



Attuazione Programma PR1/A

“Metodologie per il rilevamento e la classificazione dello stato di qualità ecologico e chimico delle acque con particolare riferimento all’applicazione del D.Lgs.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”

Fase 3

Rapporto finale

Responsabile scientifico: Dott. Giancarlo Marchetti

Gruppo di lavoro del progetto

Responsabile scientifico

Dott. Giancarlo Marchetti ARPA Umbria, Resp.U.O:Tecnica Direzione Generale

Coordinamento

Dott. Angiolo Martinelli ARPA Umbria, Dir. Sez. CAP U.O. Tecnica Direzione Generale

Dott. Giuseppe Giuliano IRSA-CNR Roma, Dirigente

Dott. Augusto Morosi ARPA Umbria, Dir. Laboratorio Dipartimento Provinciale di Perugia

Redazione/Attività formative/Analisi

Dott.sa Nicoletta Barbagianni

Tec. Alfio Burchia

Dott.sa Elisabetta Ciccarelli

Dott.sa Paola Grenni (IRSA-CNR Roma)

Dott. Nicola Morgantini

Dott. Sonia Renzi

Dott.sa Alessandra Santucci

Dott.sa Giovanna Tozzi

Tec. Marcello Romagnoli

Tec. Claudio Spaccini

Tec. Enrica Ballerini

Tec. Anna Paffarini

Divulgazione dati

Dott. Fabio Mariottini

Dott. Emanuele Capponi

Segreteria formazione

Dott. Markos Charavgis

Abstract

Gli schemi di monitoraggio e classificazione del DLgs.152/99 per le acque sotterranee implicano la disponibilità di procedure e di metodologie analitiche standardizzate aventi sul territorio una sufficiente omogeneità di rilevamento, soprattutto per i parametri addizionali, al fine di garantire condizioni di confrontabilità dei risultati a livello nazionale.

Il numero dei parametri addizionali e la variabilità degli ambienti di monitoraggio rendono difficile tale comparazione e non esistono indicatori di tipo biologico per i corpi idrici sotterranei. L'attività realizzata si proponeva di valutarne l'operatività e l'applicabilità quali parametri sintetici di valutazione, uno della componente biologica, non presente nella normativa vigente sulle acque sotterranee, l'altro di ridurre il numero dei parametri di osservazione del DLgs. 152/99.

La metodologia testata per l'indicatore sulla bioluminescenza ha evidenziato l'assenza di correlazione tra dato luminometrico e dato microbiologico: essa 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.

Sulle situazioni idrogeologiche studiate il metodo ha comunque evidenziato una buona capacità di distinguere situazioni spazialmente e temporalmente diversificate quanto a contenuto batterico nelle acque: cosa che consente di proporlo, previo test pilota specifici, come strumento di caratterizzazione dello stato ambientale delle falde per i parametri microbiologici.

Il metodo della bioluminometria applicato nel monitoraggio degli acquiferi è risultato di facile utilizzo, applicabile anche sul campo, con opportuni accorgimenti, dai costi e tempi contenuti. Sicuramente è necessario considerare uno sviluppo normativo che preveda indicatori biologici per le acque sotterranee, procedere allo sviluppo di questa proposta applicativa o di altre che potranno essere sviluppate dalla comunità scientifica nazionale.

La metodologia testata per l'indicatore sulla risposta complessiva dei composti clorurati assorbibili (AOX) ha messo in evidenza una sua facilità di utilizzo in laboratorio, mentre per l'applicazione in campo, con un laboratorio mobile, i problemi riguardano il quantitativo e la conservazione di vetreria pulita e la presenza/uso di eventuali solventi per altri tipi di analisi.

I tempi di analisi, variabili in funzione delle soglie analitiche richieste, sono buoni rispetto al ventaglio di classi di sostanze indagate, che se analizzate separatamente in laboratorio avrebbero tempi molto più lunghi e costi non confrontabili.

I limiti di rilevabilità misurati sono risultati sono più alti di quelli dichiarati e richiedono ulteriori verifiche ed affinamento del metodo per un'applicazione collegata all'attuale limite normativo per i Composti alifatici alogenati.

Sicuramente il metodo può essere utilizzato per la definizione di aree con contaminazioni piuttosto marcate e dare quindi indicazioni della portata dell'inquinamento, risulta però poco riproducibile per l'individuazioni di concentrazioni basse di analiti, ed in particolare non può essere significativo per il controllo di prodotti fitosanitari di tipo clorurato. La sua applicazione nel monitoraggio può essere valida a scala di rete regionale, o di reti locali, per le zone dove si hanno fenomeni contaminanti diffusi o si possono attendere nuovi eventi inquinanti da zone industriali e civili.

Introduzione

Il DLgs. 152/99 fornisce i criteri per il rilevamento delle caratteristiche quali-quantitative delle acque sotterranee e per la classificazione del loro stato ambientale.

Per quanto riguarda lo stato chimico è prevista la determinazione di 7 parametri di base (Tab. 20, Allegato 1 del DLgs 152) e di un certo numero di parametri addizionali (Tab. 21, Allegato 1 del DLgs. 152) da individuare sulla base della situazione di vulnerabilità della risorsa, dell'uso del suolo, delle attività presenti sul territorio afferente e delle caratteristiche degli ecosistemi connessi e/o di particolari condizioni ambientali.

Tale approccio metodologico ha caratteristiche di ampia generalità e trova la sua base concettuale in due riferimenti classificatori, ambedue connessi all'uso potabile della risorsa sotterranea.

In particolare la classificazione della qualità di base deriva direttamente dalla nota proposta avanzata già nel 1993, congiuntamente dall'IRSA- CNR e dal GNDCI (Gruppo Nazionale per la Difesa dalle Catastrofi Idrogeologiche), e sperimentata con successo in numerose ambientazioni idrogeologiche e situazioni territoriali rappresentative a livello nazionale .

Per la classificazione legata ai parametri addizionali il valore soglia indicato è relazionato alle normative dell'uso potabile (DLgs. 31/01 e adeguamento della direttiva comunitaria 98/93/CE del Consiglio della Comunità Europea).

Gli schemi di monitoraggio e classificazione del DLgs.152/99 implicano da un lato la disponibilità di procedure e di metodologie analitiche standardizzate e dall'altro di una sufficiente omogeneità di rilevamento, soprattutto per i parametri addizionali, al fine di garantire condizioni di confrontabilità dei risultati a livello nazionale.

In tale ambito rilevanti sono gli aspetti relativi all'impegno operativo di campo e di laboratorio ed alle risorse finanziarie necessarie al conseguimento dei risultati di monitoraggio e classificazione.

Pertanto in prospettiva si dovrebbe tendere ad una qualche semplificazione/omogenizzazione delle procedure operative relative alla sezione dei parametri addizionali che consenta di ottimizzare da parte delle autorità competenti l'impiego delle risorse umane e finanziarie.

Un'analisi delle tendenze evolutive delle modalità di monitoraggio dei corpi idrici sotterranei evidenzia alcune caratteristiche:

- esiste la necessità di monitorare un numero sempre maggiore di sostanze chimiche di sintesi introdotte nell'ambiente sotterraneo e che si diffondono nei corpi idrici;
- le concentrazioni che si andranno a rilevare saranno sempre più basse in relazione a standards più restrittivi;
- dovrà essere esaminata più a fondo la componente biologica e quella tossicologica.

Al conseguimento degli obiettivi di una migliore efficienza delle azioni di monitoraggio e della confrontabilità dei risultati di classificazione contributi significativi possono essere forniti da:

- la messa a punto di sistemi di monitoraggio rivolti alla determinazione di parametri sintetici, rappresentativi di gruppi di sostanze piuttosto che di singoli composti;
- l'uso di metodologie integrate per gli aspetti chimico-fisico, biologico e tossicologico;
- lo sviluppo di metodologie e procedure ottimizzate di campo e di laboratorio.

Obiettivi

Obiettivo generale del progetto proposto è la sperimentazione, di laboratorio e di campo, di procedure e metodologie per la determinazione di parametri/indicatori globali o complessivi di tipo chimico-organico in relazione all'applicazione del DLgs 152/99.

