



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Il principio di rischio associato all'utilizzo dell'acqua destinata
al consumo umano.

Evoluzione legislativa a livello europeo e italiano

Relatore:

Prof. Fiorenzo Pastoni

Correlatore:

Dott.ssa Maura Negro Fenoglietto

Tesi Sperimentale di
Alessia Cuccarolo

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il problema acqua	1
1.2 Importanza sanitaria	2
1.3 Quadro normativo dell'acqua destinata al consumo umano	3
1.3.1 Evoluzione Legislativa.....	4
1.3.2 Decreto Legislativo n. 18 del 23 febbraio 2023	4
1.4 Parametri microbiologici per il controllo delle acque destinate al consumo umano	7
1.4.1 Parametri microbiologici previsti dal D. Lgs. 18/2023	8
1.4.2 Microrganismi di interesse sanitario	13
1.5 Criteri analitici.....	16
1.6 Accreditamento dei laboratori e requisiti della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 .	19
2. SCOPO DEL LAVORO	23
3. MATERIALI E METODI.....	25
3.1 Campionamento, trasporto e conservazione.....	25
3.2 Tecniche analitiche.....	26
3.2.1 Tecnica della filtrazione su membrana.....	27
3.2.2 Tecnica dell'inclusione in agar	28
3.3 Ricerca ed enumerazione dei parametri microbiologici.....	29
3.3.1 Batteri coliformi ed <i>Escherichia coli</i>	29
3.3.2 Enterococchi intestinali	32
3.3.3 Conteggio delle colonie a 22°C.....	34
3.3.4 <i>Clostridium perfringens</i>	35
3.3.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3.3.6 Stafilococchi patogeni	43
3.3.7 <i>Salmonella</i> spp.	46

3.4	Controllo di qualità dei terreni colturali	51
3.5	Espressione dei risultati ed emissione del rapporto di prova	51
3.6	Analisi statistica dei dati	53
3.6.1	Statistica descrittiva.....	53
3.6.2	Test statistici.....	54
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	56
4.1	Valutazione delle non conformità	56
4.2	Valutazione dell'andamento stagionale delle non conformità	63
4.3	Valutazione dell'andamento stagionale delle segnalazioni per la conta delle colonie a 22°C	69
4.4	Confronto primo semestre 2025 e primo semestre 2026.....	72
5.	CONCLUSIONI	77
6.	BIBLIOGRAFIA.....	80

1. INTRODUZIONE

1.1 Il problema acqua

L'acqua rappresenta una risorsa fondamentale per la sopravvivenza dell'uomo e per numerose attività antropiche, tra cui l'uso domestico, le attività ricreative, la produzione alimentare e le attività industriali. (World Health Organization, 2022)

Tuttavia la disponibilità di acqua sicura è influenzata da criticità crescenti legate alla gestione delle risorse idriche e alle perdite infrastrutturali, fenomeno che ha progressivamente portato a configurare un vero e proprio “problema acqua”.

Nel Report annuale pubblicato da ISTAT il 22 marzo 2021 in occasione della Giornata mondiale dell'acqua, le perdite idriche nelle reti di distribuzione risultavano pari al 42% corrispondenti ad un volume di 3,4 miliardi di metri cubi. (Istituto Nazionale di Statistica, 2021)

Tale condizione risulta sostanzialmente stabile, con un lieve incremento nei dati più recenti pubblicati da ISTAT il 20 marzo 2026, nei quali le perdite idriche vengono stimate al 42,4%. Nonostante l'elevata estensione del servizio idrico nazionale, che raggiunge 7.891 comuni su 7.904 e un volume di prelievo di 8,87 miliardi di metri cubi, una quota significativa dell'acqua immessa nella rete non raggiunge l'utenza finale a causa delle criticità strutturali del sistema.

