

Influenza dei cicli gelo/disgelo sull'inquinamento microbiologico delle acque sotterranee nei massicci carbonatici dell'Italia meridionale

Vincenzo Allocca¹, Fulvio Celico², Emma Petrella², Giuseppe Marzullo², Gino Naclerio²

¹Università degli Studi “Federico II” di Napoli, Dipartimento di Geofisica e Vulcanologia (vincenzo.allocca@unina.it)

²Università degli Studi del Molise, Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio (emma.petrella@unimol.it; giuseppe.marzullo@unimol.it; naclerio@unimol.it; Autore corrispondente: celico@unimol.it, via Mazzini, 8, 86170 Isernia, fax: 0865 411283).

Role of freeze/thaw intervals on microbial pollution of groundwater in mountainous carbonate aquifers in Southern Italy

ABSTRACT: Limestone aquifers in Southern Italy are often affected by bacterial contamination produced by pasture and agriculture. The main goal of this study was to identify, at field scale, the most suitable indicator of fecal pollution, by comparing fecal coliforms and fecal enterococci. By analyzing surface and spring water, it was noted that both the fecal indicators showed a significant decrease during the period characterized by freezing and/or freeze-thaw intervals. The data analysis shows that fecal coliforms are characterized by a significant decrease in population (3 orders of magnitude, at least) during the freezing period, while fecal enterococci are temporarily inhibited. Hence, fecal enterococci represent indicators of microbial pollution better than fecal coliforms. A taxonomic classification of fecal enterococci detected in spring water samples was performed by the API 20 Strep system and by sequencing of the ribosomal 16S DNA genes. The results suggested that freezing conditions did not cause any significant changes on the set of enterococcal species.

Key terms: Carbonate aquifers, Microbial Pollution, Fecal coliforms, Fecal enterococci, Freeze/thaw cycles

Termini chiave: Acquiferi carbonatici, Inquinamento microbiologico, Coliformi fecali, Enterococchi fecali, cicli gelo/disgelo

Riassunto

Gli acquiferi carbonatici dell'Appennino meridionale sono spesso caratterizzati da inquinamento microbiologico, generalmente indotto da stazzo e pascolo di bestiame, nonché dall'uso di concime organico per un'agricoltura non intensiva. In questo scenario, è in corso una ricerca incentrata sull'analisi dei rapporti di interdipendenza tra parametri meteorologici, idrogeologici e contaminazione microbiologica delle acque sotterranee.

Gli elementi finora acquisiti consentono di affermare che il pascolo, benché stagionale, è in grado di generare l'inquinamento microbiologico delle acque sorgive nel corso dell'intero anno idrologico. Tuttavia, è stato accertato un effetto letale dei cicli gelo / disgelo sui coliformi fecali e parzialmente letale (i batteri sono particolarmente stressati e la loro presenza/crescita con le classiche tecniche di laboratorio non è evidenziabile) sugli enterococchi fecali. Ciò fa sì che il fenomeno di inquinamento sia identificabile, in primavera, solo attraverso la ricerca degli enterococchi fecali. Tale risultato risulta particolarmente importante alla luce dell'uso esclusivo dei coliformi fecali quali indicatori di contaminazione microbica in molti Paesi del mondo.

Introduzione

Gli acquiferi carbonatici rappresentano le principali fonti di approvvigionamento idropotabile dell'Italia meridionale, erogando un volume medio annuo di circa $4100 \cdot 10^6$ m³/anno (Celico et alii, 2000). Nell'area di studio l'elevata permeabilità degli acquiferi fratturati e carsificati genera spesso un rapido trasporto dei contaminanti dalla superficie verso la falda. Poiché le attività inquinanti sono in genere circoscritte al pascolo e stazzo di bestiame, la contaminazione è soprattutto di tipo microbiologico. Ciò anche nei casi in cui il trasporto dei microrganismi avviene in modo diffuso attraverso i suoli di copertura ed il sottostante mezzo fratturato (Celico et alii, 2004a; Celico et alii, 2004b). Particolarmente interessate da questo tipo di inquinamento sono le sorgenti d'alta quota, che mostrano una contaminazione microbica discontinua, la cui evoluzione temporale è stretta funzione del regime pluviometrico (Celico et alii, 2004a). Tale fenomeno, vista la rapidità evolutiva, è ben identificabile solo attraverso un costoso monitoraggio giornaliero o settimanale. Ciò significa che risulta particolarmente importante individuare un indicatore di contaminazione affidabile, anche in condizioni meteorologiche estreme, come possono essere