I gruppi di sostanze che vengono presi in considerazione da siffatti parametri/indicatori sono riconducibili alla Tabella 21 del suddetto decreto.

L'utilizzazione nelle attività di monitoraggio di particolari parametri/indicatori complessivi, relativi a determinati gruppi di sostanze o ad effetti sinergici della contaminazione delle acque sotterranee, consentirebbe di graduare e modulare gli impegni analitici in funzione della reale presenza degli inquinanti e della rilevanza degli effetti dannosi ad essi imputabili.

In particolare i parametri/indicatori di gruppo e/o di effetto sono applicabili a livello di screening analitico, rimandando l'esecuzione delle specifiche determinazioni delle diverse sostanze afferenti a una loro risposta positiva o dubbia.

La determinazione di questi parametri/indicatori complessivi è valida anche a livello di laboratorio, ma trova la sua validità principale soprattutto sul terreno, in quanto consentirebbe anche una gestione efficace delle fasi di campionamento, pre-concentrazione dei campioni e loro conservazione.

La possibilità di misurare in campo tali parametri/indicatori è legata alla disponibilità di apparati strumentali idonei ad essere trasportati (laboratorio mobile), di facile utilizzazione e con impegno finanziario contenuto.

Eventuali risultati positivi del progetto, relativi all'utilizzabilità di parametri/indicatori complessivi possono rappresentare un'alternativa procedurale ai criteri di monitoraggio e classificazione previsti dal Dlgs. 152 (caratterizzata da una sensibile semplificazione delle operazioni e relativa riduzione dei costi) da inserire nelle modalità tecniche attuative.

Gli obiettivi specifici del progetto sono:

- Ottimizzazione delle procedure di campionamento e misura sul terreno con l'ausilio di strumenti di screening in grado di indirizzare la parte analitica di laboratorio.
- Riduzione degli impegni analitici di routine di laboratorio a vantaggio di determinazioni specifiche.
- Riduzione dei costi di esecuzione del monitoraggio dello stato ecologico dei corpi idrici sotterranei senza perdita del dettaglio di informazioni.
- Omogenizzazione e semplificazione del monitoraggio per quanto riguarda i parametri addizionali.

Materiali e Metodi

La possibilità di misurare in campo dei parametri/indicatori è legata alla disponibilità di apparati strumentali idonei ad essere trasportati (laboratorio mobile), di facile utilizzazione e con impegno finanziario contenuto.

Per la determinazione di siffatti parametri/indicatori è necessario:

- Individuare i gruppi di sostanze contaminanti, significativi per il monitoraggio alla luce dei criteri generali esposti nel DLgs. 152, che possano essere oggetto di una valutazione complessiva o globale;
- Valutare le condizioni di determinazione di tali parametri indicatori per via strumentale in campo e in laboratorio tenendo conto delle problematiche di rilevabilità e riproducibilità;
- Esaminare criticamente dal punto di vista tecnico economico le offerte di strumentazione a livello industriale e l'opportunità di finalizzarne l'uso agli scopi del progetto;
- Sviluppare protocolli di base valutandone le caratteristiche di risposta analitica;
- Sperimentare a scala di laboratorio le determinazioni analitiche dei parametri indicatori;
- Confrontare i risultati analitici ottenibili mediante l'uso di parametri/indicatori con quelli ottenibili con le metodologie tradizionali;
- Sviluppare metodologie standardizzate applicabili in laboratorio e/o sul campo (laboratorio mobile);
- Applicare in condizione di monitoraggio operativo, su una rete di monitoraggio regionale, i parametri indicatori sperimentati in laboratorio.

Una prima indicazione delle possibilità di applicazione dei parametri/indicatori complessivi riguarda le seguenti determinazioni:

- Determinazione della carica batterica delle acque mediante tecniche di valutazione globale del contenuto di microrganismi presenti nelle acque (bioluminescenza) con applicazione sul campo e confronto con i metodi tradizionali.
- Analisi del TOX, cui rispondono composti quali i solventi organoclorurati e organobromurati, i PCB, gli insetticidi e fungicidi organoclorurati.

I due parametri globali aspecifici individuati per la sperimentazione si relazionano a situazioni di degrado qualitativo originate dalla presenza di contaminanti diversificati di rilevante importanza dal punto di vista tossicologico igienico, ma, comunque, di complessa determinazione individuale.

In particolare un parametro affronta la problematica dei cloroderivati organici sintetici; l'altro vuole contribuire ad ottenere informazioni rapide sulla contaminazione microbica, indicatore di suscettibilità delle falde acquifere.

I Composti organici cloroderivati.

A fronte delle caratteristiche negative dal punto di vista ambientale dei composti cloroderivati organici (scarsa biodegradabilità, liposolubilità, tossicità) e dalla pericolosità per l'uomo (mutagenicità, cancerogenicità) esistono difficoltà di determinazione specifica dei singoli composti connesse a tecniche d'indagine specifiche, complesse e costose.

Come noto anche con l'impegno di raffinate tecniche analitiche, come la GC accoppiata alla MS, o sistemi GC-F TIR e HPLC è possibile la determinazione solo di una parte delle numerose sostanze del genere in argomento.

In particolare, la tecnologia attuale consente, di dosare i composti che possono essere vaporizzati senza decomposizione. Per altri composti non vaporizzabili non esiste attualmente una specifica strumentazione che faccia fronte alla bisogna.

Nessuna delle metodiche di rilevazione finora applicabili (tranne l'attivazione a neutroni, la quale per altro richiede una strumentazione molto sofisticata) risponde in maniera uniforme a tutti i composti organici alogenati.

Inoltre, a causa della grande varietà dei composti presenti da determinare, la loro determinazione quali-quantitativa diviene comunque il collo di bottiglia dell'analisi.

Data l'estrema difficoltà, o addirittura l'impossibilità, di determinare tutti singoli individui alogenati, si cerca di quantizzare queste sostanze attraverso la determinazione degli alogeni liberati dalla loro distruzione ossidativa, introducendo parametri globali e aspecifici quali: AOX (Alogeni Organici Adsorbibili su carbone), POX (Alogeni purgabili) ed EOX (Alogeni Organici estraibili con solvente).

Ad esempio in Olanda, il KIWA (Ente nazionale di ricerca nel campo delle acque) ha recentemente messo a punto una metodica riguardante l'analisi dei composti organici alogenati adsorbibili (AOX) su carbone attivo come parametro di indagine dello stato di purezza delle acque.

Anche l'ISO (International Organization for Standardisation), sulla base di quanto è già stato fatto in questo campo da alcuni paesi, ha pubblicato, in attesa della versione definitiva del metodo ISO stesso, una bozza (ISOP-9562) per la misura degli alogeno-derivati organici.

L'Unione Europea (EU) ha riconosciuto l'importanza, in particolare degli AOX, nell'ambito della prevenzione dell'inquinamento ambientale. Tuttavia in Europa la legislazione che riguarda l'ambiente varia ancora da paese a paese, anche se le intenzioni sono o dovrebbero essere le stesse.

Dato il grande numero di fonti industriali e civili degli scarichi e l'innumerabile molteplicità dei prodotti organo alogenati presenti negli scarichi stessi, l'uso di parametri globali aspecifici che, mediante una strumentazione non particolarmente sofisticata, rappresenta una modalità estremamente valida per rappresentare a livello di screening l'inquinamento chimico dell'ambiente.

A seconda della procedura adottata per estrarre questi composti dalle acque, i TOX (Total Organic Xalogen) sono considerati come somma di composti organici assorbibili (AOX), strippabili (POX), ed estraibili con solvente (EOX).

Agli AOX appartengono composti non particolarmente volatili come i PCBs gli insetticidi organoclorurati, gli idrocarburi clorurati pesanti, ecc. , mentre per i POX ricordiamo i trialometani ed i clorobenzeni.

Il parametro AOX è definito come la quantità di composti organici (O) alogenati (X = Cl, Br, I) adsorbibili (A) su carboni attivi. Tutti gli AOX misurati sono espressi come quantità di cloruri.