Il medesimo Report evidenzia inoltre che l'84,8% del prelievo di acqua destinato al consumo umano proviene da fonti sotterranee, quali pozzi e sorgenti, e il 15,1% da acque superficiali, quali corsi d'acqua, laghi e bacini artificiali. Inoltre, per sopperire alle carenze idriche, una piccola percentuale pari a 9,2 milioni di metri cubi deriva da acque marine, utilizzate principalmente in Sicilia e nelle isole minori. (Istituto Nazionale di Statistica, 2026)

Accanto alle criticità infrastrutturali, altri coinvolgimenti interessano la qualità dell'acqua, e risultano conseguenti ad “effetti antropici”: tra questi consistente risalto sta conoscendo la compromissione dovuta alla presenza di micro e nanoplastiche, frammenti di polimeri plastici di dimensioni micrometriche e nanometriche. Tali frammenti si accumulano nel suolo e possono infiltrarsi nelle acque sotterranee, dove sono in grado di persistere. (Balestra et al., 2026)

Rappresentano quindi una minaccia crescente sia per l'ambiente in senso lato sia per la salute umana, in quanto possono essere ingerite da organismi acquatici e terrestri, entrando progressivamente nella catena alimentare fino ad arrivare all'uomo. (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2025)

1.2 Importanza sanitaria

Il consumo di acqua contaminata e l'accesso a servizi igienico-sanitari inadeguati possono esporre la popolazione a rischi per la salute e alla trasmissione di malattie. Dal 2010 l'Assemblea Generale delle Nazioni Unite ha riconosciuto l'accesso all'acqua potabile sicura e ai servizi igienico-sanitario come un diritto umano fondamentale, evidenziando il ruolo essenziale dell'acqua nella tutela della salute e del benessere della popolazione. (World Health Organization, 2023)

L'inquinamento delle acque può essere determinato dalla presenza di contaminanti sia chimici sia biologici, ai quali la popolazione può essere esposta non soltanto attraverso il consumo diretto di acqua, ma anche tramite ambienti comunitari quali strutture ricettive e sanitarie. Tale esposizione può essere associata ad un incremento della morbilità e, in alcuni casi, della mortalità, e può essere efficacemente contrastata solo garantendo la disponibilità di acqua sicura dal punto di vista microbiologico e chimico. (Magana-Arachchi & Wanigatunge, 2020)

La contaminazione dell'acqua potabile da parte di microrganismi potenzialmente patogeni rappresenta una problematica di rilevanza sanitaria significativa, come evidenziato dalla correlazione tra consumo di acqua non sicura e l'insorgenza di forme a localizzazione intestinale e altre infezioni a trasmissione idrica.

Studi recenti hanno evidenziato come le epidemie enteriche associate a condizioni igienico-sanitarie inadeguate e contaminazioni ambientali costituiscano infatti una minaccia persistente a livello globale. In particolare, l'impatto sanitario risulta più elevato nei Paesi a basso reddito, dove le malattie diarroiche di origine idrica rappresentano una delle principali cause di mortalità infantile. Secondo stime recenti, si registrano circa 444.000 decessi annui nei bambini sotto i cinque anni, pari a circa il 9% della mortalità infantile globale, con maggiore concentrazione dei casi in Asia meridionale e Africa subsahariana. Nei paesi ad alto reddito, invece, la presenza di sistemi avanzati di trattamento e monitoraggio delle acque consente di ridurre significativamente l'incidenza di tali patologie. (Gaur et al., 2026)

La sicurezza dell'acqua destinata al consumo umano si basa sull'applicazione di quadri di riferimento finalizzati alla tutela della salute pubblica, che includono l'adeguatezza delle infrastrutture e un sistema adeguato di sorveglianza. In questo contesto, il monitoraggio riveste una duplice funzione: normativa, per verificare la conformità ai requisiti di legge, e operativa, per valutare le prestazioni del sistema e individuare eventuali variazioni o criticità. (Taylor et al., 2018)

La necessità di garantire un elevato livello di protezione della salute umana ha quindi portato allo sviluppo di specifici strumenti normativi volti a disciplinare la qualità delle acque destinate al consumo umano e le relative attività di controllo, che trovano attuazione nei principali riferimenti legislativi europei e nazionali. (Sun et al., 2025)

