



APAT



Criteri per il rilevamento e la classificazione dello stato di qualità ecologico e chimico delle acque, con particolare riferimento all'applicazione del decreto legislativo 152/99

Sottoprogetto 10

Messa a punto e sperimentazione di nuovi sistemi di monitoraggio delle acque sotterranee rivolti all'implementazione applicativa del D. Lgs. 152/99

Determinazione dell'ATP in bioluminescenza come metodo di screening per il controllo delle acque profonde

Rapporto Tecnico/3

Ottobre 2005



Pag / indice

01 / Scopo della ricerca

1 / Materiali e metodi

2 / Metodo bioluminometrico

3 / Metodi microbiologici

3 / Risultati e discussione

8 / Bibliografia

9 / Allegato

Gruppo di Lavoro

Redazione

Dott.ssa Elisabetta Ciccarelli

Contributi

Dott.sa Sonia Renzi
Tec. Lab. Enrica Ballerini
Tec. Lab. Anna Paffarini

Versione

Rev. 0

Visto

Dott. Augusto Morosi

SCOPO DELLA RICERCA

Lo studio è stato condotto per verificare la possibilità di utilizzare un indicatore di contaminazione microbiologica, proposto da IRSA-CNR, nella sorveglianza del rischio di inquinamento degli acquiferi e di verificare l'applicabilità di tale metodologia analitica rapida direttamente *in situ*.

L'attività di ricerca ha previsto in particolare :

- La determinazione del contenuto globale di microrganismi presenti nelle acque profonde mediante misura dell'ATP con il metodo bioluminometrico.
- La determinazione sugli stessi campioni dei parametri microbiologici con i metodi culturali tradizionali.
- La comparazione dei risultati ottenuti per verificare l'esistenza di una possibile correlazione statistica.

MATERIALI E METODI

I controlli analitici programmati hanno interessato campioni di acque sotterranee prelevati in 2 aree del reticolo di monitoraggio regionale: la Conca Eugubina e la media Valle del Tevere (Fig.1).

Gli acquiferi controllati risultano caratterizzati da una qualità chimica scadente-sufficiente a causa di un elevato impatto antropico, che interviene negativamente anche sulla qualità microbiologica.

Sono state eseguite 3 campagne di prelievo: la prima nel 2000-2001, che ha interessato solo i pozzi della Conca Eugubina, la seconda nel 2003 e l'ultima nel 2005.

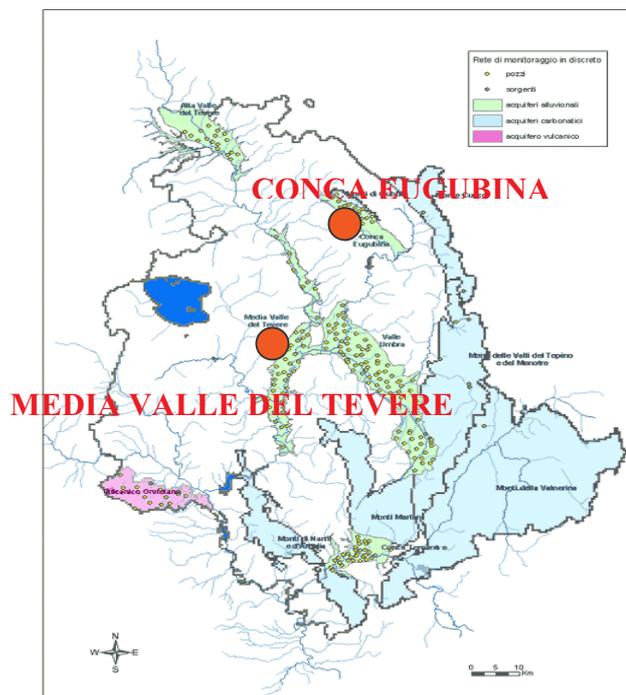


Fig.1 – Rappresentazione cartografica degli acquiferi indagati

I campioni sono stati raccolti in contenitori sterili rispettando le condizioni di sterilità e sottoposti immediatamente ad analisi bioluminometrica per la determinazione del contenuto di ATP. Un'aliquota degli stessi campioni è stata trasportata in laboratorio per essere sottoposta ad esame culturale .

I campioni prelevati sono stati complessivamente 66. Per alcuni campioni la misura dell'ATP è stata eseguita sia in campo che in Laboratorio.

Metodo bioluminometrico

L'ATP è una molecola presente in tutte le cellule metabolicamente attive, sia di origine procariotica che eucariotica, in quanto fornisce l'energia necessaria per le diverse attività cellulari, può essere utilizzata quindi come indicatore del numero di cellule vitali presenti in una determinata matrice.

La determinazione dell'ATP, presente nelle cellule batteriche, è stata eseguita con il metodo bioluminometrico. Tale tecnica analica permette di rilevare la luminescenza emessa durante la reazione di idrolisi dell'ATP in presenza della luciferina e dell'enzima luciferasi di lucciola.