Questo è un parametro che è definito con il metodo in cui è stato determinato e perciò la sua espressione è una convenzione analitica.

Il metodo è stato sviluppato per il controllo della qualità delle acque, e usato come test sulle acque potabili. Esso rappresenta la quantità di sostanze organiche legate con cloro, bromo, e iodio (non il fluoro per motivi di maggiore polarità) che sono adsorbite su carbone attivo.

Questo metodo è utile come screening per l'evidenziazione di un eventuale inquinamento anche se non risulta utilizzabile per una eventuale classificazione della tipologia della molecola inquinante, infatti non discrimina tra le diverse molecole che possono dare un risultato positivo.

Le molecole che vengono meglio adsorbite sono quelle a bassa polarità come ad esempio: solventi organoclorurati, i policlorobifenili, gli insetticidi, ed i fungicidi organoclorurati (clorofenolo, acido benzoico, tricloroetilene, alaclor, 4- cloronitrobenzene, 1,2 dicloroetano, esaclorocicloesano, 4 bromofenolo, esaclorobenzene, pentaclorofenolo, 3-cloronitrobenzene, 1,2- dicloroetano, dicloroetene, tetraclorometano, tricloroetano, atrazina).

Le molecole polari avendo poca affinità con il carbone attivo non vengono dosate quantitativamente; tra queste ricordiamo l'acido clorosuccinico, il cloroetano ecc.

Materiali e metodo.

E' stato testato il Kit Dr. Lange LCK 391.

Il principio del metodo si basa sul fatto che i composti organici alogenati disciolti nelle acque sono adsorbiti dal carbonio attivo per le loro caratteristiche idrofobiche. Il carbone adsorbito viene poi incenerito in presenza di ossigeno. Gli alogeni derivanti dai legami con i composti organici sono letti come alogeni liberi. Gli alogeni liberi prodotti reagiscono in cuvetta sviluppando una colorazione che è letta fotometricamente a 468 nm.

La concentrazione di AOX è espressa in $\mu\text{g/l}$ di cloruri poiché la maggior parte di molecole organiche alogenate ha come legante il cloro.

Applicazione.

Il metodo è applicabile ad acque reflue e di controllo di industrie galvaniche, acque potabili e acque superficiali.

Intervallo di misura (riportato dal metodo).

40 ml di campione : 50-500 $\mu\text{g/l}$ AOX (200-2000 $\mu\text{g/l}$ come 2-clorofenolo; 58-585 $\mu\text{g/l}$ come tetracloroetilene)

300 ml di campione : 5-70 $\mu\text{g/l}$ di AOX (20-280 $\mu\text{g/l}$ come 2-clorofenolo; 6-82 $\mu\text{g/l}$ come tetracloroetilene)

In laboratorio non siamo riusciti a scendere al di sotto di 15 $\mu\text{g/l}$ di cloruri per le letture del bianco.

Interferenze

La determinazione è influenzata da alti contenuti di COD e Cloruri del campione. Le concentrazioni seguenti sono interferenti sull'analisi degli AOX

Volume di campione	Cloruri	COD
40 ml	3000 mg/l	1000 mg/l
300 ml	1000 mg/l	100 mg/l

Se una alta concentrazione di COD provoca una sottostima dei risultati poiché si instaura una competizione tra tutte le molecole organiche adsorbibili, dall'altra parte una elevata concentrazione di cloruri può portare ad una sovrastima nella determinazione colorimetrica finale.

Quando il campione contiene concentrazioni superiori ai valori riportati in tabella è necessario procedere con diluizioni.

Altri tipi di problemi si hanno quando il contenuto di composti organici volatili clorurati è superiore al 25% in quanto si ha comunque una perdita; in effetti in questo caso i POX vanno determinati con il metodo dello spazio di testa.

Particolare attenzione va rivolta all'inquinamento ambientale e alla pulizia della vetreria.

Procedimento

Il procedimento può essere riassunto in 4 punti:

- 1- Arricchimento su carbone attivo;
- 2 -espulsione degli alogeni inorganici per mezzo del lavaggio della compressa adsorbente;
- 3- mineralizzazione per mezzo dell'incenerimento (o digestione chimica a secco)della compressa di carbone attivo;
- 4- misura colorimetrica dei cloruri prodotti dalla mineralizzazione.

1. Arricchimento della compressa di carbone attivo

si misura la quantità di acqua, per 300 ml si usa la beuta, per 40 ml si usa il provettone, si inserisce il magnete, la compressa di carbone attivo dopo aver regolato il pH tra 2 e 3 con la soluzione A contenuta nel Kit e si lascia arricchire sotto agitazione per 30 minuti.

2. Espulsione degli alogeni inorganici per mezzo del lavaggio della compressa adsorbente:

si lava accuratamente il filtro di carbone attivo per eliminare i cloruri inorganici presenti. Questo passaggio risulta piuttosto critico, in effetti un campione che contiene una elevata concentrazione di cloruri può dare dei risultati sovrastimati.

3. Mineralizzazione per mezzo dell'incenerimento:

si tratta della digestione del disco di carbone attivo per combustione in presenza di ossigeno. Prima di posizionare il carbodisk, si aggiungono nel camino 2 ml della soluzione B, si chiude il sistema (Powerlyser) e si porta al microonde 1 minuto a 900W.

Una buona riuscita dell'incenerimento del Carbodisk si ha quando è totalmente asciutto, pertanto è necessario lasciarlo asciugare per non meno di 2 minuti.

4. Misura colorimetrica dei cloruri prodotti dalla mineralizzazione:

Si utilizza il test in cuvetta, si legge l'assorbanza e si calcola la concentrazione di cloruri prodotta; una aliquota dello stesso campione analoga alla prima viene trattata ripartendo dal punto 1.

Il risultato finale è la somma dei due risultati parziali.

I criteri adottati per la scelta delle aree da considerare sono stati i seguenti: zone già note per casi pregressi di contaminazione, reperti analitici che comprovassero la tipologia e l'entità delle contaminazioni esistenti, possibilità di un adeguato supporto logistico per la fase relativa al campionamento. In base a questi presupposti sono stati individuati tre ambiti idrogeologici di pianura ove si hanno contaminazioni di tipo industriale su acquiferi ad uso potabile (Città di Castello, Perugia-S.Sisto-Balanzano e Marsciano), per un totale di 34 campioni. I prelievi hanno riguardato sia pozzi distribuiti nell'area di studio con prelievi effettuati con pompe, sia profili verticali di distribuzione degli inquinanti (campionamenti a diverse profondità).

Per evidenziare gli andamenti verticali degli inquinanti, il campionamento è stato condotto immergendo in falda un campionatore Bailer in polietilene da 90 cm x 38 mm D.I. e prelevando a diverse profondità in condizioni piezometriche statiche.

I campioni sono stati prelevati in bottiglie di vetro scuro con tappo smeriglio, refrigerati e immediatamente portati in laboratorio per l'esecuzione dell'analisi.

La contaminazione microbica delle falde.

Riguardo alla contaminazione microbica, nuovi metodi di determinazione rapida stanno emergendo nella moderna microbiologia e stanno incontrando il giudizio favorevole degli Enti regolatori sempre alla ricerca di alternative ai metodi tradizionali che causano costosi ritardi nell'ottenimento dei risultati analitici. Particolare attenzione a tali procedure è data dall'industria alimentare e farmaceutica, da quella cosmetica e da quella microelettronica.

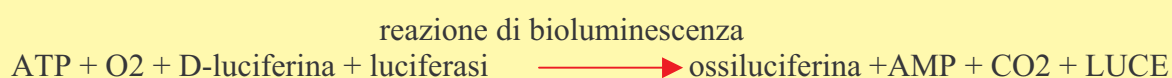
In particolare la tecnologia bioluminescente dell'ATP (Adenosine Triphosphate) è un metodo di determinazione rapida della carica microbica che può soddisfare la richiesta di sensibilità e di economicità.

Gli studi storici indicano che l'energia rilasciata sotto forma di luce in presenza di ATP è proporzionale alla qualità di ATP e proporzionale alla conta cellulare.