quelle riscontrabili in aree montuose. Infatti, è stato accertato, sia pure attraverso esperimenti di laboratorio, che periodi di gelo prolungati ed i cicli gelo/disgelo influenzano negativamente la sopravvivenza dei batteri (Kibbey et alii, 1978).

Lo scopo principale del presente studio è quello di identificare l'indicatore più idoneo di contaminazione microbica delle acque sotterranee in acquiferi carbonatici dell'Italia meridionale, confrontando, a scala di campo, coliformi fecali ed enterococchi fecali.

Area di studio

L'acquifero campione di Acqua della Madonna (Monte Terminio, Campania; Fig. 1) è costituito essenzialmente da calcari, calcari detritici e organogeni di piattaforma (Cretaceo), appartenenti all'unità stratigrafico-strutturale dei Monti Picentini-Taburno (Civita, 1967; 1969; Bonardi et alii, 1988). Le rocce carbonatiche sono caratterizzate da una bassa porosità primaria, ma sono altamente permeabili per fratturazione e carsismo. Nelle aree di pascolo i calcari sono sottoposti a *Molli-Eutrisilic Andosols* ed a *Molli-Vitric Andosols*, lungo i versanti, ed a *Pachi-Eutrisilic Andosols* nelle piane intramontane (Di Gennaro et alii, 2002).

L'acquifero carbonatico è bordato da faglie normali (Fig. 1) che hanno generato un locale decremento della conducibilità idraulica delle rocce carbonatiche, in accordo con quanto riscontrato in altri acquiferi simili dell'Italia centro-meridionale (Celico, 1983; Celico et alii, 2000). La falda defluisce da nord verso sud, trovando recapito in corrispondenza di diverse scaturigini (Fig. 1). La sorgente stagionale "1" (1182 metri s.l.m.) ha una portata media annua di circa 0,010 m³/s ed è alimentata dalle acque di infiltrazione diffusa attraverso il suolo ed il mezzo fratturato. La sorgente perenne "2" (1168 metri s.l.m.) ha una portata media annua di circa 0,025 m³/s ed è alimentata dalle acque di infiltrazione diffusa e da quelle di infiltrazione concentrata. Queste ultime (0,010 m³/s), previo ruscellamento in una ristretta area endoreica, si infiltrano in una dolina collocata a circa 250 metri dalla sorgente, a 1179 metri s.l.m. La sorgente perenne "3" (1151 metri s.l.m.) ha una portata media annua di circa 0,040 m³/s. I coefficienti di esaurimento delle sorgenti in esame oscillano da 1,20×10⁻¹ g⁻¹ a 3,40×10⁻² g⁻¹ (Fig. 2).

La temperatura delle acque sorgive oscilla da 6,7°C a 8,0°C, con un valore medio di 7,2°C, con i minimi nel corso dell'inverno ed i massimi nel corso dell'estate.

Nel corso della ricerca il manto nevoso non è mai restato al suolo più di qualche giorno ed in modo discontinuo nell'ambito dell'area adibita a pascolo. Ciò perché generalmente le precipitazioni nevose sono state alternate a quelle piovose.

La principale fonte di inquinamento è rappresentata dal pascolo (circa 300 capi di bestiame), prevalentemente sviluppato, da maggio ad ottobre, in una piccola piana intramontana collocata tra le sorgenti "1" e "2" (Fig. 1).

