figura 11
Distribuzione
di frequenza delle classi
del rapporto EC/CF
nei campioni del 2003.

*Distribution of the frequency of
the classes of the EC/CF ratios
in the 2003 samples.*

dei dati¹³ e la distribuzione sembrerebbe quasi bimodale, con una prima fascia di classi inferiori a 1 ed una seconda tra 2 e 100 distribuite in modo “normale” ed una lunga coda di classi poco rappresentate. Esaminando, poi, la distribuzione delle medie dei rapporti per ciascun singolo punto di balneazione (del controllo “routinario”), possiamo osservare come la maggior parte degli $EC/CF \gg 1$ siano riferiti a zone controllate dal Servizio Sub-provinciale di Piombino e, in particolare, alle coste dell’Isola d’Elba (Figura 12). Qualche altra situazione “anomala” con un rapporto compreso tra 1 e 5 unità si ritrova nelle altre zone di balneazione della costa toscana (soprattutto a Massa-Carrara), mentre nel settore settentrionale della provincia di Grosseto si arriva a rapporti EC/CF superiori a 10. Quest’ultima zona, corrispondente ai comuni di Follonica e Scarlino, è contigua a quella di Piombino ed è compresa all’interno del Golfo di Follonica.

I rapporti EI/SF , invece, sono inferiori a 1 in oltre il 90% dei punti (Figura 13), tranne nel tratto apuo-versiliense, con qualche caso superiore a 2, ed un paio di situazioni analoghe nel grossetano.

sents, alone, 65% of the data¹³, thus the distribution would appear bimodal, with a first range of classes below 1 and a second one ranging from 2 to 100, with an ordinary distribution, and a long list of less representative classes. An analysis of the distribution of the averages of ratios for each station (where routine controls were performed) shows that the vast majority of $EC/CF \gg 1$ data are referred to areas controlled by Department of Piombino and more specifically to the coasts of the Elba Island (Figure 12). Similar anomalous situations, with ratios ranging from 1 to 5 units, can also be found in other areas of the Tuscan coast (especially around Massa Carrara), while EC/EF ratios are all above 10 in the northern stretch of the coast around Grosseto. The latter area is part of the municipalities of Follonica and Scarlino, borders with Piombino, and is part of the Gulf of Follonica.

EI/SF ratios were instead below 1 in 90% of the sites (Figure 13), except in the stretch of the Apuan Alps and Versilia, where ratios were sometimes above 2, and in other areas in the province of Grosseto.

¹³ Nel caso di $EC=0$ e $CF=0$ è stato considerato un rapporto $EC/CF=1$ perché i due risultati analitici sono equivalenti, mentre se uno dei 2 termini era $=0$ il rapporto non è stato calcolato (NC).

¹³ An $EC/CF=1$ ratio was used for because the two analytical results are equivalent. When one of the 2 terms was $=0$, no ratio was calculated (NC).

4.4.2 RECUPERO DATI STORICI

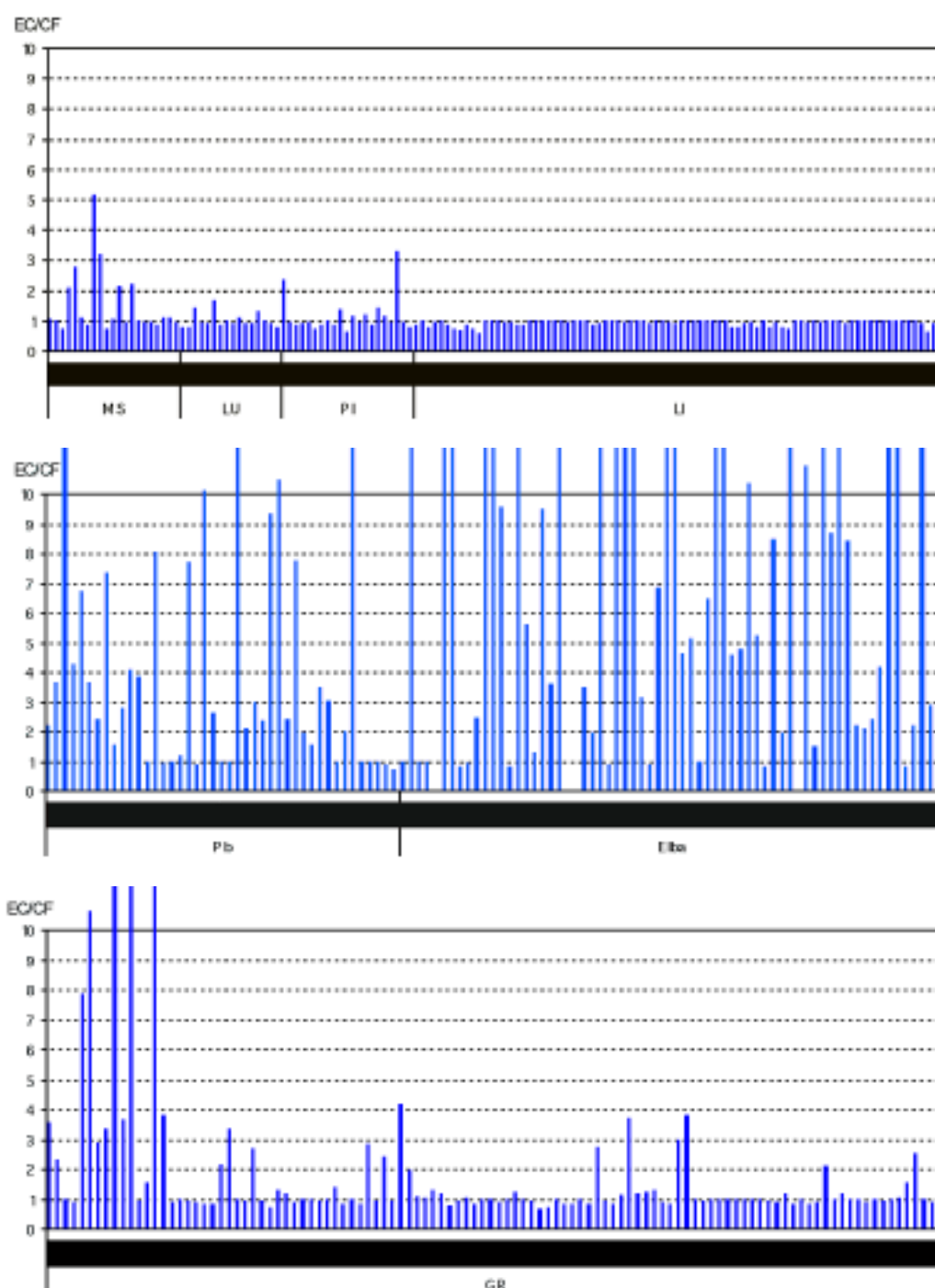
La necessità di ottenere una prima classificazione, per quanto “virtuale”, basata su un triennio di campionamenti (2001-03), come prescrive la proposta di direttiva, ha portato a cercare un coefficiente affidabile che consentisse il recupero dei dati pregressi di Coliformi e streptococchi fecali.