L'uso di questo indice potrebbe portare anch'esso un contributo alla semplificazione delle valutazioni di screening del livello di contaminazione delle acque sotterranee.

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.



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. E' 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.

Nel corso della prima fase del progetto, attivata nel 2003, è stato avviato lo studio per sviluppare e verificare la possibilità di utilizzare indici di contaminazione microbiologica per la sorveglianza attiva del rischio d'inquinamento degli acquiferi.

Sono stati effettuati 24 prelievi presso pozzi presenti nel Territorio della Conca Eugubina (CEU) e della Media Valle del Tevere (MVT), appartenenti alla rete regionale di monitoraggio ai sensi del DLgs. 152/99 e successive modifiche, mediante l'uso del laboratorio mobile ARPA, appositamente concepito per l'ottimizzazione delle attività di terreno, in ambito Progetto Interregionale PRISMAS del Ministero dell'ambiente.

Su questi campioni si è proceduto alla misurazione in campo, all'interno del laboratorio mobile, della molecola di ATP con un apposito strumento (bioluminometro BioProbe della Pall), capace di rilevare la luminescenza dopo reazione con luciferina e luciferasi. Più precisamente, sono stati concentrati, mediante filtrazione, 500 ml di campione su funnels sterili da 0.45 µm; sui filtri prelevati è stato aggiunto un liquido di estrazione che lisando le membrane cellulari libera l'ATP in esse contenuto; dopo alcuni secondi sono stati aggiunti la D-luciferina e l'enzima luciferasi e si è proceduto rapidamente all'inserimento dei filtri nel bioluminometro e alla misura della luminescenza dell'ATP espressa in unità RLU (relative light units). Al valore del campione è stato sottratto quello del bianco misurato nelle medesime condizioni, ma utilizzando acqua bi-distillata sterile.



Fig. 1- Il Laboratorio mobile utilizzato ed il banco di lavoro interno

I campioni sono stati raccolti in contenitori sterili, tutte le operazioni sono state effettuate utilizzando materiale sterile monouso mentre i materiali metallici sono stati sempre flambati prima del loro utilizzo.

Sono stati effettuati, inoltre, prelievi in doppio, per ripetere in laboratorio le misure luminometriche e per determinare, con le consuete metodiche microbiologiche (Rapporti ISTISAN 97/8 –1997), la carica batterica a 37°C e a 22°C, i coliformi totali, i coliformi fecali e gli streptococchi fecali.

La seconda fase operativa 2005 del progetto si è sviluppata nella primavera 2005 e l'attività ha interessato gran parte degli stessi punti del 2003, con una riduzione di campioni in Conca Eugubina ed un aumento in Media Valle del Tevere.

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 tecnico specifico.

I risultati ottenuti dalla loro comparazione evidenziano che 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).

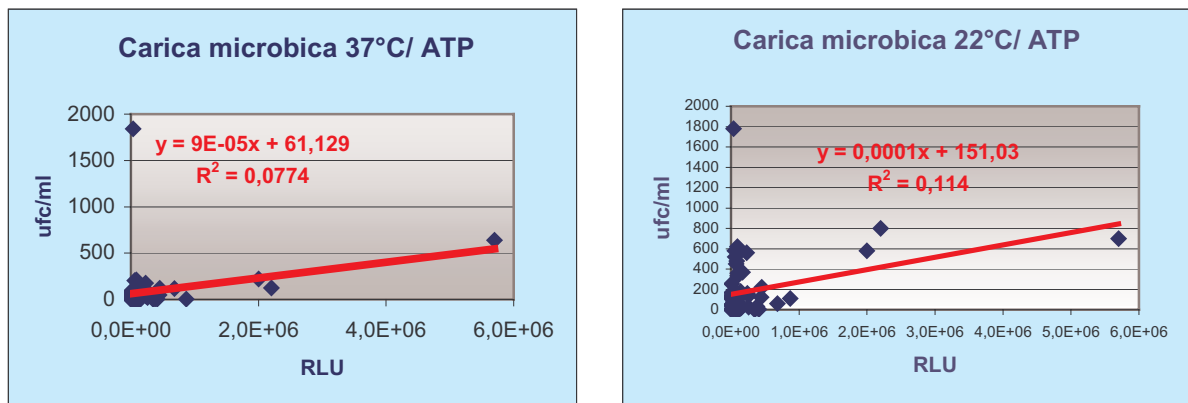


Fig. 2- Grafici di correlazione fra le concentrazioni della carica microbica a 37°C e 22°C (UFC/ml) e i valori di ATP (RLU). Dati relativi a 64 campioni

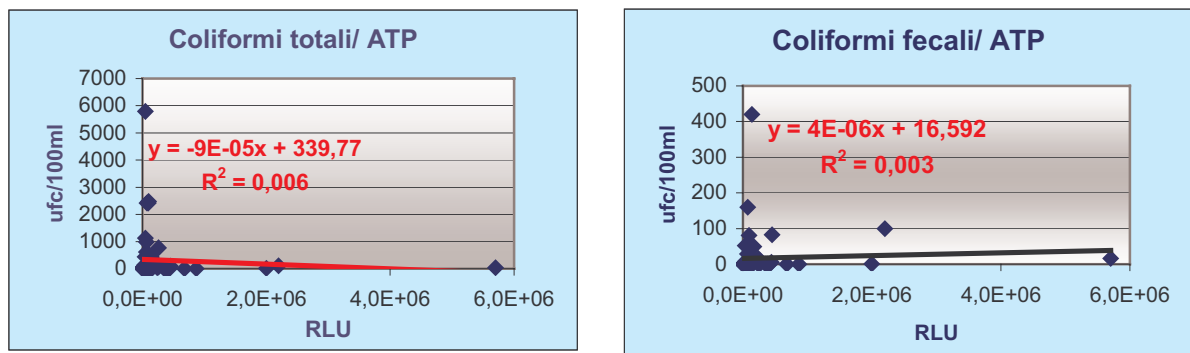


Fig. 3- Grafici di correlazione fra le concentrazioni dei Coliformi totali e fecali (UFC/ml) e i valori di ATP (RLU). Dati relativi a 61 campioni

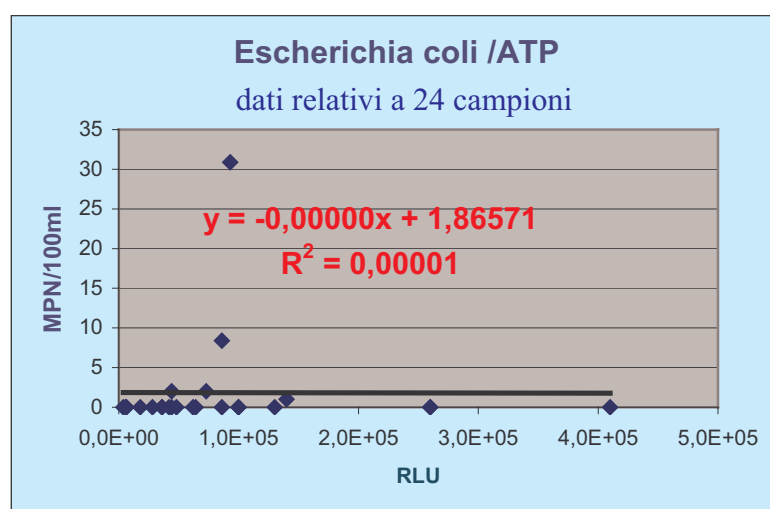
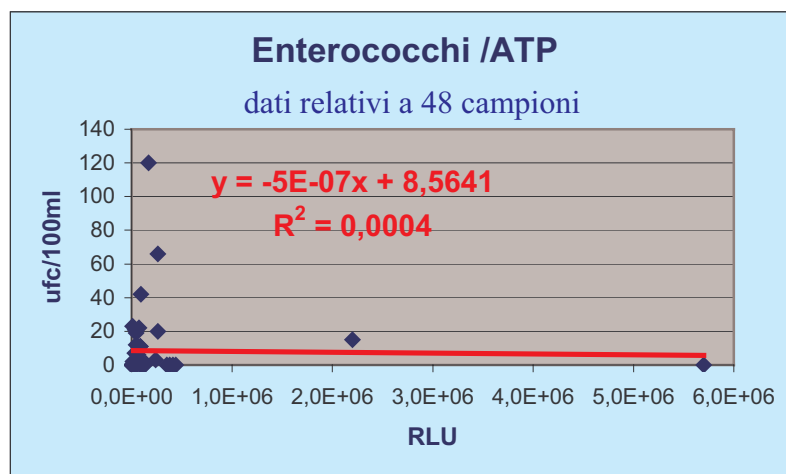


Fig. 4- Grafici di correlazione fra le concentrazioni degli Enterococchi (ufc/ml) e E. coli (MPN/ml) e i valori di ATP (RLU).