Materiali e Metodi

Monitoraggio Meteorologico e Idrogeologico

Le precipitazioni e la temperatura dell'aria sono state monitorate con cadenza oraria mediante una stazione meteorologica (MTX WST 1420, Italia). La portata delle sorgenti è stata misurata con cadenza giornaliera o settimanale, mediante mulinello idraulico (SIAP ME 4001, Italia). I livelli di falda sono stati monitorati con cadenza oraria, mediante trasduttore di pressione (STS ATM/N, Svizzera) o con cadenza giornaliera o settimanale, mediante freatimetro (Solinst 101, Canada).

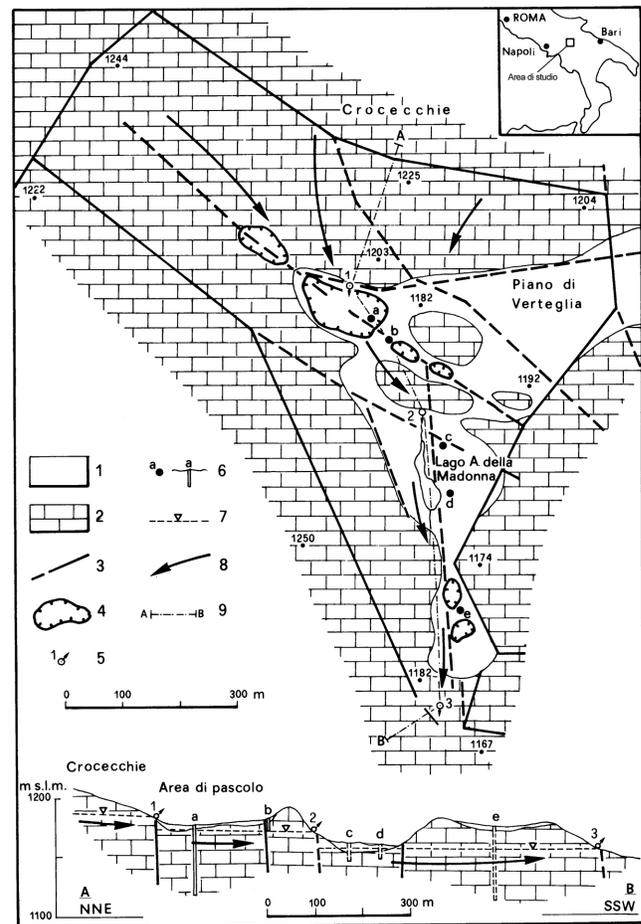


Figura 1 – Schema di circolazione idrica sotterranea (1: depositi piroclastici; 2: rocce carbonatiche; 3: faglia (tratteggiata se presunta o sepolta); 4: dolina; 5: sorgente e relativo numero di riferimento; 6: piezometro e relativa lettera di riferimento; 7: livello piezometrico; 8: direzione di flusso della falda; 9: traccia di sezione).

Groundwater flow scheme (1: pyroclastic deposits; 2: carbonate rocks; 3: fault; 4: doline; 5: spring and its number; 6: piezometer and its letter; 7: groundwater level; 8: groundwater flow direction; 9: line of hydrogeological section).

Monitoraggio Microbiologico e del pH delle acque

I campioni d'acqua sorgiva sono stati prelevati presso la

sorgente “2” da settembre 2001 ad aprile 2002, con cadenza giornaliera o settimanale, in bottiglie sterili da 1000 ml. I campioni sono stati trasportati in laboratorio in box refrigerati, dove le attività di filtrazione per le analisi microbiologiche hanno avuto inizio entro 5 ore dal prelievo. Gli indicatori di contaminazione microbica sono stati determinati attraverso la classica tecnica della filtrazione d’acqua (1000 ml e 100 ml) su membrana sterile (GN-6 Metrcel, dimensione dei pori 0.45 μm , Pall), con incubazione su: (a) m-FC Agar per 24 h a 44°C, per i coliformi fecali e (b) Slanetz-Bartley Agar per 4 h a 35°C e 44 h a 44°C, per gli enterococchi fecali. La temperatura dell’acqua ed il pH sono stati misurati, con cadenza giornaliera o settimanale, mediante un WTW Multi 340i (Germania).