REAZIONE DI BIOLUMINESCENZA

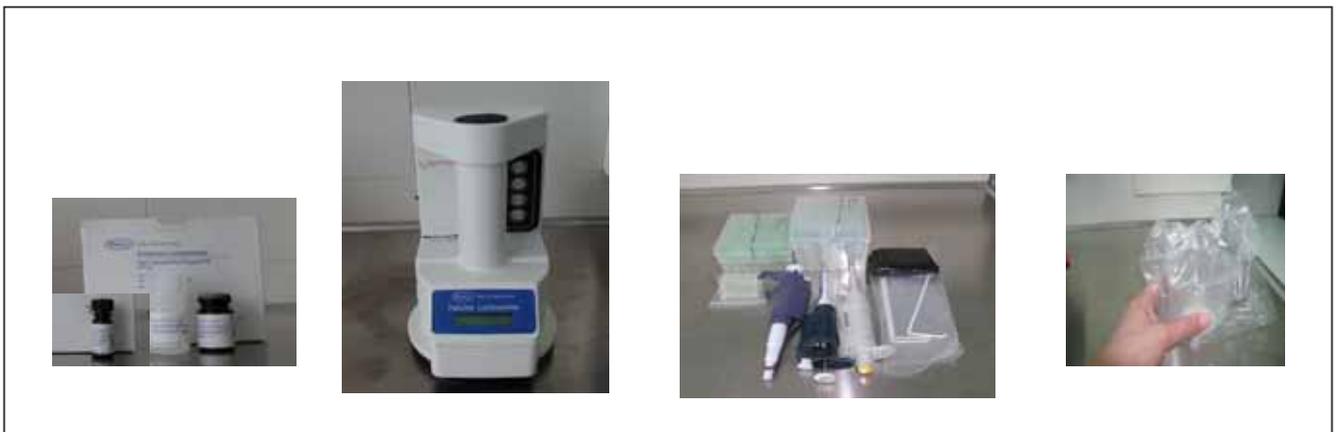


La quantità di luce prodotta da questa reazione enzimatica è direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente nel campione ed è misurata con un apposito luminometro.

La bioluminometria trova applicazione prevalentemente nel controllo di qualità nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica, nel monitoraggio dell'igiene degli impianti e della qualità delle materie prime. È stato proposto un metodo APAT IRSA-CNR Man 29/03 (9030), che prevede la determinazione dell'ATP ai fini della valutazione della biomassa totale in ambienti acquatici.

I materiali e la strumentazione utilizzati per l'esecuzione del metodo bioluminometrico sono riportati in maniera dettagliata nell'elenco sotto:

- Luminometro (Pallchek-PALL)
- Funnel sterili da 0.45µm
- Reagenti per estrazione ATP
- Complesso enzimatico luciferina/luciferasi
- Soluzione di riferimento di ATP
- Pipette con volume regolabile
- Materiale monouso sterile: puntali-spatole-supporti-vials-pinzette-provette-guanti
- Frigorifero (2-8°C)
- Acqua distillata sterile
- Pompa e beuta da vuoto
- Bottiglie sterili



L'applicazione di tale metodologia ha previsto l'esecuzione di controlli di qualità preliminari del luminometro e dei reattivi, mediante l'utilizzo di ATP standard e di acqua distillata sterile come controllo negativo.

Si è proceduto quindi alla filtrazione di un'aliquota (500ml) dei campioni raccolti su funnel sterili da 0,45µm. Sulle membrane prelevate con pinzette sterili e posizionate sull'apposita piastra con supporto dello strumento, è stato aggiunto un liquido di estrazione, che lisando le membrane cellulari libera l'ATP

intracellulare.

Dopo alcuni secondi sono stati aggiunti la D-luciferina e l'enzima luciferasi e si è proceduto rapidamente alla misurazione dell'emissione luminosa in RLU (Unità di Luminescenza Relative). Al valore del campione è stato sottratto quello del bianco misurato nelle stesse condizioni, ma utilizzando acqua distillata sterile.

I dati analitici ottenuti sono stati registrati su apposita scheda di campo, che raccoglieva anche tutte le informazioni necessarie per l'identificazione dei campioni esaminati.

Metodi microbiologici

Un'aliquota dei campioni prelevati per la misura dell'ATP, è stata trasportata in laboratorio al buio a 4-10°C ed utilizzata immediatamente per l'esecuzione delle analisi microbiologiche.

I parametri ricercati, attraverso l'esame colturale, sono stati: la Carica microbica a 37°C e 22°C, i Coliformi totali e fecali, gli Enterococchi. Nei campioni prelevati nel 2005 è stata eseguita anche la ricerca di *Escherichia coli*.

I metodi di riferimento impiegati (Rapporti ISTISAN, APAT IRSA-CNR, UNI EN ISO) sono stati quelli normalmente utilizzati dal laboratorio per il controllo microbiologico delle acque profonde, ed hanno previsto la determinazione delle cariche a 37°C e 22°C, mediante la tecnica di semina per inclusione su agar, e quella dei microrganismi indicatori con i metodi delle membrane filtranti (MF) e dei tubi multipli (MPN).

I dati analitici ottenuti sono stati correlati con i valori di RLU rilevati per gli stessi campioni ed elaborati in modo da evidenziare informazioni importanti al fine della valutazione dell'idoneità del metodo bioluminometrico come metodo microbiologico di screening.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metodo bioluminometrico, utilizzato per la determinazione dell'ATP, è risultato dal punto di vista operativo di facile esecuzione ed applicabile anche in campo, anche se qualche difficoltà è stata incontrata nel mantenere le condizioni ambientali il più vicino possibile a quelle di Laboratorio. Il mezzo mobile deve risultare fornito di un frigorifero a 2-8°C per la conservazione dei reattivi e di un piano di appoggio che possa essere sottoposto a pulizia/disinfezione.