4.4.2 RECOVERY OF HISTORICAL DATA

The need of having an initial, though virtual, classification of data based on three years of samplings (2001-03), as stated in the draft directive, underlined the necessity of specifying a reliable coefficient for the recovery of previous data on faecal coliforms and streptococci.

Figura 12
Rapporto medio *Escherichia coli* vs. Coliformi fecali (EC/CF)
nei punti di controllo
delle acque di balneazione
in Toscana (dati 2003).

*Average Escherichia coli
vs. faecal coliforms (EC/CF) ratio
in the sampling points
examined in Tuscany
(2003 data).*



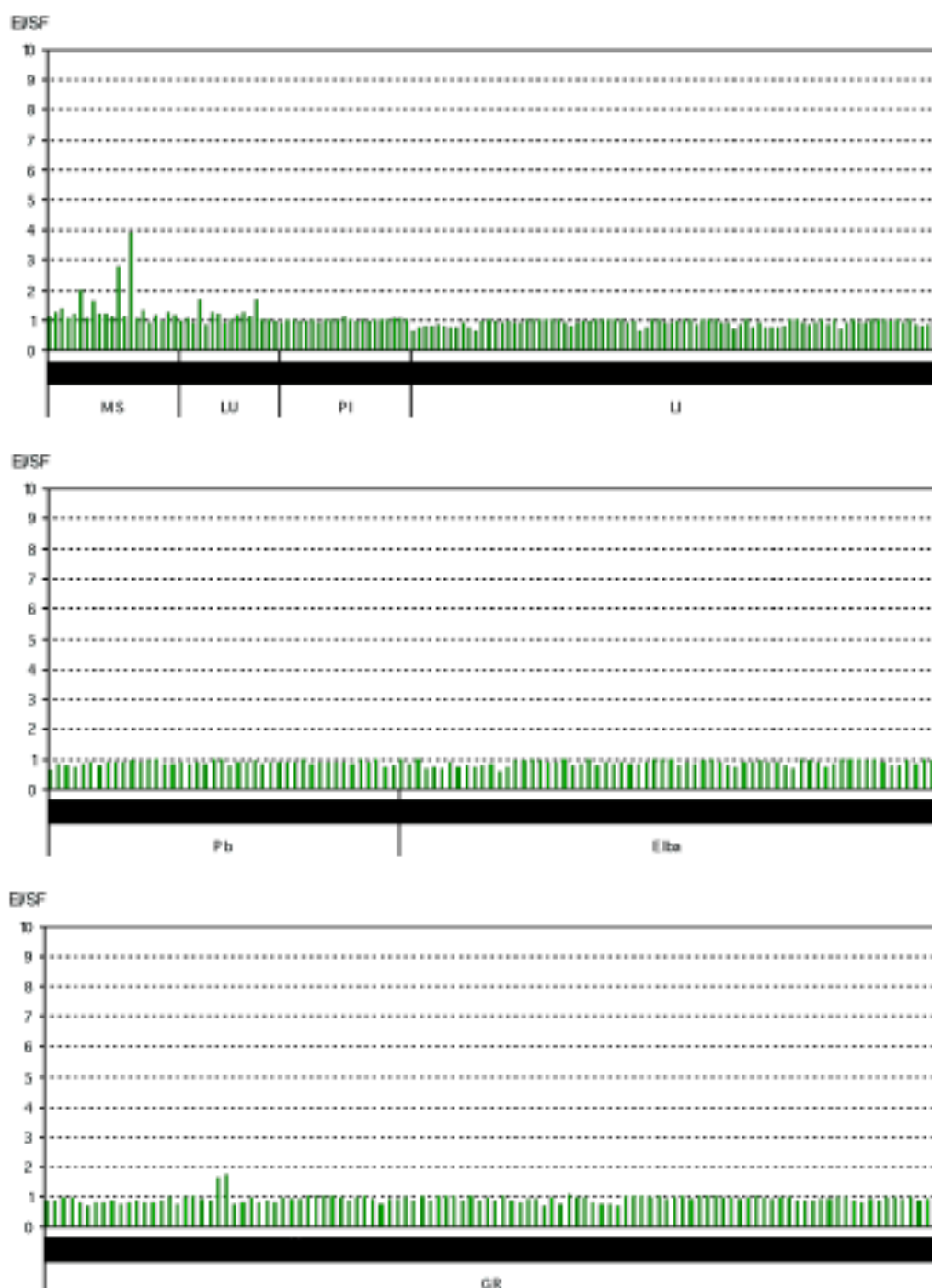


Figura 13

Rapporto medio enterococchi intestinali vs. streptococchi fecali (EI/SF) nei punti di controllo delle acque di balneazione in Toscana (dati 2003).

Average ratio between intestinal enterococci and faecal streptococci (EI/SF) in the tuscan sites where the quality of bathing water was controlled (2003 data).

Sulla base di quanto esposto nel capitolo precedente, si è evidenziata una non congruità dei coefficienti teorici proposti dalla Commissione Europea nel 2000, rispetto a quelli ricavati dalla nostra sperimentazione e, quindi, rispetto alle acque di balneazione toscane.

Del resto, anche l'estrema variabilità, sia in termini assoluti che come distribuzione

This necessity originated mainly from the fact that the results attained during experimentation and referred to Tuscan bathing water proved to be incongruent with the theoretical coefficients recommended by the European Commission in 2000, as explained in the previous chapter.

On the other hand, the extreme variability, both in terms of absolute values and distribution

di frequenza, del rapporto EC/CF calcolato sul data set complessivo del 2003, porta ad una invalidazione del rapporto EC/CF “teorico”, sia come media che come 95° percentile. Per ovviare a tale variabilità, dovuta, come detto, ad una situazione imprevedibile per i dati del Servizio di Piombino, si sono ricalcolati i rapporti eliminando i dati di Piombino, prima, e quelli di Piombino e del controllo dei divieti permanenti, poi (Tabella 5).

I nuovi rapporti EC/CF, come atteso, mostrano una deviazione standard nettamente inferiore e valori molto più prossimi all’unità, pur restando superiori (1.8-1.9), mentre i corrispondenti EI/SF non mostrano variazioni significative. Queste risultanze hanno portato a considerare il data set “senza Piombino” un giusto compromesso fra rappresentatività delle situazioni ambientali (comprendendo anche le zone critiche dei divieti), numerosità di dati ed omogeneità della distribuzione (confermata dal costante rapporto EI/SF).