Speciazione degli enterococchi isolati dalle acque sorgive e amplificazione dei geni rRNA

La classificazione tassonomica degli enterococchi fecali identificati nelle acque sorgive è stata realizzata attraverso le API 20 Strep fermentation strips (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia) e attraverso il sequenziamento del gene codificante l’RNA ribosomiale 16S amplificato tramite PCR ed oligonucleotidi universali: P1 (5'-GCGGCGTGCCTAATACATGC) e P2 (5'-CACCTTCCGATACGCTACC).

Risultati

Monitoraggio in campo

Il pascolo di bestiame ha generato un discontinuo inquinamento microbiologico delle acque sorgive nel corso dell’intero periodo di ricerca. Ciascun picco di contaminazione microbica è stato identificato in seguito a precipitazioni che hanno generato una significativa

infiltrazione efficace, in accordo con quanto accertato da altri autori in simili acquiferi dell’Italia meridionale (Celico et alii, 2004a; Celico et alii, 2004b). Tuttavia, un’apparente discrepanza è stata osservata in inverno, tra i dati meteorologici, idrogeologici e microbiologici, in quanto, a dispetto del fenomeno di ricarica accertato (Fig. 2), non è stata determinata nessuna contaminazione microbica delle acque sorgive.

Nell’arco di poche settimane dall’inizio del periodo caratterizzato da cicli gelo/disgelo, il primo evento di infiltrazione efficace genera inquinamento microbiologico della falda, individuabile attraverso il rinvenimento, sia dei coliformi fecali, sia degli enterococchi fecali (Figg. 2 e 3). A partire da tale episodio, i coliformi fecali non vengono più individuati nelle acque sorgive (in 1000 ml), quanto meno fino alla primavera inoltrata, mentre gli enterococchi fecali vengono talvolta determinati (Fig. 3).

Più in dettaglio, nel corso dell’inverno 2001-2002 sono state registrate due fasi caratterizzate da diversi regimi termici. In una prima fase, compresa tra dicembre 2001 e gli inizi di febbraio 2002, le temperature sono rimaste mediamente sempre sotto 0 °C e sono stati, altresì, registrati ripetuti cicli gelo/disgelo (circa il 45% delle giornate totali). In tale fase non sono stati rilevati enterococchi fecali nelle acque sotterranee. Nella seconda fase, compresa tra la fine di febbraio e l’inizio di aprile 2002, gli episodi caratterizzati da temperature inferiori allo 0 °C e da cicli gelo/disgelo sono stati in numero inferiore al 23% delle giornate complessive; ciò ha comportato una ricomparsa nelle acque sorgive dei soli enterococchi fecali, allorché è stato registrato il primo significativo fenomeno di ricarica della falda (Figg. 2 e 3).