La strumentazione impiegata non è ingombrante, è facilmente trasportabile e può essere alimentata anche a batteria.

Il metodo è risultato molto rapido infatti, il tempo di analisi richiesto per l'applicazione dell'intero procedimento analitico (dal prelievo alla lettura) è di circa 30 minuti a campione.

I dati relativi alle misure dell'ATP e alle concentrazioni dei diversi parametri microbiologici, raccolti durante la sperimentazione, sono riportati nell'ALLEGATO 1. I risultati ottenuti dalla loro comparazione sono graficizzati nelle Fig.2, Fig.3, Fig.4 e Fig.5.

Come si può osservare dall'analisi dei grafici, i valori di luminosità (RLU) ottenuti per le acque sotterranee controllate con il metodo bioluminometrico, non sono risultati correlabili in maniera significativa, né con le conte dei batteri mesofili e termofili (Fig.2), né con le concentrazioni dei microrganismi indicatori quali i Coliformi totali e fecali (Fig.3), gli Enterococchi e *E. coli* (Fig.4).

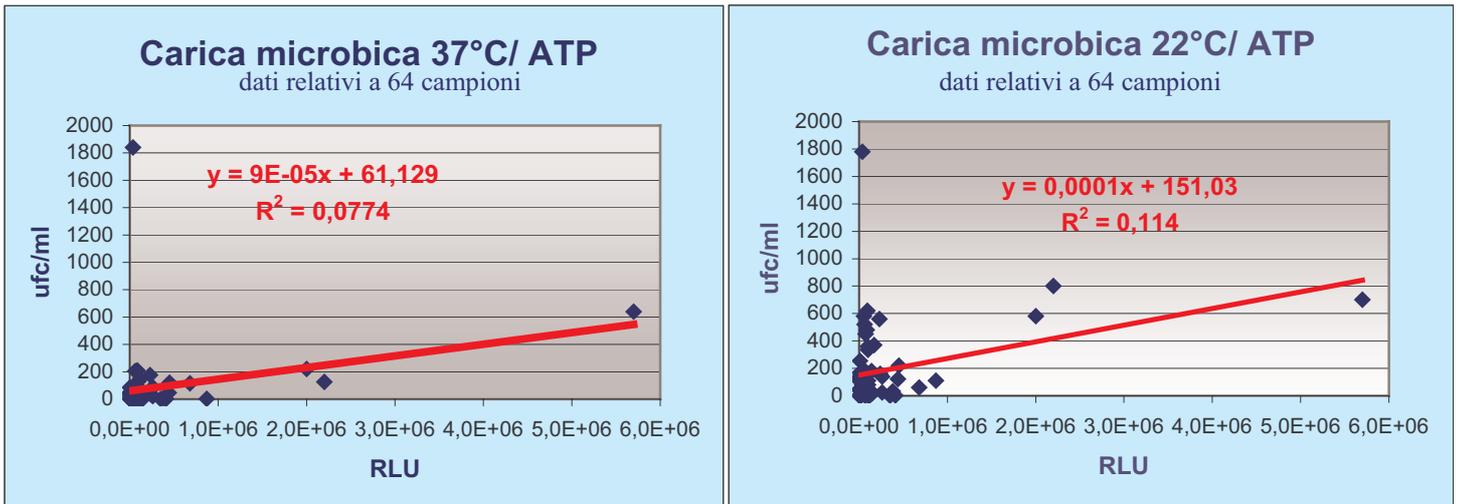


Fig. 2- Grafici di correlazione fra le concentrazioni della carica microbica a 37°C e 22°C (ufc/ml) e i valori di ATP (RLU).