1.3 Quadro normativo dell'acqua destinata al consumo umano

L'acqua destinata al consumo umano viene definita come “tutte le acque trattate o non trattate, destinate a uso potabile, per la preparazione di cibi, bevande o altri usi domestici, in locali sia pubblici che privati, a prescindere dalla loro origine siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne o in bottiglie o contenitori, comprese le acque di sorgente”. Sono inoltre comprese le acque utilizzate in un'impresa alimentare e incorporate negli alimenti, ma non le acque minerali naturali per le quali vale una diversa impostazione legislativa in relazione a principi giuridici divergenti. (D. Lgs 18/2023, 2023) (D. Lgs. 176/2011, 2011)

A livello normativo, l'acqua destinata al consumo umano è considerata secondo un duplice inquadramento, in quanto la stessa legislazione vigente la configura in termini sia di alimento che di matrice ambientale.

In particolare, nell'ambito del Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio, l'acqua è inclusa nella definizione di alimento. Tale regolamento ha stabilito i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, ha istituito l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e ha definito le procedure in materia di sicurezza degli alimenti. L'acqua è quindi considerata un alimento di primaria importanza, in quanto “viene ingerita come ogni altro alimento, direttamente o indirettamente, contribuendo così al rischio complessivo al quale si espongono i consumatori attraverso l'ingestione di sostanze, tra cui contaminanti chimici e microbiologici”. (Regolamento (CE) n. 178/2002, 2002)

Parallelamente, il Decreto Legislativo n. 152/2006, recante “Norme in materia ambientale”, disciplina la tutela delle acque dall'inquinamento nella Parte Terza, Sezione II, riconoscendo l'acqua anche come matrice ambientale soggetta a protezione e gestione ai fini della prevenzione dall'inquinamento. (D. Lgs. 152/2006, 2006)

1.3.1 Evoluzione Legislativa

Il quadro normativo relativo alla qualità delle acque destinate al consumo umano si è evoluto nel tempo, con l'obiettivo di rafforzare la tutela della salute pubblica.

Fino al marzo 2023 era in vigore la Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano, recepita in Italia con il Decreto Legislativo del 2 febbraio 2001 n. 31. (D. Lgs. 31/2001, 2001)

In tempi recenti, tale normativa è stata sostituita dalla Direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2020, che evidenzia il concetto di “rischio associato al consumo dell'acqua”, introducendo un approccio innovativo sulla valutazione e gestione del rischio lungo l'intera filiera idropotabile. L'attuazione di tale direttiva nel nostro paese è avvenuta mediante il Decreto Legislativo 23 febbraio n. 18, successivamente integrato dal Decreto Legislativo n. 102 del 19 giugno 2025.

1.3.2 Decreto Legislativo n. 18 del 23 febbraio 2023

L'obiettivo del decreto riguarda la qualità delle acque destinate al consumo umano, con la finalità di proteggere la salute umana dagli effetti negativi che possono derivare dalla contaminazione e garantire la salubrità e la pulizia, oltre alla disponibilità delle medesime. Non devono quindi contenere microrganismi, virus, parassiti e altre sostanze a concentrazioni elevate e devono essere conformi ai valori stabiliti dalla normativa vigente.

Uno degli aspetti maggiormente innovativi del Decreto Legislativo 18/2023 riguarda l'applicazione di un approccio alla gestione della sicurezza dell'acqua destinata al consumo umano basata sulla valutazione del rischio. Si implementa infatti un controllo olistico orientato alla valutazione complessiva del problema all'interno dell'intera filiera idropotabile, dal prelievo alla distribuzione, fino ai punti di consegna e di utenza. Tale approccio si basa sul principio delle “barriere multiple”, secondo cui, qualora una misura di controllo risulti inefficace, le restanti misure presenti lungo la filiera sono in grado di garantire la sicurezza dell'acqua per gli utenti. (Biasibetti et al., 2023)