Comunque, dato che la distribuzione dei rapporti EC/CF restava di difficile interpretazione e per una maggior cautela sono stati utilizzati come valori teorici sia la media che il 95° percentile. I coefficienti di conversione adottati sono:

Rapporto	Media	95°ile
EC/CF	1.87	1.88
EI/SF	0.99	1.24

Riguardo alla tutela della salute, tra l’altro, occorre puntualizzare che entrambe queste coppie di valori sono ampiamente più cautelative di quelli del 2000 e, pertanto, la classificazione risulterebbe, con questi ultimi, solo migliore.

frequency, of the EC/CF ratio calculated on the complete set of data of 2003, clearly demonstrated that the non validity of the “theoretical” EC/CF ratio both as average and as 95° percentile values. To solve this problem, originating from an unforeseen and unpredictable situation for the data collected by the Department of Piombino, it was necessary to recalculate the data excluding first the data of Piombino, then those of Piombino and of the areas with permanent bathing prohibitions (Table 5).

As expected, the new EC/CF ratios, showed a significantly lower standard deviation and yielded results closer to the unit, though still high (1.8–1.9), while the corresponding EI/SF ratios showed no significant variation. The set of data without the results of Piombino was considered acceptable, as it provided sufficient information on the characteristics of the environmental areas examined (which included also critical areas with permanent bathing prohibition), the numerousness of data and the homogeneity of distribution (confirmed by a constant EI/SF ratio).

Due to the complexity of interpreting the distribution of EC/CF ratios, it was however decided to use both the average and the 95° percentile as theoretical values. The conversion factors adopted were therefore:

Ratio	Average	95°ile
EC/CF	1.87	1.88
EI/SF	0.99	1.24

As far as human health is concerned, it is worth noticing that both these pairs of values are more limiting as compared to those of 2000. Thus, if the latter were used, the results could basically only improve.

4.4.3 IL 95° PERCENTILE

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} (m)
- iii) calcolare la deviazione standard dei \log_{10} (s)
- iv) 95° percentile = antilog ((m)+(1,65 x s))

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.

Del resto la definizione proposta del 95° percentile è quella di Bartram, J. e Rees, G. (*Monitoring Bathing Water*, 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 calco-

4.4.3 THE 95° PERCENTILE

The new Directive establishes that data should be classified using the 95° percentile and that calculations should be performed using the following methods:

- i) Acquisition of the \log_{10} of all lists of bacteria in the sequence of data*
- ii) Calculation of the arithmetic average of the \log_{10} (m)*
- iii) Calculation of the standard deviation of \log_{10} (s)*
- iv) 95° percentile = Antilog ((m)+(1,65 x s))*

This method poses the practical problem of having to convert the values below the method threshold (<15 UFC/100 ml in this specific case) in values other than zero in order to convert them into logarithms and attain reasonably different results in function of the value entered. From the operational point of view, the sequence of calculations may be rather complex, especially if the number of sites and samples is very high.

Although the method used is based on the definition of 95° percentile by Bartram, J. and Rees, G. (Monitoring bathing water, E. and F.N. Spon, London, 2000), it is worth noticing that there are other too that are widely used worldwide in the field of bathing water monitoring (Weibull, Hazen, etc.). Even Excel™, the software program by Microsoft offers an easily usable formula (which simply requires a few samples unlike other methods and does not foresee the conversion in log 10), which can accelerate testing especially when it is necessary to repeat the same calculation for nth number of times. This formula offers also the advantage of yielding results that are comparable and

lati 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.

4.4.4. LA CLASSIFICAZIONE

Per effettuare un confronto tra la situazione attuale e quella ipotizzabile con la nuova direttiva, abbiamo calcolato la classe di appartenenza di ciascun punto del controllo routinario delle acque di balneazione, sulla base del 95%ile dei valori di:

- EC e EI rilevati nel 2003 (=“Sperim. 2003”)
- di CF e SF del triennio 2001-03, convertiti rispettivamente in EC e EI, usando i coefficienti teorici calcolati come 95%ile dei valori del 2003 (=“2001-03 95%ile”)
- di CF e SF del triennio 2001-03, convertiti rispettivamente in EC e EI, usando i coefficienti teorici calcolati come media dei valori del 2003 (=“2001-03 media”)

Queste 3 classificazioni sono state confrontate con quella determinata dalla direttiva attualmente in vigore (76/160/CEE¹⁴), attribuendo la classe “scarsa” ai punti “non conformi” per i parametri microbiologici (Coliformi totali e fecali e streptococchi fecali), “eccellente” a quelli “conformi” con riduzione della frequen-

never below those resulting from the use of the method referred to in Enclosure II of the Directive.

In accordance with these considerations, we decided to adopt the formulation by Excel™ for the calculation of 95%ile.

4.4.4 CLASSIFICATION

To be able to compare the current situation with the one resulting from the application of the new directive, it was necessary to calculate the class of each site subjected to routine controls using the 95° percentile on the following results:

- *EC and EI values acquired in 2003 (2003 Experimentation);*
- *CF and SF values referred to years 2001-03, respectively converted into EC and EI values by using the theoretical coefficients calculated as 95° percentile of the 2003 values (95° percentile of 2001-03 values);*
- *CF and SF values referred to years 2001-03, respectively converted into EC and EI values by using the theoretical coefficients calculated as average of the 2003 values (average of the 2003 values);*

The three classifications were then compared with those of the current Directive (76/160/EC)¹⁴. As a result, class “poor” was assigned to site with “non compliant” microbiological parameters (total and faecal coliforms and faecal streptococci), class “excellent” was assigned to site with “compliant” parameters for which the frequency

¹⁴ Il DPR 470/82 che ha recepito questa direttiva introduce, soprattutto con alcune norme di modifica successiva, alcuni meccanismi non previsti originalmente e per uniformità si è optato per un confronto tra direttiva europea in vigore e quella proposta con riferimento ai soli parametri microbiologici.

¹⁴ DPR 470/82, which implements the Directive, and more specifically subsequent amendments, introduce new mechanisms that had not originally been defined. For consistency purposes, the comparison between the microbiological parameters was carried out only between the current directive and the draft one.

za di controllo (in base ad una conformità per almeno 3 anni consecutivi) e “buona” a quelli “conformi” senza riduzione. Si deve, inoltre, segnalare come questo confronto puramente formale, non abbia che pochi riscontri dal punto di vista funzionale, sia per l’attuale assenza di un giudizio di qualità che per gli adempimenti previsti sulla base delle diverse classi.

Nella rappresentazione grafica delle percentuali di punti così classificati (Figura 14), è stata introdotto un ulteriore raggruppamento effettuato sui dati sperimentali del 2003, non considerando i punti controllati dal Servizio di Piombino (“Sperim. 2003 senza Pb”), che sono risultati di dubbia interpretazione.