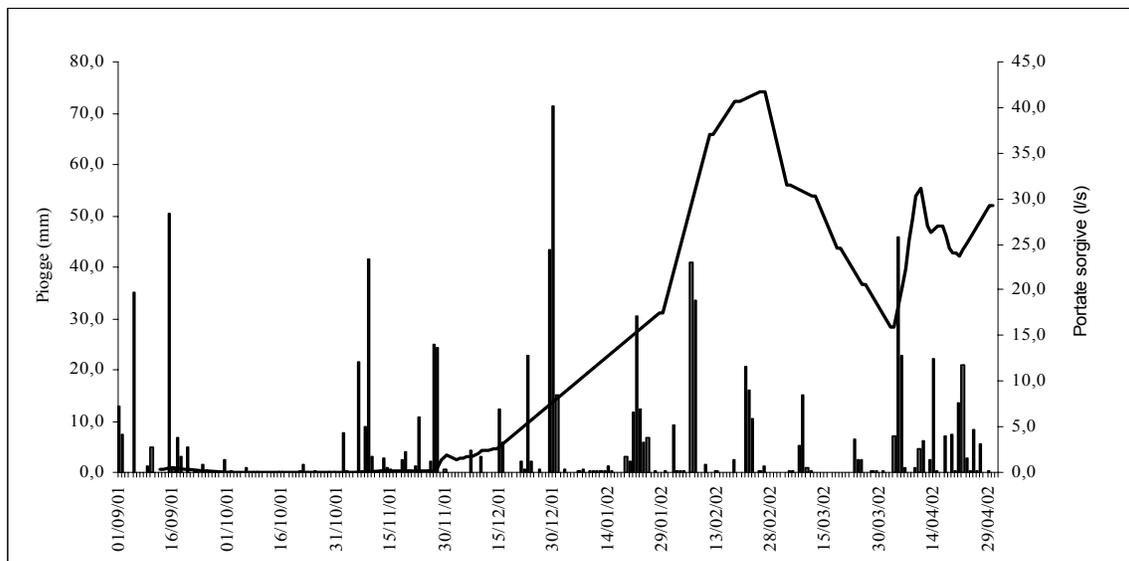


Figura 2 – Idrogramma di portata della sorgente “2” (linea intera) e precipitazioni (barre).
Discharge of spring “2” (line) and precipitations (bars).

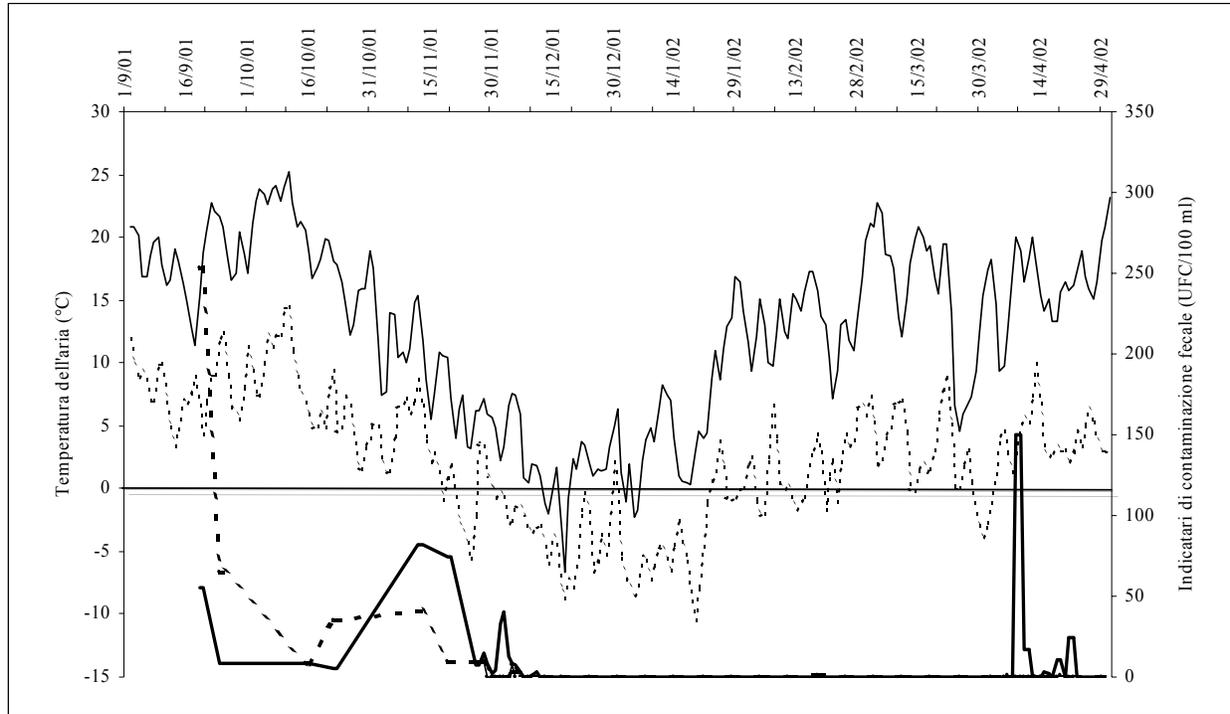


Figura 3 – Temperatura giornaliera dell'aria, massima (linea intera sottile) e minima (linea tratteggiata sottile), e concentrazione di enterococchi fecali (linea intera doppia) e coliformi fecali (linea tratteggiata doppia) nelle acque della sorgente "2".