Questo modello di gestione prende il nome di “Piano di sicurezza dell'acqua” (PSA) ed è applicabile a qualsiasi sistema di distribuzione idrica, indipendentemente dalle sue dimensioni, con l'obiettivo di garantire la qualità e la sicurezza dell'acqua distribuita. (World Health Organization, 2009)

I PSA hanno pertanto lo scopo di assicurare l'assenza di agenti patogeni, che le concentrazioni di sostanze chimiche non rappresentino un rischio significativo per la salute umana e che l'acqua risulti accettabile per i consumatori. (Istituto Superiore di Sanità, 2022)

Al fine di valutare e garantire nel tempo la qualità dell'acqua destinata al consumo umano, il Decreto Legislativo 18/2023 prevede l'attuazione di specifici programmi di controllo finalizzati a verificare la conformità dell'acqua agli obblighi normativi. Tali programmi si articolano in due livelli di monitoraggio distinti ma integrati tra loro: i controlli interni e i controlli esterni.

I controlli interni sono effettuati dal gestore del servizio idrico, la cui responsabilità della qualità dell'acqua si estende fino al punto di consegna. Il decreto introduce infatti una distinzione più precisa delle responsabilità lungo la filiera idropotabile: il gestore è responsabile della qualità dell'acqua fino al punto in cui la condotta di allacciamento idrico si collega all'impianto di utenza finale, generalmente identificato con il contatore. Tali verifiche hanno quindi lo scopo di valutare la conformità dell'acqua distribuita, consentendo l'individuazione tempestiva di eventuali non conformità o situazioni di rischio. Successivamente al punto di consegna, la responsabilità della qualità dell'acqua ricade sul soggetto responsabile della struttura abitativa, in quanto la rete domestica può influenzare in modo significativo le caratteristiche dell'acqua fino al punto di utenza finale che può comportare un effettivo rischio per il consumatore.

I controlli esterni sono, invece, attività di vigilanza ufficiale effettuati dalle Aziende Sanitarie Locali (ASL) territorialmente competenti. Si tratta di controlli organizzati tramite programmi di monitoraggio definiti a livello regionale e delle province autonome. Le analisi dei campioni prelevati nell'ambito dei controlli esterni sono generalmente affidate alle Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA), enti tecnici di supporto alle autorità sanitarie. (D. Lgs 18/2023, 2023)

A livello tecnico, il Decreto definisce i parametri da sottoporre a monitoraggio e le relative modalità di controllo attraverso gli Allegati I, II e III.

In particolare, l'Allegato I stabilisce i requisiti minimi relativi ai parametri utilizzati per valutare la qualità delle acque destinate al consumo umano ed è suddiviso in parte A, B, C e D.

La parte A riporta i parametri microbiologici per i quali è richiesta l'assenza assoluta, in quanto principali indicatori di contaminazione fecale la cui valutazione costituisce pertanto un elemento fondamentale per la tutela della salute del consumatore.

Tabella 1: Parametri microbiologici (Allegato I, parte A)

Parametro	Valore di parametro	Unità di misura
Enterococchi intestinali	0	Numero/100 mL
<i>Escherichia coli</i>	0	Numero/100 mL

La parte B è dedicata ai parametri chimici in cui, rispetto al precedente Decreto Legislativo 31/2001, sono stati introdotti contaminanti emergenti come i PFAS (sostanze perfluoroalchiliche) e sono stati aggiornati alcuni valori di parametro, come la riduzione del limite per il piombo.

La parte C, divisa in C1 e C2, comprende i parametri indicatori per cui è previsto un monitoraggio finalizzato a verificare se l'eventuale superamento dei valori stabiliti possa rappresentare un rischio per la salute umana.