Appare chiaro (Figura 14) che, pur nell’improprietà della comparazione tra conformità e classe di qualità, la situazione delle acque di balneazione toscane non dovrebbe essere fortemente influenzata dall’applicazione della nuova direttiva. Infatti, le differenze maggiori appaiono se confrontiamo i dati del 2003 su tutti i punti con quelli della direttiva attuale: sommando le 2 classi “conformi” (buona ed eccellente) si raggiunge il 91% contro quasi il 99% attuale. In realtà, se escludiamo i punti di Piombino, anche con i dati del 2003 arriviamo

of controls was reduced (i.e. when compliance was persistently found over a period of 3 consecutive years), class “good” was finally assigned to “compliant” sites with no reduction in the frequency of controls. It is useful to underline that this purely formal comparison cannot be supported with many functional elements, because of the non availability of both quality assessments and actions required in relation to the specific classes.

In the graph, the sites defined with the described method (Figure 14) were divided in further groups on the basis of the data resulting from the 2003 experimentation and excluding the sites controlled by the Department of Piombino (2003 Experimentation with Piombino), which yielded dubious results. Despite the inaccurate data resulting from the comparison of compliance and class of quality, it appears evident (Figure 14) that the situation of Tuscan bathing water should not be significantly influenced by the implementation of the new Directive. Striking differences are in fact evident only if the 2003 data of all the sites are compared with the results of the current Directive. The sum of the 2 “compliant” (classes good and excellent) yields a value of 91% as compared to the current 99%. The percentage continues to be 98% even if we exclude the data of Piombino and

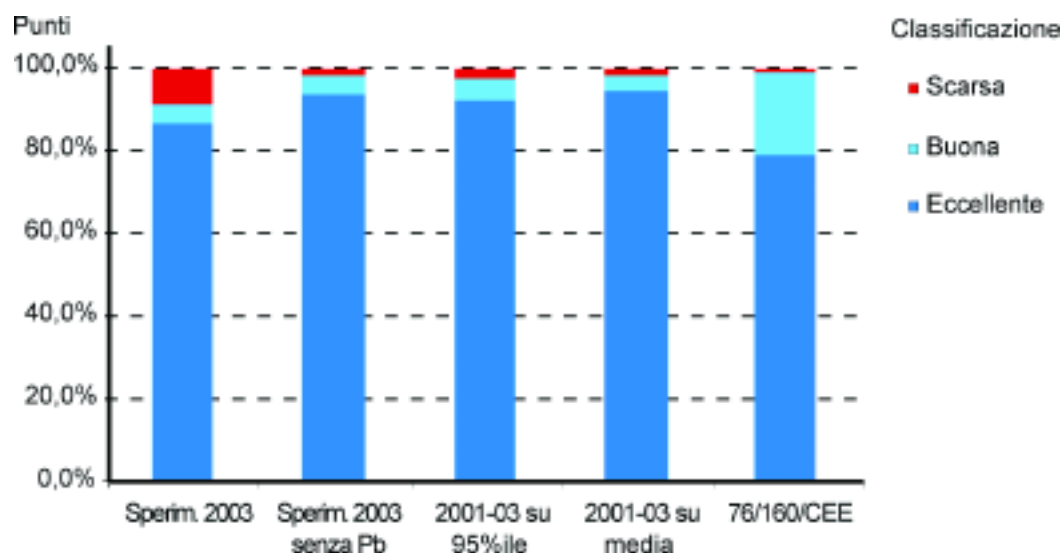


Figura 14

Classificazione dei punti di controllo delle acque di balneazione sulla base dei dati sperimentali del 2003, di quelli del triennio 2001-03 e del DPR 470/82 (ulteriori spiegazioni nel testo).

Classification of control sites on the basis of the experimental data of 2003, of years 2001-03 and DPR 470/82 (see text body for further details).

al 98% e tale situazione resta di fatto immutata estendendo la classificazione ai dati (convertiti) del triennio 2001-03.

Queste considerazioni, alla luce di quanto detto per l'uso dei coefficienti e della formulazione adottata del 95°ile, devono essere ancor più soddisfacenti: infatti le classi così ottenute sono le più restrittive possibili e, probabilmente, descrivono una situazione non del tutto reale.

Andando a dare un breve sguardo a livello territoriale (tabella 4.II dell'Allegato 4), senza considerare i casi di classe “buona” e non “eccellente” corrispondente ad una attuale conformità, le (poche) differenze (classe “scarsa” e “conforme”) sono ritrovabili in 1 punto a Massa (“Sinistra Frigido”) e, soprattutto, nella zona controllata dal Servizio di Piombino: 1 punto (“Punta Sud”) a San Vincenzo, a Porto Azzurro (“Spiaggia La Rossa”) ed a Marciana Marina (“Fosso di Lavacchio”) e 2 punti a Piombino (“Salivoli” e “Perelli”).

In tutti questi casi si tratta di zone che, pur essendo attualmente conformi, hanno avuto (nell'anno 2003 o nei precedenti) episodi di contaminazione più o meno intensa, che, in qualche caso, ha portato alla chiusura della balneazione. Quindi, la classificazione non fa altro che segnalare, in modo più opportuno, la presenza di situazioni con un rischio di inquinamento più elevato del normale.

include those of 2003. Thus, the situation does not substantially change if the (converted) data classification of years 2001-03 is included.

These considerations are even more satisfactory if we take into account the considerations regarding the use of coefficients and the adoption of the formula based on 95° percentile, as the resulting classes represent particularly restrictive classes that do not reflect reality.

If we briefly examine the territory (Table 4.II of Enclosure 4), without verifying whether classes “good” and not “excellent” correspond to a true conformity, we notice that the (few) differences (for classes “poor” and “compliant”) are located in one site of the province of Massa (“Sinistra San Frigido”) and, above all, in the area controlled by the Department of Piombino: 1 site (“Punta Sud”) at San Vincenzo, Porto Azzurro (“Spiaggia La Rossa”) and Marciana Marina (“Fosso di Lavacchio”) and 2 sites at Piombino.

The cases reported refer to areas that are currently compliant but that have suffered minor or severe episodes of contamination in the past (in year 2003 or in previous years), which have sometimes led to the prohibition of bathing activities. Thus, the classification only offers more appropriate information on the existence of potentially risks of pollution.

4.5 CONCLUSIONI

4.5.1 Confronto tra i parametri, attuali e proposti

4.5 CONCLUSIONS

4.5.1 COMPARISON BETWEEN THE CURRENT AND PROPOSED PARAMETERS

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 batteri marini autoctoni, suggerita durante il periodo agosto-settembre in molte zone dell'Elba e costa limitrofa, 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.

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, laddove i due metodi sono stati applicati in parallelo, 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.