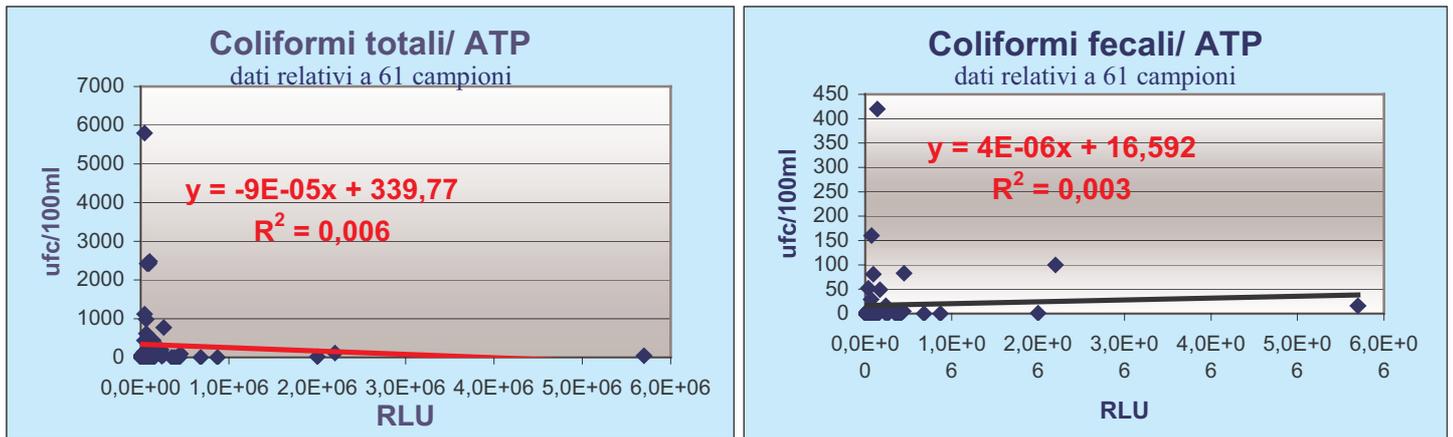


Fig. 3- Grafici di correlazione fra le concentrazioni dei Coliformi totali e fecali (ufc/ml) e i valori di ATP (RLU).

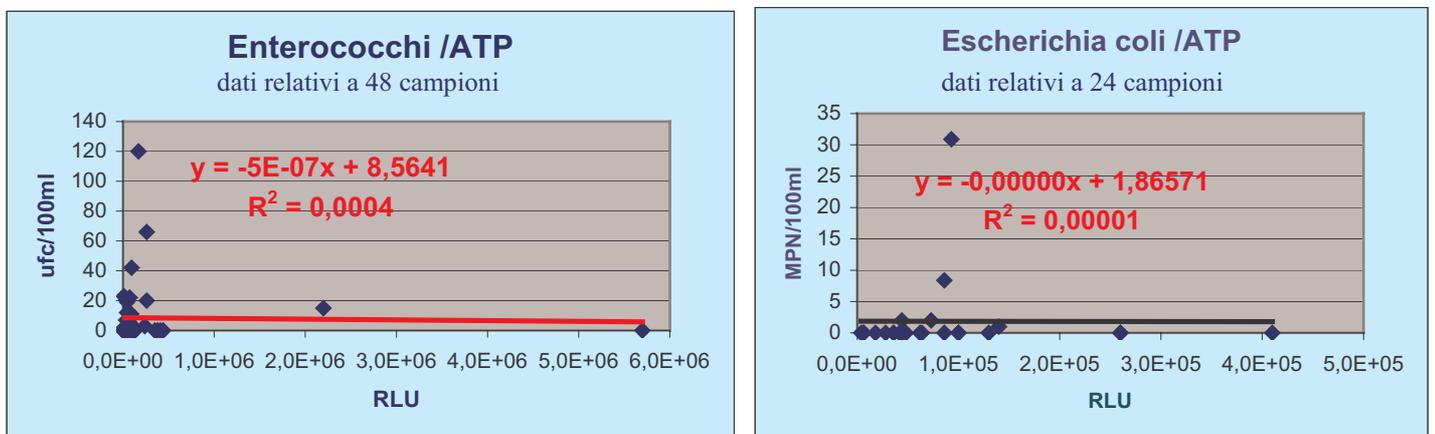


Fig. 4- Grafici di correlazione fra le concentrazioni degli Enterococchi (ufc/ml) e *E. coli* (MPN/ml) e i valori di ATP (RLU).

L'assenza di correlazione può essere spiegata tenendo conto sia dall' aspecificità che caratterizza la misura dell'ATP, sia delle caratteristiche dei metodi colturali. Infatti il metodo bioluminometrico rileva una risposta biologica complessiva mentre i metodi colturali, anche quelli meno selettivi, come quelli utilizzati per la carica a 37° e 22°C, permettono di evidenziare non tutti i microrganismi presenti, ma solo quelli per i quali le condizioni ambientali da noi selezionate (temperatura, composizione terreno, tempi di incubazione ecc...) risultano ottimali.

Nell'interpretazione di tali risultati c'è da tener presente inoltre, che il contenuto di ATP estratto, risulta dipendente non solo dalla concentrazione numerica della microflora della matrice acquosa, ma anche dalla sua diversa composizione. I parametri microbiologici (CB 37°,CB22°,CT,CF), correlati con i valori di RLU, rappresentano infatti, gruppi eterogenei di microrganismi aerobi, costituiti da diverse specie con differenti capacità metaboliche. Questo contribuisce a spiegare i diversi casi, riscontrati durante tale sperimentazione, in cui a valori luminometrici dello stesso ordine di grandezza sono corrisposte ampie oscillazioni dei conteggi delle cariche microbiche. Nel grafico di Fig. 5 si può osservare, come ai 14 valori di RLU dell'ordine di 10⁴, relativi ai 24 pozzi monitorati nel 2005, risultano associati valori che oscillano da 1 a 1840ufc per la carica a 37°C e da 6 a 1780ufc per quella a 22°C. Fluttuazioni di tale ordine sono state osservate anche per i dati raccolti durante le altre campagne di prelievo.