Tabella 2: Parametri indicatori (Allegato I, parte C1)

Parametro	Valore di parametro	Unità di misura
<i>Clostridium perfringens</i> (spore comprese)	0	Numero/100 mL
Conteggio delle colonie a 22°C	Senza variazioni anomale	-
Batteri coliformi	0	Numero/100 mL

Per il parametro di *Clostridium perfringens* l'analisi è richiesta solo qualora sia ritenuta appropriata sulla base della valutazione del rischio.

La parte D riporta parametri pertinenti alla valutazione e alla gestione del rischio associato ai sistemi di distribuzione interni. Tale sezione rappresenta uno degli aspetti innovativi del Decreto Legislativo 18/2023, in quanto introduce il parametro *Legionella*, per il quale è stabilito un valore di parametro pari a 1000 UFC/L, il cui superamento richiede l'adozione di adeguate misure correttive finalizzate al controllo della contaminazione. L'eventuale presenza del

microrganismo presso il punto di utenza può infatti costituire un serio rischio per la salute del consumatore. Anche per concentrazioni inferiori, quindi, possono essere necessari o opportuni interventi di prevenzione e controllo in presenza di focolai o qualora siano esposti soggetti particolarmente vulnerabili.

L'Allegato II definisce i programmi di monitoraggio delle acque destinate al consumo umano, stabilendo le modalità di controllo, i parametri da ricercare e le frequenze di campionamento. Tali controlli consentono di valutare nel tempo la qualità microbiologica e chimica dell'acqua distribuita, e l'efficacia degli eventuali trattamenti adottati.

Tra i parametri sottoposti a controlli di routine rientrano quelli riportati nella parte A dell'Allegato I, ma il monitoraggio comprende inoltre i parametri indicatori microbiologici, quali Batteri coliformi e conteggio delle colonie a 22°C, oltre ad eventuali ulteriori parametri individuati come rilevanti in seguito alla valutazione del rischio. La frequenza di campionamento può essere modificata sulla base dei risultati della valutazione del rischio, ad eccezione dei parametri microbiologici della Parte A dell'Allegato I che devono essere monitorati secondo le frequenze minime stabilite dal Decreto.

L'Allegato III definisce infine le specifiche tecniche per l'analisi dei parametri, indicando per ognuno di essi i relativi metodi di riferimento. Viene riportata anche la possibilità di utilizzare metodi alternativi a quelli tradizionali, su base colturale, che risultino essere equivalenti, al fine di garantire l'affidabilità e la conformità dei risultati analitici. È inoltre previsto che i laboratori che eseguono analisi di monitoraggio della qualità delle acque destinate al consumo umano operino in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, a conferma del criterio precedentemente introdotto dal Decreto Ministeriale 14 giugno 2017. (D. Lgs 18/2023, 2023) (D.M. 14 Giugno 2017, 2017)

1.4 Parametri microbiologici per il controllo delle acque destinate al consumo umano

La valutazione della qualità microbiologica delle acque destinate al consumo umano si basa principalmente sulla ricerca di specifici microrganismi indicatori di contaminazione. Tali microrganismi non sono tipicamente patogeni, ma la loro presenza può indicare una possibile contaminazione dell'acqua e, di conseguenza, un possibile rischio di presenza di agenti patogeni enterici.

Per essere considerato un indicatore affidabile, un microrganismo deve possedere alcune caratteristiche fondamentali:

- essere normalmente presente nell'intestino dell'uomo e nelle feci in concentrazione elevate;
- essere facilmente rilevabile mediante metodi analitici standardizzati;
- non essere patogeno per l'uomo;
- presentare una capacità di sopravvivenza nell'ambiente anche in condizioni sfavorevoli.

La presenza di microrganismi patogeni nelle acque è spesso accompagnata dalla presenza di microrganismi considerati indicatori, che risultano più facilmente rilevabili mediante comuni metodiche analitiche. Per questo motivo, la ricerca degli indicatori consente di valutare indirettamente la qualità microbiologica dell'acqua e di verificare l'eventuale presenza di contaminazione fecale. (Cabral, 2010)

1.4.1 Parametri microbiologici previsti dal D. Lgs. 18/2023

Batteri coliformi

I batteri coliformi costituiscono un gruppo eterogeneo di batteri che comprende, tra gli altri, i generi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Si tratta di microrganismi a forma di bastoncello, Gram-negativi, non sporigeni, aerobi e anaerobi facoltativi.