Intestinal enterococci can be easily used instead of faecal streptococci as they practically belong to the same group for marine water without any consequences in terms of classification (proposed) or significance. The method used never presented problems and the relation between the current and proposed parameters was always evident, both for spatial and time variations (if present), showing no significant difference.

This cannot be said of faecal coliforms and Escherichia Coli, both because of the specificity of their composition and because of the methods used, especially when based on different principles (selected agars or enzymatic reactions). The problem of false positive results and the suggested interference with autochthonous sea bacteria, reported during August-September in many areas of the Elba and the neighbouring coast, have caused significant variations in the bacterial concentrations. The variation of local and seasonal conditions seems to significantly influence this parameter, altering results, regardless of the presence of faecal contamination.

*This potential interference does not support the use of method UNI EN ISO 9308-3:1998 for the classification of Italian bathing waters and explains why **IRSA CNR ISSN: 1125-2464 Method F is far more suitable in this case.** Whenever both methods have been applied in parallel, results have shown that both can be regarded as perfectly equivalent only when there are no substantial differences in the concentrations of faecal coliforms. However, in presence of significant differences, expected results can be attained only with method IRSA CNR.*

Therefore, the fact, that intestinal enterococci

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.

show a remarkable relation with the streptococci and a limited correspondence with faecal coliforms, indicates that this parameters could replace, for overall and specific significance, the current indicators of microbiological contamination, thus enabling the parameter of E. coli to be used only as additional parameter. These considerations, however, are currently in contrast with the draft directive, where both indicators are considered equivalent for all types of water, although WHO's health protection recommendations were referred to internal waters and to sea water only as far as enterococci were concerned.

4.5.2 CLASSIFICATION AND CONFORMITY

4.5.2 CLASSIFICAZIONE E CONFORMITÀ

Il confronto effettuato tra il sistema attuale (direttiva 76/160/CEE) di attribuzione della conformità in base ai fattori microbiologici e quello proposto (COM (2002)581 def.) per la classificazione di qualità, sui dati del 2003, mostra delle differenze significative solo se si prendono in considerazione i

The comparison carried out between the current system (directive 76/160/EC) for the attribution of conformity on the basis of microbiological factors and the proposed one (COM (2002)581 fin.) for the classification of quality, referred to 2003 data shows significant differences only if we take into consideration the sites controlled by the department of Piombino

Tabella 6

Punti di controllo delle acque di balneazione classificati sulla base dei dati della sperimentazione 2003, di quelli del triennio 2001-03 e della direttiva 76/160/CEE.

Sites classified in accordance with the 2003 experimentation data, the 2001-03 data and directive 76/160/EC.

Classe	Punti di balneazione							
	Scarsa		Buona		Eccellente		Totale	
Sperimentazione 2003	33	9%	17	5%	313	86%	363	
Sperimentazione 2003 senza Pb	5	2%	12	5%	236	93%	253	
2001-03 su 95%ile	11	3%	18	5%	334	92%	363	
2001-03 su media	8	2%	14	4%	341	94%	363	
76/160/CEE	5	1%	72	20%	286	79%	363	

punti controllati dal Servizio di Piombino (soprattutto relativi all'Isola d'Elba): in questo caso sarebbero molti (il 25%) i punti a subire un netto peggioramento, da conformità a classe "scarsa".

Se, invece, tali campioni non vengono considerati, attribuendone la variazione a problemi

(applicable mainly to the Elba Island): in this case many of these sites (25%) would suffer a sharp deterioration, i.e. would be classified as "poor" instead of "compliant".

If these samples are not taken into account and the variations were related to methodolog-

metodologici ed a falsi positivi, la situazione è quasi identica con il 93% dei punti in classe “eccellente”, il 5% in classe “buona” (99% conforme attualmente) e 2 % in classe “scarsa” (1% Non conforme).

Da questo quadro, apparentemente, stabile, in realtà discendono diverse conseguenze pratiche, sia in termini di frequenze di campionamenti sia come analisi e controllo dei fattori di rischio. Infatti, con la normativa attuale (direttiva 76/160/CEE e

ical problems or false positive results, the situation would be almost equivalent, with 93% of the sites in class “excellent”, 5% in class “good” (99% compliant at present) and 2% in class “poor” (1% not compliant).

This situation, which is apparently stable, leads to different practical consequences, both in terms of sampling frequency and in terms of analysis and monitoring of risk factors. In fact, with the current laws set (directive

Parametro	Limite Guida		Limite Imperativo	
	valore	conformità	valore	conformità
Coliformi totali /100ml	500	80%	10.000	95%
Coliformi fecali /100ml	100	80%	2.000	95%
streptococchi fecali /100ml	100	80%	—	

DPR 470/82 come modificato dalla L. 422/2000) nel caso di un punto non conforme per i parametri microbiologici (vedi Tabella 7) si può attivare un divieto temporaneo alla balneazione, valido per tutta una stagione, continuando, però, i controlli con la frequenza bimensile.

Lo stesso controllo deve essere sempre attuato anche per i punti conformi, salvo il caso di una elevata qualità mantenuta per più anni consecutivi (almeno 2 per il DPR 470/82), che consente di ridurre i prelievi ad una frequenza mensile: in Italia, dove la stagione balneare è genericamente compresa tra il 1° maggio ed il 30 settembre, si passa da 12 campioni l’anno (2 al mese per 5 mesi balneari + 2 nel mese precedente l’inizio della stagione) nella situazione normale a 6 nei casi migliori. Invece, la classificazione nelle 3 classi di qualità permette una diversa frequenza di campionamento (e di aggiornamento del profilo delle acque di balneazione, da triennale ad annuale, secondo l’Allegato III della proposta), minore nelle situazioni di qualità eccellente e maggiore nelle situazioni critiche (Allegato IV della proposta).

76/160/EC and DPR 470/82 as amended by L. 422/2000) it is possible to set up a temporary bathing prohibition, valid for the whole season, scheduling controls with a frequency of two months for sites with non compliant microbiological parameters (see table 7).

The same control must always be carried out also for compliant sites, except when high quality is present for several consecutive years (at least 2 as per DPR 470/82), as this condition enables to reduce the acquisition of data with a monthly frequency. In Italy, where the bathing season generally starts on May 1st and ends on September 30th, there is a shift from 12 samples per year (2 per month for 5 bathing months + 2 in the month preceding the beginning of the season) to the ordinary situation that foresees 6 samplings in the best of cases. The classification in 3 classes of quality enables to select a different frequency of sampling (and to update the profile of bathing water, from every three years to once a year, as per Enclosure III of the proposal), increasing or reducing it according to the criticalness of the situation (Enclosure IV of the proposal).

Tabella 7

Criteria stabiliti dalla direttiva 76/160/CEE per la conformità delle acque di balneazione sulla base dei soli parametri microbiologici.