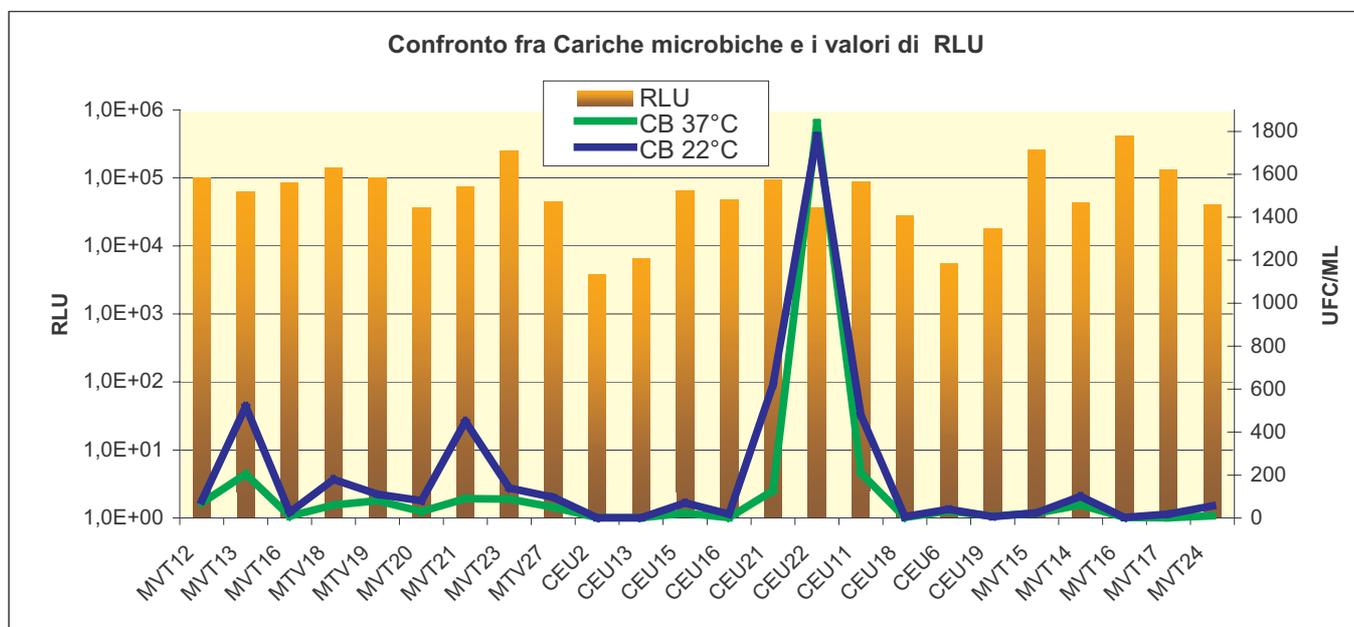


Fig. 5- Confronto fra le concentrazioni della Carica microbica a 37°C e 22°C (ufc/ml) e i valori di ATP (RLU).

L'assenza di una correlazione statisticamente significativa non ha permesso pertanto di individuare, nell'ambito di tale studio, valori di luminescenza (RLU) ai quali possano essere associate concentrazioni microbiche ben definite, utilizzabili per discriminare il grado di contaminazione degli acquiferi e individuare situazioni di rischio.

Durante la sperimentazione 24 campioni di acque sotterranee, prelevati nel corso del 2003, sono stati analizzati con il metodo bioluminometrico in doppio, in campo e in laboratorio. I grafici riportati in Fig.6 evidenziano l'assenza di correlazione significativa fra le due serie di dati luminometrici ottenuti, anche se nel 60% dei casi i valori sono risultati dello stesso ordine di grandezza (Fig.6). Tale dato può essere compatibile con il fatto che fra le determinazioni effettuate in campo e quelle in laboratorio intercorrevano mediamente 3-4 ore.