La caratteristica principale distintiva dei batteri coliformi è la capacità di fermentare il lattosio con produzione di acido e gas ad una temperatura di 35-37°C. Inoltre, essi possiedono l'enzima β -D-galattosidasi che rappresenta la base dei principali metodi di rilevamento e della loro differenziazione da altri gruppi batterici, insieme all'assenza dell'enzima citocromo c ossidasi che li rende ossidasi negativi.

I coliformi sono ampiamente diffusi nell'ambiente e possono essere rinvenuti nel suolo, nella vegetazione e nelle acque superficiali. Per tale motivo, la loro presenza nelle acque destinate al consumo umano non è necessariamente indicativa di contaminazione fecale ma può riflettere una compromissione della qualità microbiologica dell'acqua o l'inefficienza dei processi di trattamento e distribuzione. (Yang et al., 2024)

Sebbene non siano generalmente associati a patologie gravi, i batteri coliformi vengono utilizzati come indicatori igienico-sanitari della qualità delle acque, in quanto la loro presenza

può suggerire una possibile contaminazione anche da parte di batteri e virus potenzialmente patogeni. (Price & Wildeboer, 2017)

Escherichia coli

Escherichia coli è una specie batterica Gram-negativa appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è inclusa nel gruppo dei coliformi.

Oltre alle caratteristiche tipiche dei batteri coliformi, *E. coli* può essere distinta dagli altri batteri del gruppo grazie alla presenza dell'enzima β -D-glucuronidasi, utilizzato come marcatore sensibile e specifico per la sua identificazione. (Molina et al., 2015)

E. coli è normalmente presente in elevate concentrazioni nell'intestino dell'uomo e degli animali a sangue caldo, dai quali viene eliminata attraverso le feci. Poiché la sua sopravvivenza nell'ambiente esterno è generalmente limitata rispetto ad altri microrganismi enterici, la sua presenza nelle acque destinate al consumo umano è considerata un indicatore affidabile di contaminazione fecale recente. (Price & Wildeboer, 2017)

Sono riconosciuti diversi sierotipi di *E. coli*, distinti sulla base delle diverse combinazioni degli antigeni flagellari (H), somatici (O) e capsulari (K). (Antonelli et al., 2017)

Sebbene la maggior parte dei ceppi faccia parte della normale microflora intestinale dell'uomo, alcuni hanno acquisito fattori di virulenza specifici che li rendono responsabili di patologie enteriche nell'uomo. In base ai meccanismi patogenetici, tali ceppi possono essere classificati in diversi gruppi, come di seguito indicato.

- **Enteroemorragici (EHEC):** sono i ceppi maggiormente responsabili di malattia nei Paesi industrializzati. Tali ceppi producono tossine Shiga e possono causare manifestazioni cliniche di gravità variabile, da diarrea lieve a colite emorragica e sindrome emolitico-uretica.
Tra questi, il sierotipo O157:H7 è associato a numerosi focolai epidemici trasmessi da acqua e alimenti contaminati. (Hunter, 2003)
- **Enterotossigeni (ETEC):** responsabili di infezioni diarroiche soprattutto in Paesi a basso reddito. L'infezione si verifica in presenza di un elevato inoculo che può derivare dall'ingestione di alimenti o acqua contaminati da individui infetti. La patogenicità è legata alla produzione di tossine termolabili, in particolare LT-1 è associata a malattie nell'uomo, e tossine termostabili, solo St-a causa malattia nell'uomo.