Criteria established by the directive 76/160/EC for the conformity of bathing water in accordance with microbiologic parameters only.

Se riferiamo queste frequenze alla realtà italiana, dove i 5 mesi corrispondono a qualcosa di più di 5 periodi di 4 settimane ciascuno, come viene definito il mese standard nell'Allegato IV

If we refer these frequencies to the Italian reality, where the 5 months correspond to something more than 5 periods of 4 weeks each, which represent the standard month's

Tabella 8

Prelievi previsti dalla proposta di direttiva europea in base alla classificazione delle acque di balneazione.

Collections foreseen by the proposal of the European direction in accordance with the classification of the bathing waters.

Ambito temporale	Qualità eccellente		Qualità buona		Qualità scarsa	
	camp. al mese	In Italia ¹⁵	camp. al mese	In Italia	camp. al mese	In Italia
3 anni	0,5	2,5 + 1 = 4	1	5 + 1 = 6	2	10 + 1 = 11
6 anni	0,25	1,25 + 1 = 3	0,5	2,5 + 1 = 4	2	10 + 1 = 11

della proposta, considerando che prima dell'inizio della stagione deve essere fatto almeno un prelievo, possiamo renderci conto di come potrebbe cambiare il numero complessivo di prelievi per ogni punto (Tabella 8), arrotondando i valori per eccesso.

definition in Enclosure IV of the proposal, and we take into consideration that at least one sampling is carried out before the beginning of the season, we may realize how to change the total number of collections per site (table 8), and round up the values.

Tabella 9

Numero di campioni da prelevare per il controllo delle acque di balneazione in Toscana sulla base dei diversi criteri di classificazione.

Number of samples to be collected for the control of the bathing waters in Tuscany in accordance with the different criteria of classification.

Criteri di classificazione	Dopo 3 anni					Dopo 6 anni				
	Scarsa	Buona	Eccellente	Totale	Diff	Scarsa	Buona	Eccellente	Totale	Diff
Sperim. 2003	363	102	1.252	1.717	-12%	363	68	939	1.370	-23%
2001-03 95%ile	121	108	1.336	1.565	-19%	121	72	1.002	1.195	-33%
2001-03 media	88	84	1.364	1.536	-21%	88	56	1.023	1.167	-34%
76/100/CEE ¹⁶	60	168	1.716	1.944		60		1.716	1.776	100%

Possiamo ora prevedere quale sarebbe l'impatto per la Toscana dal punto di vista operativo, confrontando la situazione dei prelievi fatti in base all'attuale criterio (76/160/CEE) con quelle derivanti dalla classificazione proposta, effettuata sulla base di diversi criteri (coefficienti), visti in precedenza.

This would allow us to determine the impact for Tuscany in operational terms, and to compare the situation of the samplings made in accordance with the present criteria (76/160/EC) with those mentioned in the proposed classification, which is carried out with different criteria (coefficients) as explained above.

¹⁵ La stagione balneare in Italia, come definita dal DPR 470/82 art 2 comma c), va dal 1° maggio al 30 settembre per 152 giorni suddivisibili in 5 periodi di 4 settimane (mese) con il resto di 1-2 settimane, a cui deve essere sempre aggiunto almeno 1 campione nella settimana prima dell'inizio della stagione.

¹⁶ In realtà questa situazione attuale è puramente teorica, perché alcuni Dipartimenti, in base alla conoscenza delle problematiche locali e per rispondere a diverse esigenze, non usufruiscono della possibilità di riduzione delle frequenze di prelievi, al punto che nel 2003 sono stati prelevati quasi 2.800 campioni "routinari".

¹⁵ The bathing season in Italy, as determined by DPR 470/82 art. 2 paragraph c), goes from 1st May to 30th September, for 152 days subdivided in 5 periods of 4 weeks (month) with the rest of 1-2 weeks, to which we must always add at least 1 sample in the week before the beginning of the season.

¹⁶ The current situation is theoretical only, as some Departments, more familiar with local problems and aware of the necessity of meeting different needs. In 2003, for example, nearly 2,800 "routine" samples were taken.



5. GLI APPROFONDIMENTI DEL PROGETTO SPERIMENTALE

5. IMPROVEMENTS OF THE EXPERIMENTAL PROJECT

Il risparmio dopo la classificazione del primo triennio oscillerebbe intorno al 20% di campioni, per arrivare fino ad 1/3 dopo 2 periodi consecutivi (6 anni). Lo stesso risparmio potrebbe essere stimato per i costi legati a questo monitoraggio ed ancora di più, se consideriamo la necessità di mantenere impegnati un minor numero di operatori e strutture dedicate.

The reduction after the classification of the first three years would fluctuate around 20% of samples, and finally reach 1/3 after two consecutive periods (6 years). An equivalent reduction could be estimated for the costs of monitoring and of employment, due to the smaller number of operators and structures involved.

Di fronte a problematiche inattese (vedi par. 4.3.4) e le cui spiegazioni da un punto di vista scientifico sembrerebbero, allo stato attuale delle nostre conoscenze, non acclarate, la necessità di maggiori approfondimenti sorge spontanea. Così come altrettanto necessario sembra essere il reperimento di ulteriori dati per sostanziare alcune delle conclusioni estratte dalla sperimentazione del 2003, anche in considerazione delle condizioni climatiche del tutto anomale dell'estate passata (assenza di precipitazioni, elevate temperature, stabilità della colonna d'acqua, ecc.).

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.

La sperimentazione sarà, però, ulteriormente adeguata alla proposta di Direttiva attualmente in discussione presso il Parlamento ed il Consiglio Europeo, soprattutto per quanto riguarda le zone da sottoporre alla sperimentazione per il controllo delle acque di balneazione.

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».

È solo con la norma italiana di recepimen-

To be able to meet unexpected problems (see par. 4.3.3) and provide scientific clarifications that cannot be currently provided, it shall evidently be necessary to examine the issue more closely. It will be equally necessary to find other data to support some of the conclusions attained with the experimentation of 2003, also in consideration of the unusual climatic conditions of last summer (absence of rains, high temperatures, stability of the water column, and so on).

Therefore, in agreement with Region of Tuscany and ARPAT, it has been decided to continue the experimentation the intestinal enterococci and Escherichia coli even during the sampling season 2004, along with the routine controls on bathing water, as foreseen by current laws.

The experimentation will however be aligned with the requirements of the draft directive being discussed by the Parliament and European Council, especially when it comes to the selection of the sites to be controlled.

The definition of bathing area as a place in which there are bathing waters (art.1 paragraph b), was already mentioned in the European directive of 1976 (76/160/EC), without any predictability as to the extension, which was to be decided by single member States. Art. 4 paragraph 2, clearly establishes that bathing areas have to be "created by the competent authorities of the members States" and that they have to be "specifically equipped for bathing".