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 10^4 , relativi ai 24 pozzi monitorati nel 2005, risultano associati valori che oscillano da 1 a 1840 UFC per la carica a 37°C e da 6 a 1780 UFC per quella a 22°C.

Fluttuazioni di tale ordine sono state osservate anche per i dati raccolti durante le altre campagne di prelievo.

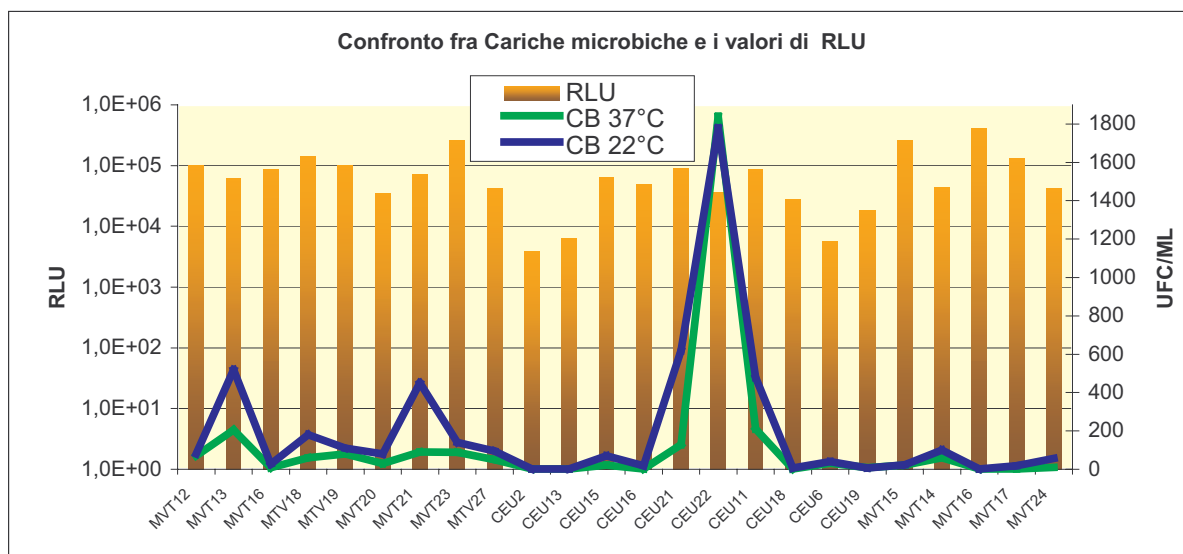


Fig. 5- Confronto fra le concentrazioni della Carica microbica a 37°C e 22°C (ufc/ml) e i valori di ATP (RLU).

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 per alcuni campioni delle differenze consistenti di lettura, che a macroscala non danno una 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.

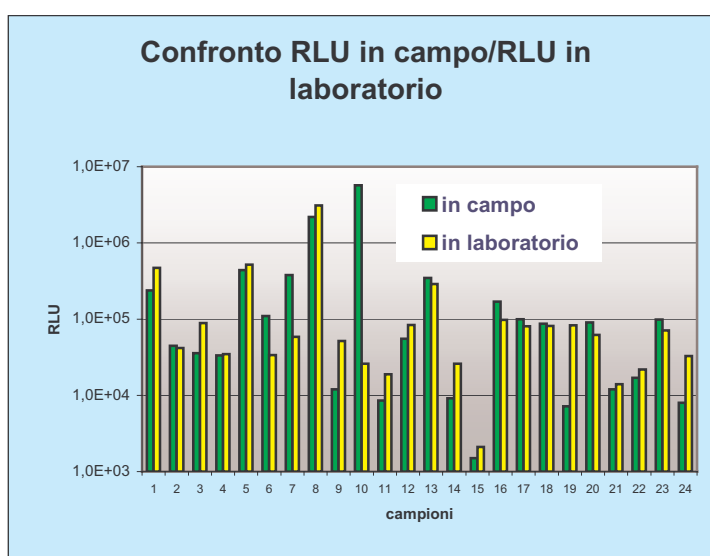


Fig. 6 - Grafici relativi alle misure luminometriche eseguite in doppio in campo e in laboratorio.

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%).

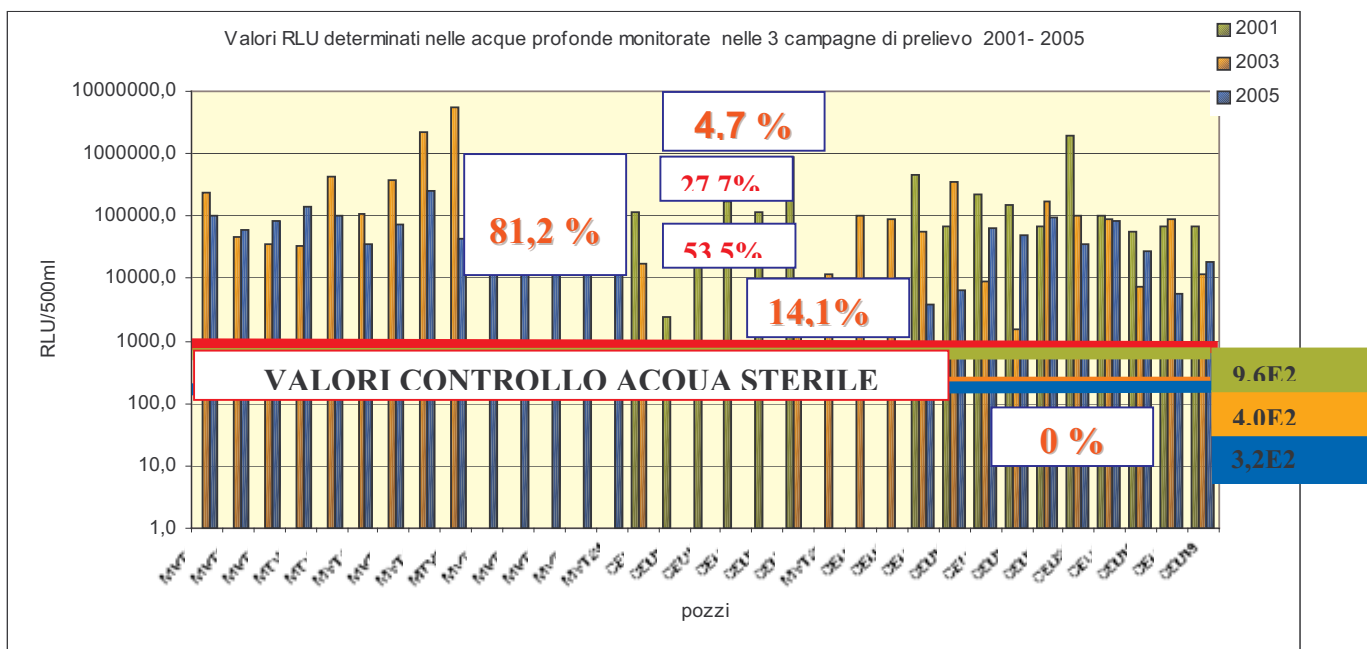


Fig. 7- Grafico dei dati luminometrici ottenuti per i campioni esaminati dal 2001 al 2005 e dei livelli di background ottenuti durante la sperimentazione.

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 legate a contaminazione fecale.