- **Enteropatogeni (EPEC):** causano prevalentemente diarrea infantile mediante adesione alle cellule intestinali e distruzione dei microvilli.
 - **Enteroinvasivi (EIEC):** presentano caratteristiche fenotipiche e patogenicità simile a quelle del genere *Shigella* e causano una sindrome dissenterica caratterizzata da febbre, crampi addominali e diarrea con possibile presenza di sangue e leucociti nelle feci. La distruzione delle cellule epiteliali del colon con infiammazione può portare ad ulcerazioni.
 - **Enteroaggreganti (EAEC):** causano diarrea acquosa persistente associata a vomito soprattutto in neonati nei Paesi a basso reddito e in soggetti immunocompromessi.
- (Antonelli et al., 2017)

La sopravvivenza di *E. coli* nell'ambiente è influenzata da numerosi fattori, tra cui la temperatura, la disponibilità di acqua e di nutrienti, il pH e l'esposizione alle radiazioni solari, ma anche dalla presenza di altri microrganismi e dalla capacità della specie di acquisire nutrienti e formare biofilm. (Jang et al., 2017)

In virtù della stretta associazione con la contaminazione fecale e della sua rilevanza per la salute pubblica, alla specie *E. coli* viene riconosciuto il significato di principale indicatore microbiologico di contaminazione fecale nelle acque destinate al consumo umano. Per tale motivo, il D. Lgs. 18/2023 ne prescrive l'assenza in 100 mL di campione.

Enterococchi intestinali

Gli Enterococchi sono batteri Gram-positivi, a forma di cocci ovoidali spesso disposti a catenella, non sporigeni e generalmente catalasi-negativi.

In passato erano classificati all'interno del genere *Streptococcus*, in particolare nel gruppo D data la presenza dell'antigene polisaccaridico di Lancefield. Successivamente, sulla base di caratteristiche fenotipiche e genetiche, sono stati riclassificati nel genere *Enterococcus*. (Antonelli et al., 2017)

Gli enterococchi fanno parte del normale microbiota intestinale dell'uomo e degli animali, ma sono anche ampiamente diffusi nell'ambiente a seguito della contaminazione fecale.

Sono microrganismi particolarmente resistenti, in grado di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli, quali variazioni di temperatura, pH e disponibilità di ossigeno. Per

queste caratteristiche sono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale dell'acqua. (Cabral, 2010)

L'impiego degli enterococchi come indicatori igienico-sanitari è giustificato dalla loro costante presenza nelle feci di animali a sangue caldo, dall'incapacità di moltiplicarsi nell'acqua e dalla loro maggiore persistenza nell'ambiente rispetto ai batteri coliformi. (Saxena et al., 2014)

Dal punto di vista sanitario, le specie più rilevanti sono *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*, di cui spicca la elevata capacità di sviluppare resistenze agli antibiotici. Sono infatti frequentemente associate ad infezioni opportunistiche in ambito nosocomiale. (Antonelli et al., 2017)

Pertanto, nelle acque destinate al consumo umano la presenza non è ammessa.

Clostridium perfringens

Il genere *Clostridium* comprende diverse specie di batteri Gram-positivi, a forma di bastoncello, anaerobi e catalasi-negativi. Si tratta di batteri in grado di produrre spore, strutture altamente resistenti che consentono la sopravvivenza in condizioni ambientali sfavorevoli quali carenza di nutrienti, essiccamento e variazioni estreme di temperature e di pH. Le spore sono ampiamente diffuse nel suolo e nelle acque.

Clostridium perfringens è in grado di causare tossinfezioni alimentari in seguito all'ingestione di alimenti contaminati da tossine prodotte da tale specie batterica.

Questa specie è inoltre presente nel microbiota del tratto gastrointestinale distale dell'uomo e degli animali, dove si comporta da commensale. (Cabral, 2010)

Grazie alla sua elevata resistenza sotto forma di spora e alla capacità di persistere a lungo nell'ambiente, *C. perfringens* è utilizzato come indicatore di contaminazioni fecali persistenti o pregresse. Per tale motivo, la sua presenza nelle acque può evidenziare episodi di contaminazioni non rilevabili attraverso altri indicatori fecali. (Li et al., 2025)

Il D. Lgs 18/2023 prevede il monitoraggio di *C. perfringens* solo in specifiche condizioni, sulla base della valutazione del rischio.