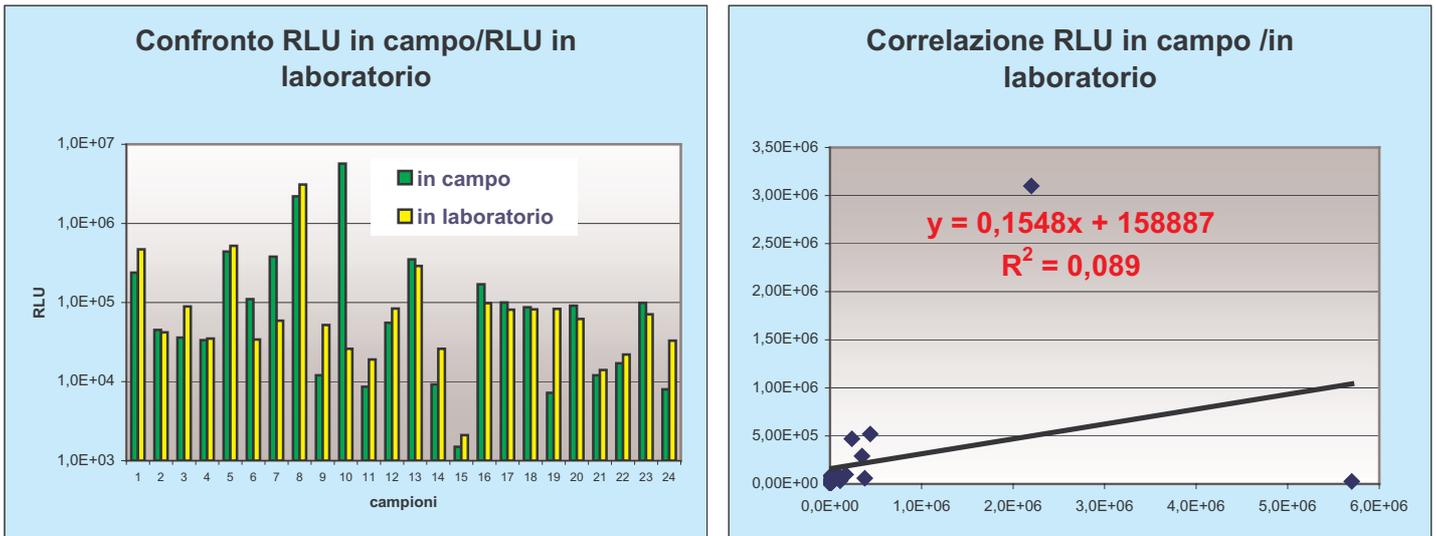


Fig. 6 - Grafici relativi alle misure luminometriche eseguite in doppio in campo e in laboratorio.

L'elaborazione dei dati sperimentali ha permesso di ottenere, oltre ad informazioni sulla correlazione del metodo bioluminometrico con i parametri microbiologici tradizionali, alcune utili indicazioni che potranno essere sviluppate ed approfondite da tutti coloro che volessero comunque applicare tale metodo nel controllo delle acque.

Una prima indicazione è riferita al "livello di background" individuato analizzando con il metodo bioluminometrico vari campioni di acqua sterile, nelle stesse condizioni operative dei campioni esaminati. In base alla nostra esperienza (Fig. 7) tale livello è risultato significativo fissarlo per le misure in campo a < 1000 RLU, infatti, i valori medi ottenuti per i controlli negativi nelle tre campagne di prelievo oscillano da 320 a 960 RLU. Tale valore è piuttosto elevato, in quanto risente di tutte quelle interferenze ambientali come la contaminazione delle superfici e dell'aria, che in campo risultano più difficili da tenere sotto controllo rispetto al laboratorio. Il valore medio per l'acqua sterile, ottenuto in laboratorio, è risultato pari a 300 RLU.

Inoltre, come si può osservare nel grafico di Fig. 7, tutti i campioni analizzati hanno presentato un valore di RLU mediamente superiore di due ordini di grandezza rispetto al valore di background e quindi si possono considerare significativi.

Per un solo campione, contenente abbondante materiale terroso, si è registrato un valore di RLU inferiore a quello del controllo, a causa dell'assorbimento della luminescenza emessa da parte delle particelle solide presenti. Tale valore è stato pertanto escluso dall'elaborazione dati.

Nello stesso grafico (Fig. 7), è possibile osservare che tutti i valori di bioluminescenza registrati per i 34 pozzi esaminati, risultano pertanto > di 1000 RLU. Tale valore sembrerebbe quindi rappresentare, nella valutazione del grado di contaminazione delle acque sotterranee esaminate, il valore soglia inferiore.

Si può inoltre notare come la maggior parte dei 64 valori di RLU determinati si collocano nell'intervallo fra 10.000 – 1.000.000 RLU (52 campioni pari al 81,2%). Modesto è invece il numero di campioni per i quali sono stati registrati valori compresi fra 1.000-10.000 RLU (9 campioni 14,1%) e >1.000.000 RLU (3 campioni 4,7%).