Air daily temperature, maximum (thin line) and minimum (dashed thin line), and concentration of fecal enterococci (thick line) and fecal coliforms (dashed thick line) in waters of spring "2".

Tenendo conto che la temperatura dell'aria è rimasta quasi sempre al di sotto di $-1,5^{\circ}\text{C}$ nel corso della su citata fase di gelo e visti i caratteri di interdipendenza esistenti tra temperatura dell'aria e temperatura del suolo, l'uso della prima anziché della seconda consente una buona analisi del fenomeno in esame.

Infatti, uno studio condotto per cinque anni da Costantini et alii (2001) in diversi siti italiani ha mostrato che la temperatura nel suolo è, in media, circa 1°C più alta di quella dell'aria, in accordo con quanto riportato nel Soil Taxonomy method (Soil Survey Staff 1975). Ciò significa che le condizioni di gelo ed i cicli gelo – disgelo hanno ragionevolmente coinvolto il suolo ogni qualvolta la temperatura dell'aria è scesa significativamente al di sotto di 0°C .

Identificazione delle specie microbiche

L'identificazione delle specie, nell'ambito degli enterococchi fecali, è stata realizzata al fine di verificare l'esistenza o meno di *Enterococcus faecalis* nelle acque sorgive contaminate. Ciò in quanto esperimenti di laboratorio hanno accertato l'influenza negativa dei cicli gelo/disgelo su tale specie, con incidenza letale che aumenta all'aumentare della frequenza dei cicli stessi (Kibbey et alii, 1978).

Le colonie batteriche (ceppi) ottenute con la filtrazione su membrana delle acque sorgive sono state innanzitutto

caratterizzate con il sistema API 20 Strep. Da tali determinazioni è risultato che, nell'ambito dei 100 ceppi isolati, 38 sono appartenenti al genere *E. faecalis*, 30 al genere *E. faecium*, 23 al genere *E. gallinarum* e 9 non sono stati identificati.

In seguito, 10 ceppi di ciascun gruppo di Enterococchi sono stati identificati facendo ricorso al sequenziamento di 500 basi dei geni codificanti per l'RNA ribosomiale 16S e confrontando le sequenze ottenute con quelle presenti in banche dati (Altschul et alii, 1990; Green et alii, 1999; Hoa et alii, 2000). I risultati ottenuti dalla ricerca di omologia in database hanno mostrato un ottimo accordo (90%) con i dati ottenuti con le gallerie API. Questi risultati hanno indicato che *E. faecalis* è la specie batterica maggiormente presente nei campioni d'acqua contaminati.

Discussione e Conclusioni

Le precipitazioni che generano infiltrazione efficace sono in grado di produrre l'inquinamento microbiologico della falda, a meno che le temperature del suolo non scendano significativamente al di sotto di 0°C . Tuttavia, l'effetto delle basse temperature è differente per coliformi fecali ed enterococchi fecali.

I coliformi fecali mostrano un decremento della popolazione di almeno 3 ordini di grandezza, in modo tale da non identificare nessuno di questi indicatori nei campioni

d'acqua sorgiva prelevati nel corso di episodi di infiltrazione efficace avvenuti dall'inizio del gelo.

Gli enterococchi fecali mostrano una minore decrescita della popolazione ed una temporanea inibizione ai medesimi stress termici. Tali indicatori non sono stati identificati nelle acque sorgive solo in occasione del frequente alternarsi di cicli gelo/disgelo (più del 45% dei giorni totali del periodo di riferimento). L'effetto inibitore è in accordo col fatto che tali indicatori, a differenza dei coliformi fecali, sono stati individuati in periodo primaverile. La presenza di tali enterococchi è indubbiamente da ricondurre all'attività di pascolo dell'anno precedente (maggio-ottobre 2001); infatti, il set di specie di enterococchi non risulta variato prima, durante e dopo la fase invernale.

