

# LA SCELTA DEI METODI PER MONITORARE LA QUALITÀ

ARPA EMILIA-ROMAGNA HA COLLABORATO ALL'INDIVIDUAZIONE DELLE TECNICHE PER LA RILEVAZIONE DI PARAMETRI MICROBIOLOGICI NELLE ACQUE DI BALNEAZIONE.

Il decreto legislativo 116 del 30/05/2008 ha stabilito due nuovi parametri microbiologici ai fini della classificazione delle acque di balneazione: *Escherichia coli* ed *Enterococchi intestinali*. Il Laboratorio tematico di Arpa Rimini ha partecipato fin dal 2008 ai lavori del gruppo di studio interregionale su "Parametri, limiti e metodi" per il recepimento della direttiva europea sulle acque di balneazione. Nel corso di questi incontri si era concordato sull'utilizzo dei metodi microbiologici per la ricerca dei nuovi parametri e in particolare l'attenzione si era concentrata sulla scelta del metodo Apat Irsa-Cnr 7030 met F tra quelli previsti per le analisi di *Escherichia coli*, dal momento che i metodi ISO, proposti dalla Commissione europea, si erano dimostrati inadeguati, e uno in particolare ISO 9308-3, tendente alla sovrastima del dato, a causa di possibili interferenze con altre specie batteriche e organismi marini. Tutte le ipotesi erano state validate da un precedente lavoro, effettuato nel 2000, dalle Agenzie ambientali delle regioni Marche, Toscana ed Emilia-Romagna.

Fu fatta formale richiesta al ministero e all'Istituto superiore di sanità affinché il metodo scelto fosse sottoposto al Consiglio superiore di sanità e inoltrato alla Commissione europea, e che rispondesse ai criteri di validazione delle norme ISO (come lo sono i metodi riportati nell'allegato I alla direttiva 2006/7/CE) secondo la norma 17994:2004 "Qualità dell'acqua - Criteri per stabilire l'equivalenza tra metodi microbiologici". In un recente incontro nazionale sui metodi microbiologici e la direttiva 2006/7/CE, Laura Mancini dell'Iss, dopo varie richieste da parte di molti rappresentanti delle Arpa e delle Regioni di adottare il metodo Apat (TBX), ha fatto presente che il processo per attivare un circuito per l'equivalenza di altri metodi (è stata riferita l'esperienza della Regione

Toscana in merito alla partecipazione nel circuito che ha condotto alla dimostrazione dell'equivalenza di un altro metodo, Colilert-18/Quanti-Tray) è molto articolato e costoso. Ha proposto, quindi, di completare la stagione balneare 2010 e avere un nuovo confronto al termine della stessa. Il Laboratorio tematico di Arpa Rimini ha applicato il metodo delle membrane filtranti ISO 9308-1, stabilito dalla direttiva, per la determinazione dell'*Escherichia coli* e contemporaneamente in parallelo anche il metodo Apat Irsa-Cnr 7030 met F.

La scelta dei due metodi è derivata dal fatto che il metodo ISO è di riferimento per la ricerca e l'enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi nell'acqua destinata al consumo umano e non è stata fatta una validazione primaria (lo studio di tutte le colonie) per quanto riguarda il suo possibile impiego nelle acque ambientali e in particolare per quelle marine. Da qui la necessità di confronto con un metodo già ampiamente utilizzato da moltissimi laboratori quale il metodo Apat, ritenuto particolarmente idoneo per le acque marine di balneazione, la cui performance è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito europeo interlaboratorio di confronto.

È stato necessario inizialmente procedere con una sperimentazione del metodo ISO su campioni di saggio, indirizzando la ricerca verso una serie di colonie che presentavano determinate caratteristiche riportate dal metodo stesso. Successive prove di conferma, effettuate su tutte le colonie "presunte positive" (colorazione di gram, gallerie di identificazione biochimiche per la speciazione) hanno dimostrato che non tutte le colonie "presunte positive" sono da considerarsi *Escherichia coli*, pur presentandosi con le caratteristiche di crescita previste dal metodo e rispondendo positivamente alle successive prove di



1

"conferma" stabilite dal metodo stesso, perché appartenenti a specie batteriche diverse. La bassa selettività del terreno, inoltre, permette la crescita di una ricca flora batterica contaminante, nonostante l'incubazione delle piastre alla temperatura di 44°C, composta da enterobatteri, bacilli gram+ e -, cocci ecc., che richiede la filtrazione di più aliquote scalari di acqua (50-10-1 ml) da sottoporre ad analisi, in modo da ottenere colonie isolate su cui poter lavorare. Il metodo Apat in condizioni normali viene condotto su una unica aliquota di 100 ml e non richiede conferme biochimiche dal momento che il terreno è molto selettivo. Restringendo il campo di ricerca a ufc con morfologia e colore particolari, si è arrivati alla conclusione che i risultati sono sovrapponibili a quelli ottenuti in parallelo con il metodo ISO. Altra criticità del metodo ISO è nel tempo di risposta: 72 ore a differenza del metodo Apat che ne richiede 18.

Il metodo per la ricerca ed enumerazione dell'altro parametro *Enterococchi intestinali* (ISO 7899-2) non ha mai presentato criticità di sorta. I metodi da noi scelti vengono tenuti sotto controllo, partecipando ai circuiti di qualità LGC Standards, e in particolare dal 2010 con campioni che simulano acque di mare. Tutti i risultati ottenuti dagli operatori rientrano nella fascia di z-score soddisfacente  $\leq 2.00$ .

David Lev

Arpa Emilia-Romagna

1 Immagine al microscopio elettronico di un cluster di *Escherichia coli*.