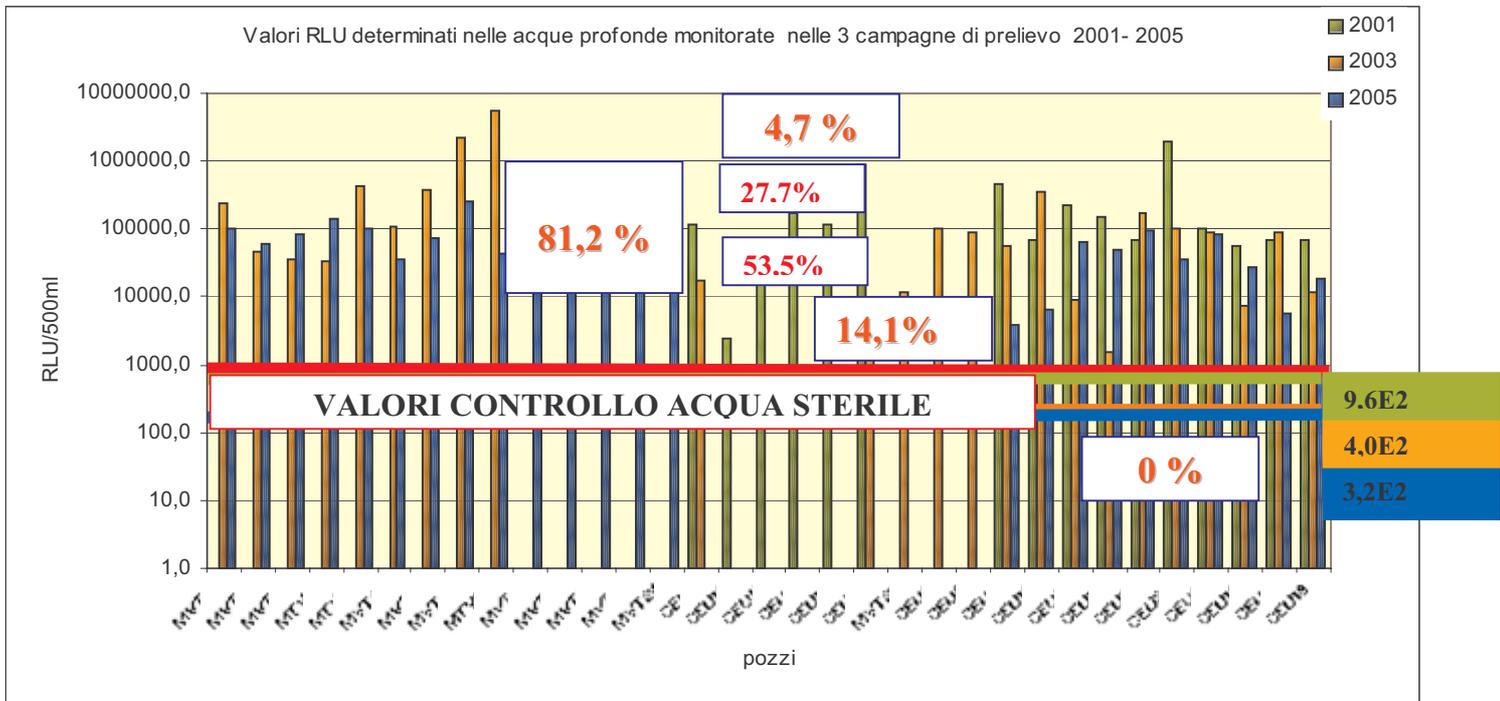


Fig. 7- Grafico dei dati luminometrici ottenuti per i campioni esaminati dal 2001 al 2005 e dei livelli di background ottenuti durante la sperimentazione.

Per poter valutare l'applicabilità di un metodo rapido come quello luminometrico, nel controllo delle acque profonde in situazioni di emergenza, è stato necessario indagare sulla sua capacità di fornire indicazioni relative alla possibile presenza di microrganismi patogeni.

A tale fine, ci è sembrato interessante determinare la qualità microbiologica complessiva dei campioni analizzati, ed individuare la distribuzione dei campioni conformi e non conformi rispetto ai valori luminometrici ottenuti. I dati raccolti sono riepilogati nella Tab.1. Da una loro analisi emerge che i 31 campioni (su 62) Non Conformi, rispetto ai limiti fissati dalla normativa sulle acque potabili (D.L. 31/2001) per gli indicatori fecali, risultano distribuiti per l' 87,1% nel range di luminosità da 10.000 a 100.000.000.

INTERVALLI RLU	CAMPIONI NON CONFORMI	CAMPIONI CONFORMI
1.000 - 10.000	1	7
>10.000-100.000	16	13
>100.000-1.000.000	11	11
> 1.000.000	3	0

Tab.1- Distribuzione dei campioni conformi e non conformi rispetto agli intervalli di luminosità (RLU).

L'ampiezza dell' intervallo in cui sono collocati la gran parte dei campioni non conformi e, la distribuzione nello stesso intervallo, anche del maggior numero dei campioni conformi non fecalizzati (77,4%), confermano la non idoneità di un indicatore aspecifico, come la misura dell'ATP per screening in situazioni di emergenza.

In conclusione non si possono che riassumere alcuni punti essenziali già discussi nel corso della relazione.

Il metodo bioluminometrico, applicato nel monitoraggio degli acquiferi, è risultato:

- rapido
- di facile esecuzione
- applicabile anche in campo
- ma aspecifico

Proprio per la sua aspecificità , la determinazione dell'ATP è risultata, in base a tale sperimentazione, un indicatore non adeguato per discriminare il grado di contaminazione degli acquiferi e come metodo di screening per individuare situazioni di rischio microbiologico.

BIBLIOGRAFIA

Poli G. Microbiologia e immunologia. UTET(1991)

Guzzella L., De Polis A.,Giuliano G.,2003 – Indici globali di contaminazione per il monitoraggio degli acquiferi. *Acqua e Aria*, 9:86-94

Rapporti ISTISAN 1997/8

Metodi analitici per le acque APAT IRSA-CNR Man 20/03 2003

Norma UNI EN ISO 7899-2 2003

Norma UNI EN ISO 6222- 2001

IRSA-CNR,2004b – Protocollo per analisi dell'ATP. Rapporto interno Progetto MIMA

Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 20th edition-1998

D.L 31/2001

ALLEGATO

DATI BIOLUMINOMETRICI E MICROBIOLOGICI (2005)