Altri fattori, come il rapporto tra coliformi fecali ed enterococchi fecali nelle feci animali e le differenti modalità di migrazione nel sottosuolo dei due indicatori non possono influenzare quanto osservato e descritto in precedenza. Tali

fattori, infatti, restano sostanzialmente invariati nel corso dell'intero periodo di monitoraggio.

Tenendo conto del fatto che quanto descritto in questa sede è stato sistematicamente verificato anche negli anni successivi (dati non mostrati), è possibile affermare che gli enterococchi fecali rappresentano un indicatore di contaminazione microbica delle acque sotterranee migliore dei coliformi fecali, quanto meno in massicci carbonatici in cui il periodo invernale è caratterizzato da gelo e/o cicli gelo/disgelo. Resta in ogni caso il problema della loro inibizione in occasione di una elevata frequenza dei cicli suddetti, che non ne consente la determinazione attraverso la classica tecnica delle membrane filtranti.

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata dall'Unione Europea (KATER and KATER II Research Programs).

Bibliografia

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Becker, M.W., Metge, D.W., Collins, S.A., Shapiro, A.M., Harvey, R.W., 2003. Bacterial transport experiments in fractured crystalline bedrocks. *Ground Water* 41: 682-689.
- Bonardi G., D'Argenio B., Perrone V., 1988. Carta geologica dell'Appennino Meridionale (1:250.000). *Atti Congr. Soc. Geol. d'It.* Sorrento, 13-17 settembre 1998. *Mem. Soc. Geol. It.*, 41, Roma.
- Celico, F., Celico, P., De Vita, P., Piscopo, V., 2000. Groundwater flow and protection in the Southern Apennines (Italy). *Hydrogeology* 4: 39-47.
- Celico, F., Varcamonti, M., Guida, M., Naclerio, G., 2004a. Influence of precipitation and soil on transport of fecal enterococci in limestone aquifers. *Appl Environ Microb* 70: 2843-2847.
- Celico, F., Musilli, I., Naclerio, G., 2004b. The impact of pasture and manure spreading on microbial groundwater quality in carbonate aquifers. *Environ Geol*, 46(2): 233-236.
- Celico P., 1983. Idrogeologia dei massicci carbonatici, delle piane quaternarie e delle aree vulcaniche dell'Italia centro-meridionale (Marche e Lazio meridionale, Abruzzo, Molise e Campania). *Quaderni CASMEZ*, 4/2, Roma.
- Civita M., 1967. Alcune osservazioni preliminari sulla tettonica del Massiccio del Terminio-Tuoro (Irpinia). *Boll. Soc. Nat. in Napoli*, 75, Napoli.
- Civita, M., 1969. Idrogeologia del Massiccio del Terminio-Tuoro (Campania). *Mem. e Note Ist. Geol. Appl.*, 11, 1-92.
- Costantini, E.A.C., Castelli, F., Iori, M., Magini, S., Lorenzoni, P., Raimondi, S., 2001. Regime termico del suolo in alcuni campi sperimentali del Nord, Centro e Sud Italia. *Proc. Convegno SISS "La scienza del suolo in Italia: bilancio di fine secolo"*, Gressoney-Saint Jean, Italy, 22-25 June 1999: 125-132.
- Di Gennaro, A., Aronne, G., De Mascellis, R., Vingiani, S., 2002. I sistemi di terre della Campania (1: 250.000) SELCA ed., Firenze.
- Gleeson, C., Gray, N., 1997. *The Coliform index and waterborne disease*. E and FN Spon, London.
- Hoa, N.T., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, P.H., Ammendola, S., Ricca, E., Cutting, S.M. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacterio-therapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.* 12, 5241-5247.
- Hoa, N.T., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, P.H., Ammendola, S., Ricca, E., Cutting, S.M. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacterio-therapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.* 12, 5241-5247.
- Kibbey, H.J., Hagedorn, C., McCoy, E.L., 1978. Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. *Appl Environ Microb* 35: 711-717.
- Soil Survey Staff, 1975. *Soil Taxonomy: A basic system for making and interpreting soil surveys*. USDA Handbook, 436, pp. 754, Washington DC.