Se si analizzano i dati graficati in Figura 7, in funzione di valutazione ambientale, ossia a prescindere dalla tipologia di batteri presenti nelle acque campionate, si possono fare alcune valutazioni collegabili alla caratterizzazione degli acquiferi ed alla loro variabilità di comportamento nel tempo.

Nel nostro caso, due acquiferi alluvionali aventi pressioni ambientali diverse.

I dati luminometrici misurati nel 2003 e 2005 in Conca Eugubina risultano mediamente inferiori a quelli rilevati in Media Valle del Tevere, e questo può essere riconducibile a un diverso grado di sensibilità degli acquiferi e/o ad una differente capacità di sviluppo e persistenza delle colonie batteriche.

Nel caso della Conca Eugubina si possono valutare anche i risultati di tre anni di osservazioni distinte: una variazione di 2 ordini di grandezza dei valori luminometrici è sicuramente significativa ed implica che ci siano fattori ambientali, naturali o meno, che possono incidere sull'abbondanza di ATP, e batteri presenti: sicuramente si può pensare a fattori climatici, piogge e loro intensità e distribuzione, a fattori antropici quali arrivo di nutrienti e percolazioni dal suolo, impatti di sostanze chimiche organiche ed inorganiche diffuse dal suolo (fitofarmaci, metalli, solventi ecc...).

Metodo AOX.

Le aree selezionate per il campionamento erano state precedentemente caratterizzate analiticamente come contaminate prevalentemente da solventi volatili clorurati per cui si è ritenuto opportuno ricontrollare per confronto anche il valore di tali analiti.

La tabella 2 riporta i valori ottenuti per la determinazione degli AOX insieme al valore dei VOC (composti organoalogenati volatili ed in particolare tri e tetracloro etilene)

I VOC sono stati determinati in una aliquota dello stesso campione prelevato per la determinazione degli AOX ed analizzati con la tecnica dello spazio di testa statico e determinazione gascromatografica (Metodo 5150 APAT IRSA-CNR Man 29/02 2003).

CAMPIONI	AOX µg/l (Cl-)		VOC µg/l	Tipo di prelievo	
	ml di campione usato				
	40	300			
Pozzo 3bis		91	<1,0	P	
Pozzo 5		22	<1,0	P	
Pozzo 7	426		0,71	P	
Pozzo 10		18	<1,0	P	
Pozzo 11	204		<1,0	P	
Pozzo 3	1 m	20	16	<1,0	B
	7 m	159		<1,0	B
	13 m	171		<1,0	B
Pozzo 3	20 m	338		<1,0	B
Pozzo 4	22 m	72	30	<1,0	B
Pozzo 6	29 m	150		<1,0	B
Pozzo tirasegno	1 m	92	87	1,2	B
	10 m		62	1,2	B
	16 m	213		1,9	B
Pozzo cantina sociale	1 m	156		37	B
	5 m	472	396	63	B
	7 m	158		31	B
Pozzo D	1 m		47		B
	15 m		79		B
	30 m		340		B
	45 m		175		B
	60 m		200		B
	75 m		105		B
	90 m		350		B
	105 m		129		B
	120 m		118		B
133 m		45		B	
Pozzo P71	285		53,6	P	
Pozzo P73	105		<1,0	P	
Pozzo P69	2686		3478	P	
Pozzo P70	5342		2005	P	
Pozzo P77	202		<1,0	P	
Pozzo P78	346		<1,0	P	
Pozzo P74	634		19,7	P	

Tab. 2 – Analisi di AOX , VOC e tipo di campionamento eseguito (B: campionamento eseguito con campionatore Bailer; P: campionamento eseguito con pompa peristaltica)

Da un'analisi dei dati possiamo fare le seguenti considerazioni:

- Gli andamenti ottenuti in alcuni casi (Fig.8 e Fig.9) sono caratteristici del tipo di inquinante monitorato. In effetti alcuni idrocarburi alogenati (metano alogenato, cloroformio, tetracloruro di carbonio, tri e tetracloroetilene, 1,1,1-

tricloroetano) essendo più pesanti dell'acqua tendono a depositarsi al fondo della falda.

Questi composti possono essere individuati facilmente anche se si trovano a grande profondità e ciò perché essi sono poco solubili nell'acqua, hanno un elevato coefficiente di diffusione, un'elevata tensione di vapore ed inoltre non vengono biodegradati facilmente.

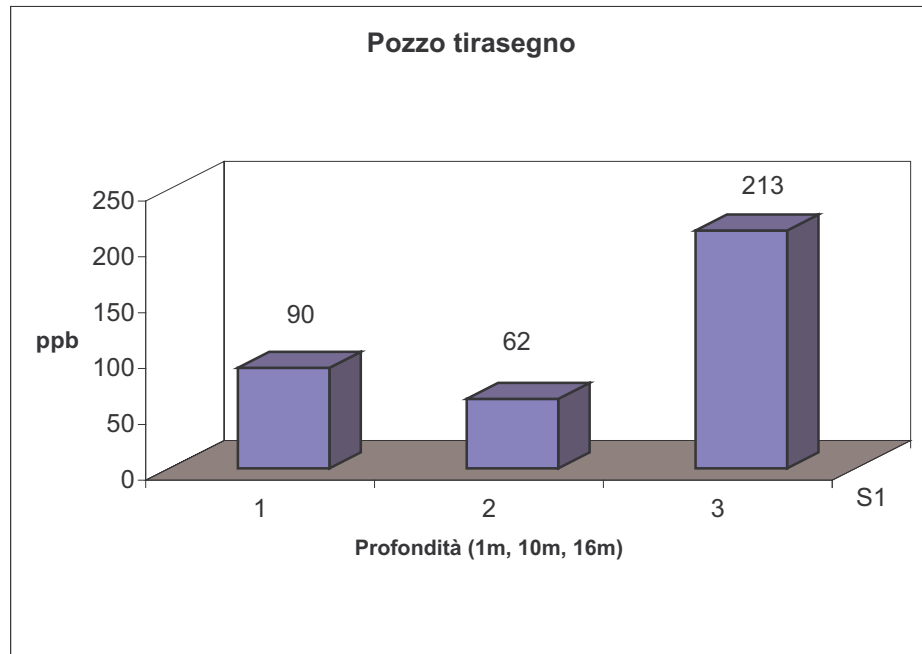


Fig. 8 – Andamento della concentrazione di AOX ($\mu\text{g/l}$ di Cl^-) in funzione della profondità.

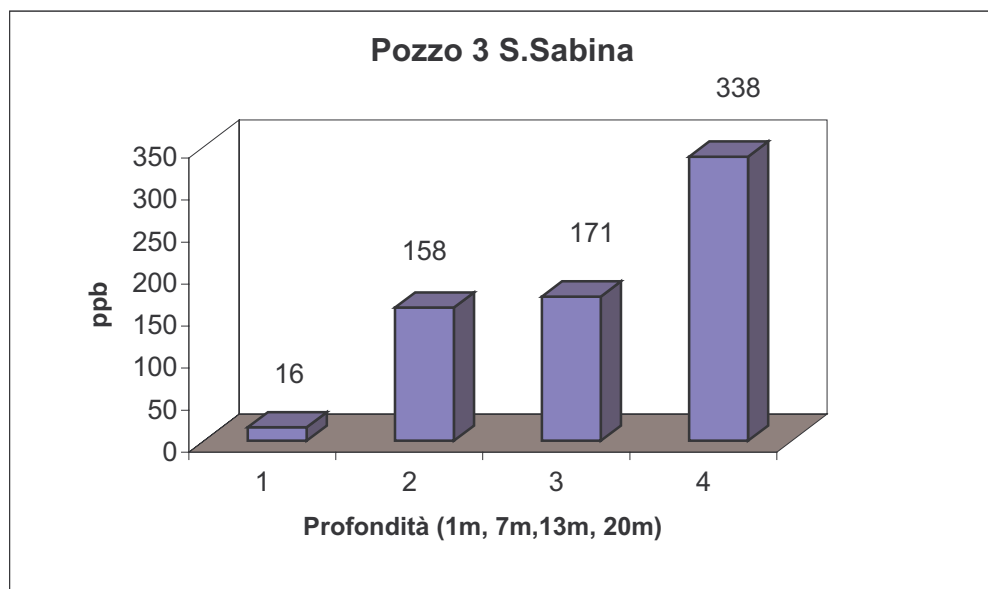


Fig. 9 – Andamento della concentrazione di AOX ($\mu\text{g/l}$ di Cl^-) in funzione della profondità

- Una situazione diversa è stata evidenziata in un pozzo nuovo (Fig.10) molto profondo localizzato comunque in un'area in cui è stato recentemente individuato un massiccio inquinamento dello stesso tipo del precedente che ha dato un andamento molto particolare.