It was the Italian implementation law

to (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 di riferimento 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 note-

(DPR 470/82) to first introduce (first line of paragraph of the Enclosure 2 "Technical regulations") a kilometric limitation: "usually the distance between two neighbouring sites of collection should not exceed 2 km and suitably reduced in areas with a high bathing density", despite the use of original phrasing (art. 2 paragraph b) and the assignment of the task of selecting the most suitable areas to the regional administrations (art. 4 paragraph b).

This standpoint is clearly opposed to all the inspiring principles for a correct management of coastline areas, for the planning and the monitoring of the environment and for a correct use and protection of resources. In fact, as we have seen, all the subsequent revision hypotheses underline the need of acquiring data on all the factors of pressure that may influence the quality of bathing water, in order to be able to manage and control them and determine if quality standards have been met. This kind of approach compliant with the requirements of the water framework directive (2000/60/EC), has as a territorial base the hydrographic reservoir or, at any rate, an ambit of reference determined in accordance with a detailed territorial analysis that takes into account both the natural and anthropic characteristics.

On the contrary, the maximum kilometric limit (all and only Italian) has caused several difficulties in the organization of monitoring plans, since the sites of control for bathing water have to be selected very frequently, not because of territorial requirements, but simply to avoid legal problems. This is particularly true for regions, like Tuscany, in which the alter-

vole 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 17 dicembre), su precisa volontà della rappresentanza italiana, è stata introdotta una ulteriore possibilità per

nation of different types of coasts and the remarkable difference of the environments would require a greater flexibility and adaptability of the criteria of monitoring. In fact, the rocky coasts which are hardly reachable and not very crowded (especially in the area of the Archipelago of Tuscany), as well as the long stretches of sandy coast without waterways, outlets or other factors of risk (as shown by historical series of ten years with values widely within the limits), could be correctly controlled by means of a few sites of collection, even situated at remarkable distances one from another.

In spite of these limits, the Region of Tuscany, in close co-operation first with the experts of the Local Health Units, and then of the Departments of ARPAT later, has selected the sites for the control of bathing water in accordance with criteria that are still effective today and that can be summarized as follows:

- density of bathing population,*
- presence of structures suitable for bathing,*
- easy accessibility from land,*
- bathing behavior of population,*
- sources of potential land pollution from.*

After, more than 20 years of monitoring, the acquisition of a broader knowledge of the territory, the evolution of the laws and the new principles of environmental protection, applied to coastline sea water, it is now possible to examine the control system, thus reviewing criteria of evaluation, aims and monitoring plan.

In the last version of the draft euro-

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 17 dicembre 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

pean directive (inter institutional Pamphlet: 2002/0254 (COD) dated 17th December), the italian representatives have set the grounds for proceeding in this direction by suggesting some possible review criteria.

Art. 4 paragraph 5 of this document, establishes, in relation to the evaluation of the quality, that “member States can divide or group existing bathing water on the basis of the evaluations of the quality of the bathing water. Bathing waters can be grouped if:

- a) they are contiguous;*
- b) they have similar evaluations in the four previous years;*
- c) their profiles include equivalent factors of risk or no risk;”*

In other words, it may be possible in future to create entities with a wider extension as compared to bathing water (this applies mainly to Italy, as explained above) that group all sites with similar characteristics within the same area.

These entities that, we will call “homogeneous areas” for simplicity will be those to be controlled on the basis of the data collected with the methods established by current laws (DPR 470/82 and subsequent amendments).

In the version of 17th December, art. 3 paragraph 3, specifies that the sites of monitoring for bathing water are those:

- a) with higher affluences; or*
- b) with higher risks of pollution as esta-*

Tabella 10

Attribuzione del punteggio per il calcolo dell'IQB alle diverse modalità di comparsa dei batteri fecali nei campioni delle acque di balneazione.

Attribution of the score for the calculation of the IQB for the different modes of appearance of the faecal bacteria in the samples of bathing water.

		UFC/100ml	Presenza nei campioni routinari	Punteggio
Coliformi fecali	Assenti	<5	>95%	125
			71-95%	100
			50-70%	75
			<50%	50
	Conformi	6-100	0-100%	0
	Fuori norma (> valore Guida CEE/76/160)	101-2000	1-5%	-5
			6-25%	-15
			>25%	-30
	Fuori norma (> valore Imperativo CEE/76/160)	>2000	1-5%	-20
			>5%	-50
Streptococchi fecali	Assenti	<5	0-25%	0
			26-50%	10
			>50%	25
	SOLO SE C. fecali sono assenti (<5)	5-100	1-25%	-5
			>25%	-10
	Fuori norma	>100	1-25%	-10
			>25%	-25

Tabella 11

Classificazione dell'IQB in base al punteggio totale attribuito.

Classification of the IQB on the basis of the total score attributed.

	Min	Max	Classe /Class	Giudizio / Judgement
Punteggio totale Score	120	150	1	Incontaminato / <i>Unpolluted</i>
	90	119	2	Sufficiente / <i>Sufficient</i>
	60	89	3	Mediocre / <i>Poor</i>
	30	59	4	Contaminato / <i>Polluted</i>
	-65	29	5	Fortemente contaminato / <i>Highly polluted</i>

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

blished by the profile of the bathing water;

This means that, for the homogeneous area, i.e. a stretch of coast in which the natural (geomorphologic, hydrologic, etc.) characteristics are substantially consistent, the site of control is to be placed in the location with higher concentrations of

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

risk factors.

In the attempt of clarifying the meaning of the term, “similar evaluations” we used, and in order to quantify more accurately the factors of risk, the official data provided by the Health Information System of the Ministry of Health in the last four years, and processed them according to the following criteria:

- *compliance with the thresholds of DPR*

	Tutti i parametri A norma	Parametri microbiologici:		IQB (classe)
		entro limiti Guida	entro limiti Imperativi	
Classe A	100%	100%	100%	1-2
Classe B	>95%	>95%	100%	1-2
Classe C	>90%	>90%	100%	1-3
Classe D ¹⁷	≤90%	≤90%	<100%	4-5

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).

470/82 for all parameters;

- *compliance with the thresholds of DPR 470/82 for the microbiological parameters only, which are considered the most frequent cause of pollution of bathing water and the only indicators of anthropic contamination;*
- *compliance with the mandatory thresholds of 76/160/EC for the microbiological parameters only;*
- *class of the Index of Bacteriologic Quality (IQB).*

¹⁷ 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.

¹⁷ In this case, at least 1 of the 4 conditions must be valid for class D to be applicable; i.e. for the site not to belong to any of the other 3 classes.