POZZI	Carica microbica 37°C ufc/ml	Carica microbica 22°C ufc/ml	Coliformi totali ufc/100ml	Coliformi fecali ufc/100ml	Enterococchi ufc/100ml	RLU campo x500ml	RLU lab. x500ml
MVT12	35	160	30	16	3	2,4E+05	4,7E+05
MVT13	58	72	13	8	0	4,5E+04	4,2E+04
MVT16	2	32	0	0	0	3,6E+04	8,9E+04
MVT18	19	44	10	7	7	3,3E+04	3,5E+04
MVT19	47	122	6	5	0	4,4E+05	5,2E+05
MVT20	5	45	28	9	0	1,1E+05	3,4E+04
MVT21	7	32	0	0	0	3,8E+05	5,9E+04
MVT23	126	800	110	100	15	2,2E+06	3,1E+06
MVT24	648	660	150	100	0	1,4E+05	2,1E+05
MVT26	46	126	55	0	2	1,2E+04	5,2E+03
MVT27	640	700	40	16	0	5,7E+06	2,6E+04
MVT30	0	7	0	0	0	8,6E+03	1,9E+04
CEU1	58	54	0	0	0	1,7E+04	2,2E+04
CEU2	65	580	4	3	2	5,5E+04	8,4E+04
CEU3	2	2	0	0	0	9,9E+04	7,0E+04
CEU6	20	152	5	1	0	9,2E+04	6,2E+04
CEU11	6	156	10	0	11	8,7E+04	8,2E+04
CEU13	1	1	0	0	0	3,5E+05	2,9E+05
CEU14	4	4	0	0	0	8,0E+03	3,3E+04
CEU15	50	255	63	0	23	9,2E+03	2,6E+04
CEU16	85	137	0	0	0	1,5E+03	2,1E+03
CEU18	17	167	12	0	0	7,2E+03	8,3E+04
CEU19	15	53	6	0	0	1,2E+04	1,4E+04
CEU21	37	370	94	49	120	1,7E+05	9,8E+04
CEU22	80	335	149	0	0	1,0E+05	8,1E+04

DATI BIOLUMINOMETRICI E MICROBIOLOGICI (2003)

POZZI	Carica microbica 37°C ufc/ml	Carica microbica 22°C ufc/ml	Coliformi totali ufc/100ml	Coliformi fecali ufc/100ml	Enterococchi ufc/100ml	RLU campo x500ml	RLU lab. x500ml
MVT12	35	160	30	16	3	2,4E+05	4,7E+05
MVT13	58	72	13	8	0	4,5E+04	4,2E+04
MVT16	2	32	0	0	0	3,6E+04	8,9E+04
MVT18	19	44	10	7	7	3,3E+04	3,5E+04
MVT19	47	122	6	5	0	4,4E+05	5,2E+05
MVT20	5	45	28	9	0	1,1E+05	3,4E+04
MVT21	7	32	0	0	0	3,8E+05	5,9E+04
MVT23	126	800	110	100	15	2,2E+06	3,1E+06
MVT24	648	660	150	100	0	1,4E+05	2,1E+05
MVT26	46	126	55	0	2	1,2E+04	5,2E+03
MVT27	640	700	40	16	0	5,7E+06	2,6E+04
MVT30	0	7	0	0	0	8,6E+03	1,9E+04
CEU1	58	54	0	0	0	1,7E+04	2,2E+04
CEU2	65	580	4	3	2	5,5E+04	8,4E+04
CEU3	2	2	0	0	0	9,9E+04	7,0E+04
CEU6	20	152	5	1	0	9,2E+04	6,2E+04
CEU11	6	156	10	0	11	8,7E+04	8,2E+04
CEU13	1	1	0	0	0	3,5E+05	2,9E+05
CEU14	4	4	0	0	0	8,0E+03	3,3E+04
CEU15	50	255	63	0	23	9,2E+03	2,6E+04
CEU16	85	137	0	0	0	1,5E+03	2,1E+03
CEU18	17	167	12	0	0	7,2E+03	8,3E+04
CEU19	15	53	6	0	0	1,2E+04	1,4E+04
CEU21	37	370	94	49	120	1,7E+05	9,8E+04
CEU22	80	335	149	0	0	1,0E+05	8,1E+04

DATI BIOLUMINOMETRICI E MICROBIOLOGICI (2000-2001)

Pozzi	Carica microbica 37°C ufc/ml	Carica microbica 22°C ufc/ml	Coliformi totali ufc/100ml	Coliformi fecali ufc/100ml	RLU 1° det.	RLU 2° det.	RLU/500ml
CEU1	151	40			5,5E+04	1,9E+05	1,2E+05
CEU12	43	109			4,3E+03	1,2E+03	2,8E+03
CEU17	16	69			3,1E+04	4,9E+04	4,0E+04
CEU2	120	220	90	83	6,2E+05	2,9E+05	4,6E+05
CEU15	176	560	>200	2	3,5E+05	1,2E+05	2,4E+05
CEU22	220	580	16	1	2,6E+06	1,5E+06	2,1E+06
CEU6	6	8	assenti	assenti	8,3E+04	5,5E+04	6,9E+04
CEU11	37	360	400	10	5,8E+04	1,4E+05	9,9E+04
CEU13	1	1	assenti	assenti	8,6E+04	5,1E+04	6,9E+04
CEU21	36	180	60	29	9,9E+04	3,7E+04	6,8E+04
CEU8	5	5	2	assenti	2,4E+04	3,2E+04	2,8E+04
CEU10	1	2	assenti	assenti	1,1E+05	1,4E+05	1,3E+05
CEU14	2	110	assenti	assenti	1,1E+06	6,5E+05	8,8E+05
CEU16	5	20	2	assenti	1,9E+05	1,2E+05	1,6E+05
CEU18	18	160	assenti	assenti	7,5E+04	3,9E+04	5,7E+04
CEU19	116	60	assenti	assenti	2,6E+05	1,1E+06	6,8E+05