Questo pozzo necessita probabilmente di ulteriori indagini.

I campionamenti sono stati eseguiti a 1m,15m, 30m, 45m, 60m, 75m, 90m, 105m, 120m,133m.



Fig. 10 - Andamento della concentrazione di AOX ($\mu\text{g/l di Cl-}$) in funzione della profondità

- I prelievi ai pozzi individuabili dai codici che vanno da P69 a P78 (Tab.2) sono stati eseguiti con pompe peristaltiche, tali pozzi sono attualmente sotto monitoraggio per l'individuazione recente di un inquinamento da tri e tetracloroetilene. In corrispondenza del prelievo per la determinazione degli AOX è stato eseguito il campionamento anche per i VOC; i risultati ottenuti sono riportati nel grafico che segue (Fig. 11).

Come si può vedere c'è una certa correlazione tra il contenuto di AOX ed il contenuto di VOC, anche se per alte concentrazioni di volatili c'è il rischio di avere una sottostima nel risultato finale.

Naturalmente per valori positivi di sostanze organoalogenati volatili ci si aspetta valori positivi di AOX, non è vero il contrario; infatti per valori positivi di AOX si possono avere valori non rilevabili di VOC (al di sotto del limite di rilevabilità del metodo che è di 1,0 ppb, che noi abbiamo contraddistinto con 0,05).

In effetti si evidenziano dei pozzi in cui anche per concentrazioni di AOX significative il valore dei VOC è al di sotto del limite di rilevabilità; in questo caso si dovrebbe ricontrollare il dato e se necessario approfondire l'indagine per individuare quali altri composti organici clorurati, possano essere presenti.

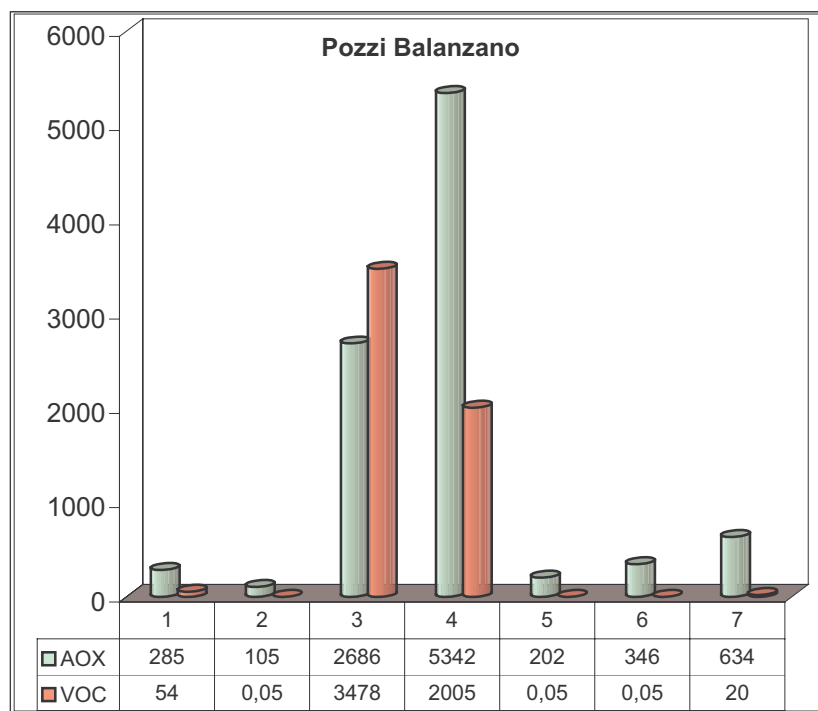


Fig. 11 – Andamento delle concentrazioni di AOX confrontate con la presenza di VOC in diversi pozzi di una zona inquinata

Conclusioni

Il test effettuato sulle due metodologie di progetto si proponeva di valutarne l'operatività e l'applicabilità quali parametri sintetici di valutazione, uno della componente biologica, non presente nella normativa vigente sulle acque sotterranee, l'altro di ridurre il numero dei parametri di osservazione del DLgs. 152/99.

La metodologia testata per l'indicatore sulla bioluminescenza ha evidenziato l'assenza di correlazione tra dato luminometrico e dato microbiologico: essa 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.

Proprio per la sua aspecificità, la determinazione dell'ATP è risultata un indicatore non adeguato per discriminare il grado di contaminazione degli acquiferi o come metodo di screening per individuare situazioni di rischio microbiologico legato ad aspetti sanitari dovuti da agenti patogeni.

Sulle situazioni idrogeologiche studiate il metodo ha comunque evidenziato una buona capacità di distinguere situazioni spazialmente e temporalmente diversificate quanto a contenuto batterico nelle acque: cosa che consente di proporlo, previo test pilota specifici, come strumento di caratterizzazione dello stato ambientale delle falde per i parametri microbiologici.

La proposta dovrebbe essere quella di maggior approfondimenti rispetto a stati ambientali microbiologicamente e biochimicamente definiti: un uso generalizzato del valore dell'ATP potrebbe, infatti, aggiungere genericità a genericità.

Già di per se stesso lo stato ambientale microbiologico pone problemi di classificabilità. Il 152, infatti, lo mantiene legato più agli aspetti della contaminazione fecale che a quelli della saprobietà dell'ambiente, che permetterebbe una maggiore integrazione con il sistema dato di classificazione dello STATO AMBIENTALE.

Si può fare l'esempio del ciclo dell'azoto ed il variare delle concentrazioni di ammoniaca, nitrati, BOD al variare della concentrazione batterica relativa stante la competizione tra enterobatteri e nitrobatteri riguardo l'ossigeno.

Il fatto che appunto non sia possibile discriminare i due ambiti di attività microbica può dar luogo ad errate interpretazioni e valutazioni. Da qui la convinzione di un possibile uso del bioluminometro per discriminare situazioni temporali, cioè applicare il metodo allo stesso punto, per valutarne l'andamento nel tempo al variare delle pressioni.

La misura dell'ATP, in conclusione, è in funzione della quantità di organismi viventi presenti nel campione, quindi tale analisi si propone come metodo rapido per la valutazione della carica batterica presente nelle acque sotterranee.

La determinazione della contaminazione microbiologica delle acque tramite analisi dell'ATP fornisce in tempi rapidi una risposta biologica in funzione della carica batterica totale presente nel campione d'acqua; tale metodo non richiede personale particolarmente specializzato ed è poco costoso; inoltre ha il vantaggio di poter essere svolta in situ, grazie anche alla strumentazione utilizzata (trasportabile e maneggevole) ed ai tempi brevi di esecuzione.

L'analisi dell'ATP in bioluminescenza si utilizza da molti anni essi vengono applicati con successo in diversi contesti:

- stima dell'attività microbica in un processo biologico;
- stima del carico biologico totale.

Molti laboratori di controllo della qualità microbiologica già utilizzano la tecnologia della luminescenza dell'ATP per monitorare l'igiene generale dell'acqua, per valutare il carico biologico totale.

Esistono altri metodi per la stima dell'abbondanza microbica nelle acque: ad es. mediante la conta diretta in epifluorescenza; tale metodo si basa sulla conta diretta, al microscopio ottico ad immersione, delle cellule batteriche colorate con un marcatore fluorescente specifico per il DNA: il DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole).

Tale metodo però presume l'adozione di personale specializzato e di attrezzature e materiali costosi (es. microscopio ad epifluorescenza).