Quest'ultimo indice, si basa sostanzialmente sull'uso dei parametri microbiologici fecali come indicatori ambientali [12], attribuendo diversi pesi ai valori calcolati per ciascun parametro e creando una classificazione in base al punteggio totale, secondo gli schemi seguenti:

Tale classificazione si può riferire ad un singolo punto od alle entità amministrative di competenza (comune, provincia, ecc.), considerando tutti i punti di balneazione esistenti su quel territorio.

L'IQB, quindi, non valuta solo la qualità igienico-sanitaria delle acque di balneazione, ma fornisce indicazioni sul livello di qualità ambientale (grado di contaminazione) e sul tipo ed importanza dei fattori di rischio a cui sono sottoposte.

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, di seguito specificate:

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. Ab-

This last index, is substantially based on the use of faecal microbiological parameters as environmental indicators (12), and implies assigning different relevances to the values calculated for each parameter, in order to create a classification based on the total score as detailed below:

This classification can be referred to a single site or to the reference administrative entities (municipality, province, etc.), but takes into consideration all the existing bathing places present within the territory.

Therefore, the IQB does not estimate only the health and hygienic quality of bathing water, but also provides indications on the level of environmental quality (degree of pollution) and on the type and relevance of risk factors to which they are exposed.

The above criteria were combined together in a manner that guaranteed a consistent health and environmental protection within the same combination, in order to draw a list of the currently monitored sites. The list was then divided into 4 classes as shown below:

The new classification was used to verify which of the neighboring sites belonged to the same class and to draw an initial group. Then, the reasons for the selection of the site (delimitation of a permanent prohibition, presence of waterways, outlets, etc.), the factors of risk (presence of ports, towns, etc.) and the morphological changes in the coastline, if present (headlands, rocky and sandy coast), were used to decide whether to further the homogeneous area, the group never included sites

biamo 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.).

Questa scelta comporterebbe il controllo su circa 260 aree omogenee contro i 373 punti della stagione balneare 2004, con una riduzione di circa il 35% garantendo, naturalmente, lo stesso livello di sicurezza per la salute dei bagnanti, ma con un notevole risparmio di energie umane e finanziarie.

6 RIFERIMENTI NORMATIVI

6.1 COMUNITARI

- Direttiva del Consiglio dell'8 dicembre 1975 concernente la qualità delle acque di balneazione (76/160/CEE), pubblicata sulla GUCE L 31 del 5.2.1976
- Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, pubblicata sulla GUCE L 327 del 22.12.2000
- Comunicazione della Commissione al Parlamento Europeo ed al Consiglio del 21 dicembre 2000 "Una nuova politica per le acque di balneazione", COM(2000) 860 definitivo
- Proposta di Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio relativa alla qualità delle acque di balneazione del 28 ottobre 2002, COM(2002) 581 definitivo

7 BIBLIOGRAFIA

6.2 NAZIONALI E REGIONALI

- Decreto del Presidente della Repubblica 8 giugno 1982, n. 470, “Attuazione della direttiva (CEE) n. 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione” (GU n. 203 del 26.07.1982)
 - Legge 29 dicembre 2000 n. 422, “Legge comunitaria 2000”, art. 18, che regola le competenze regionali nel controllo della qualità delle acque marine (Suppl. ord. GU n. 16 del 20.01.2001)
 - Legge 30 maggio 2003 n. 121, “Conversione in legge, con modificazioni, del decreto legge 31 marzo 2003, n. 51 recante modifiche alla normativa in materia di qualità di acque di balneazione” (GU n. 125 del 31.05.2003)
 - Delibera di Giunta Regionale Toscana n. 225 del 10 marzo 2003 “Acquisizione del quadro conoscitivo relativo alla qualità delle acque superficiali ed a specifica destinazione, ai sensi del D. Lgs. 152/99 e successive modificazioni. Attuazione della Delibera di Giunta Regionale Toscana n. 101/2003 (Direttive all’ARPAT per l’attività negli anni 2003/04/05), in aggiornamento delle deliberazioni n. 858/2001 e n. 219/2002, con la quale sono stati approvati i criteri di individuazione e l’elenco dei corpi idrici significativi, il piano di rilevamento dello stato di qualità delle acque superficiali, sotterranee ed a specifica destinazione affidato all’ARPAT.
- 1 BONADONNA, L., 2002 – *Qualità delle acque adibite alla balneazione: applicazione di un metodo di approccio integrato per la valutazione del rischio sanitario*. In: “*Le Acque di Balneazione*”, Atti workshop Lido di Camaiore, 11 ottobre 2002. Regione Toscana, Firenze: 31-34.
 - 2 CORTVRIEND, J., 2002 – *La nuova direttiva comunitaria in materia di acque di balneazione*. In: “*Le Acque di Balneazione*”, Atti workshop Lido di Camaiore, 11 ottobre 2002. Regione Toscana, Firenze: 9-26.
 - 3 GEORGE, I., PETIT M, SERVAIS P., 2000 - *Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters*. Appl. Environ. Microbiol., **88**: 404-413.
 - 4 DAVIES, C. M., S. C. APTE, S. M. PETERSON, AND J. L. STAUBER, 1994. *Plant and algal interference in bacterial •-D-galactosidase and •-D-glucuronidase assays*. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3959–3964.
 - 5 TRYLAND I. AND L. FIKSDAL, 1998 - *Enzyme characteristics of •-D-galactosidase and •-D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **64** (3): 1018-1023.
 - 6 LANDRE J.P., GAVRIEL A.A., LAMB A.J., 1998 - *False positive coliform reaction mediated by Aeromonas in the Colilert defined substrate technology system*. Lett. Appl. Microbiol., **26**: 352-354.

Finito di stampare in Italia
nel mese di Marzo 2004
da IGP - Pacini Editore Industrie Grafiche - Ospedaletto (Pisa)
per conto di EDIFIR - Edizioni Firenze

Regione Toscana
Direzione Generale delle Politiche Territoriali
e Ambientali

Area di Coordinamento Prevenzione Integrata
degli Inquinamenti e Servizi Pubblici
a Rilevanza Ambientale

Settore Tutela delle Acque Interne e
Costiere - Servizi Idrici



Prodotto e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

Stampato e distribuito da: www.regione.toscana.it

La Toscana vuole dare un contributo anche sulle questioni del mare, nella sua veste non solo istituzionale, ma di “laboratorio” per la sostenibilità e la qualità ambientale. Del resto per una efficace “politica ambientale” è indispensabile tenere sempre attive due importanti leve: quella della conoscenza e quella dell’informazione attraverso la diffusione della conoscenza.

Tommaso Franci
Assessore Ambiente
Regione Toscana

Il mare toscano da sempre è un punto d’incontro tra culture e popoli del Mediterraneo; è un bene prezioso, una risorsa da tutelare anche a livello europeo: il nostro ruolo è quello di garantire un migliore livello di qualità ambientale alle generazioni future.

Alessandro Lippi
Direttore Generale ARPAT