E' da sottolineare che in natura la maggior parte dei batteri non è coltivabile (circa 1% dei batteri naturali sono coltivabili su piastre di crescita batterica) ed è per tale motivo che l'analisi della carica batterica totale deve essere effettuata tramite metodologie che sono indipendenti dalla coltivazione degli stessi su piastra; inoltre è per questo motivo che non sempre esiste una correlazione tra carica batterica totale e numero di colonie cresciute su piastra.

In sintesi il metodo bioluminometrico, applicato nel monitoraggio degli acquiferi, è risultato:

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

Il bioluminometro è un apparecchio semplice da usare e, date le sue piccole dimensioni, si adatta abbastanza bene anche ad analisi sul campo; i tempi medi di campionamento ed analisi si aggirano intorno ai 25/30 minuti. I tempi medi d'analisi in laboratorio, utilizzando la cappa a flusso orizzontale che permette di evitare la contaminazione del campione da parte dell'ambiente circostante, sono approssimativamente gli stessi di quelli sul campo; lo strumento è in grado in pochi secondi di misurare direttamente la contaminazione batterica che si deposita sulla superficie delle membrane utilizzate per filtrare i campioni liquidi secondo la tecnica MF.

Il laboratorio mobile non consente di lavorare nelle condizioni di astaticità ottenibili in laboratorio (soprattutto sussiste la difficoltà di eliminare l'ATP dalle superfici). Occorre tra l'altro tenere presente che, all'interno del laboratorio mobile, si eseguono spesso altri tipi d'analisi che possono influenzare i valori bioluminometrici. Inoltre eseguire più analisi di diverso tipo (chimico-fisiche) all'interno del laboratorio mobile, può creare problemi di spazio, infatti, il solo bioluminometro, pur essendo piccolo e maneggevole, richiede una pompa portatile per la filtrazione, funnels sterili, contenitori termici, la borsa che contiene lo strumento ecc.: tutti questi elementi occupano un volume non trascurabile che deve essere previsto nella strutturazione di appositi mezzi mobili.

I reattivi utilizzati per il bioluminometro prima dell'uso possono essere conservati tra i 2° e gli 8°C per un tempo relativamente lungo (circa dodici mesi) ma, una volta ricostituiti e distribuiti in aliquote, vanno usati entro 5 giorni. Le aliquote preparate possono essere congelate a -18°C e conservate per 3 settimane, ma se scongelate, vanno consumate nelle 24 ore. Questo comporta la necessità di organizzare le indagini di ricerca in modo e tempi ben programmati.

In relazione all'utilizzo della metodica per la determinazione degli AOX si possono fare le seguenti considerazioni.

Questo sistema risulta essere abbastanza semplice da usare in laboratorio, anche se abbiamo individuato delle criticità piuttosto marcate che risultano :

- pulizia della vetreria, che deve essere molto accurata;
- inquinamento ambientale e cioè massima attenzione nell'uso di solventi clorurati negli spazi in cui si sta eseguendo l'analisi.

Per l'applicazione nel laboratorio mobile, il problema di avere un quantitativo di vetreria pulita e che si mantenga tale crea problemi notevoli per lo spazio e per il trasporto; l'uso inoltre di solventi all'interno del laboratorio mobile per altri tipi di analisi o di trattamento del campione potrebbe dare forti interferenze positive. La combustione del Carbodisk avviene nel Powerlyser posizionato all'interno del forno a microonde, quindi va individuato, nel laboratorio mobile uno spazio dedicato, e procurarsi un'alimentazione (costituita da un generatore) sufficiente a far funzionare il forno.

I tempi di analisi sono di circa 2 ore quando si analizzano 300 ml di campione e circa 50 minuti per l'analisi di 40 ml di campione. I tempi di risposta sono perciò buoni rispetto al ventaglio di classi di sostanze indagate, che se analizzate separatamente in laboratorio avrebbero tempi molto più lunghi e costi non confrontabili.

I reattivi, in particolare le cuvette per la determinazione colorimetrica dei cloruri vanno conservati ed usati ad una temperatura compresa tra +2 e +8°C.

I limiti di rilevabilità individuati sono più alti di quelli dichiarati dal Kit; a fronte di 5 µg/l di cloruri dichiarati, non abbiamo avuto risposte per i bianchi (replicati in condizioni ottimali) più basse di 15 µg/l . Nell'ottica di una misura globale di contaminazione questo limite risulta alto poiché ad esempio il DLgs. 152/99 nella Tabella 21 – Parametri addizionali – fissa un valore limite per i Composti alifatici alogenati di 10 µg/l.

Sicuramente il metodo può essere utilizzato per la definizione di aree con contaminazioni piuttosto marcate e dare quindi indicazioni della portata dell'inquinamento, risulta però poco riproducibile per l'individuazioni di concentrazioni basse di analiti, ed in particolare non può essere significativo per il controllo di prodotti fitosanitari di tipo clorurato. La sua applicazione nel monitoraggio può essere valida a scala di rete regionale, o di reti locali, per le zone dove si hanno fenomeni contaminanti diffusi o si possono attendere nuovi eventi inquinanti da zone industriali e civili.

Lo strumento utilizzato si compone di una parte fissa o Start Set, di una bombola di ossigeno portatile e di un forno a microonde, il cui costo è piuttosto contenuto come investimento (circa 1500 €): il Kit consumabile per l'analisi di 12 campioni ha un costo di circa 200 €, con un costo analitico a campioni pari a circa 10€ includendo analisi del bianco e ripetizioni su valori anomali.

Bibliografia

APAT IRSA-CNR, 2003. Metodi analitici per le acque. Manuale 29/2003

Bakker V.; Warmer H.; Rijs G.B.J., 1995. Riza, The Netherland. Halogenated compounds in domestic sakage related to product use. Euroglas – Delft – meeting Sept. 95.

Beretta G.P., Frondini F., Giuliano G., Marchetti G., Martinelli A. & Peruzzi L., 2000. Design of a regional groundwater minitoring network: The PRISMAS project experience. Monitoring Tailor-Made III, International Workshop on information for sustainable water management. Nunspeet, the Netherlands, 25-28 September 2000.

Chiesa G., 1998. Inquinamento delle acque sotterranee. Seconda edizione. Hoepli, Milano, Italia.

Deninger R.A., Lee J., 2001. Rapid determination of bacteria in drinking water using ATP assay. *Field Analytical Chemistry and Technology*, 5: 185-189.

Galassi S., 1991. Microinquinanti organici. Distribuzione, trasporto, effetti dell'inquinamento previsioni del rischio. U. Hoepli Editore.

Giuliano G., Marchetti G., Martinelli A., Frondini F., Peruzzi L., 1999. Nuove procedure operative e strumentali sulla rete di monitoraggio delle acque sotterranee in Umbria. Atti 3° Convegno Nazionale sulla protezione e gestione delle acque sotterranee. Parma 13-15 ottobre 1999. Pubbl. n. 1985 GNDCI-CNR. Quaderni di Geologia Applicata, Pitagora ed.

Guzzella L., De Paolis A. e Giuliano G., 2003. Indici globali di contaminazione per il monitoraggio degli acquiferi. *Acqua&Aria* n. 9 novembre/ dicembre.

Hines, E., 1999. Rapid Microbiology – Overcoming Fear of the “V-Word”, *Pharmaceutical Formulation & Quality* July/August, 1999, 18-22.

ISO 9562, 1989. Determination of adsorbable organic halogens.

Osak I., Steere B., K. Seeley K., 2000. Characterization of Microbial Contaminants of Water via ATP Measurement with the BioProbe Luminometer. Gelma Laboratory.

Scalici, C., Small S., Blumberg S., English D., Jimenez L., 1998. Comparison of the Millipore Digital Total Count System and Standard Membrane Filtration Procedure to Enumerate Micro-organisms in Water Samples from Cosmetic/Pharmaceutical Environments. *Journal Rapid Methods and Automation Microbiology*, 6, 1998, 199-209.

Wills K., Woods H., Gerdes L., Hearn A., Kyle N., Meigham P., Foote N., Layte K., Easter M., 1998. Satisfying Micro-biological Concerns for Pharmaceutical Purified Water Using a Validated Rapid Test Method. *Pharmacopoeial Forum*, 24(1).