Conta batterica a 22°C

La conta batterica a 22°C è un parametro che consente di rilevare un insieme eterogeneo di batteri eterotrofi presenti in numerose matrici, quali acqua, alimenti, suolo, vegetazione e aria. In questo gruppo possono essere inclusi sia microrganismi appartenenti alla normale microflora ambientale sia, occasionalmente, alcune tipologie patogene.

In alcune categorie di acqua, come le acque di piscina e le acque minerali, la conta batterica viene eseguita a due temperature di incubazione, 22°C e 37°C, al fine di evidenziare rispettivamente la componente psicrofila e quella mesofila della popolazione microbica.

Tale parametro non è più considerato un indicatore sanitario, ma rappresenta un indicatore generale della qualità dell'acqua, dell'efficienza dei processi di trattamento e della gestione della rete di distribuzione. (Saxena et al., 2014)

Il D. Lgs. 18/2023 prevede che il valore della conta delle colonie a 22°C non presenti variazioni anomale. Ciò implica che è ammessa la presenza di una flora microbica naturale, tipica dell'acqua analizzata, mentre variazioni significative possono rappresentare un segnale di possibile deterioramento della qualità microbiologica o di contaminazione lungo la rete di distribuzione.

Legionella spp

Il genere *Legionella* fa parte della famiglia *Legionellaceae* e comprende 61 specie e 3 sottospecie. Circa la metà di esse è stata associata a patologie nell'uomo, mentre le restanti sono prevalentemente isolate da matrici ambientali. In particolare, *Legionella pneumophila* rappresenta la specie di maggiore interesse sanitario, essendo responsabile di circa il 90% di casi di legionellosi, in particolare il sierogruppo 1.

I batteri del genere *Legionella* sono bacilli pleomorfi, tipicamente osservabili come coccobacilli, Gram-negativi, aerobi obbligati e asporigeni. (Murray et al., 2021)

I microrganismi riferibili al genere *Legionella* sono presenti negli ambienti acquatici in maniera ubiquitaria, in particolare in acque dolci, quali laghi e fiumi, ma anche in numerosi sistemi idrici artificiali, tra cui torri di raffreddamento dell'aria condizionata, condensatori, reti di distribuzione, docce e vasche per idromassaggio. (LeChevallier et al., 2024)

Negli ambienti acquatici gli stipiti batterici sono in grado di aderire alle superfici formando biofilm e di sopravvivere e replicarsi all'interno di protozoi, che costituiscono un'importante

nicchia ecologica proteggendo i medesimi dalle condizioni sfavorevoli. Tale strategia ne favorisce la persistenza negli impianti idrici, dove la disponibilità di nutrienti essenziali, quali amminoacidi e ferro, è generalmente limitata. (Murray et al., 2021)

La proliferazione di *Legionella* è favorita da temperature comprese tra 25 e 37°C, sebbene il microrganismo possa sopravvivere in un range molto più ampio che può raggiungere i 55°C. La trasmissione all'uomo avviene quindi principalmente attraverso l'inalazione di aerosol contaminati generati da impianti idrici colonizzati. (Mercante & Winchell, 2015)

L. pneumophila, principalmente il sierogruppo 1, è responsabile della forma più grave di legionellosi, nota come malattia del legionario, caratterizzata da una profonda compromissione polmonare e tutt'oggi letale se non rapidamente diagnosticata. La forma meno aggressiva di legionellosi è invece nota come febbre di Pontiac, compare come sindrome simil-influenzale e ha una naturale regressione in tempi brevi.

I soggetti maggiormente a rischio comprendono anziani, soggetti immunocompromessi, fumatori e individui affetti da patologie croniche. (LeChevallier et al., 2024)

Il D. Lgs 18/2023 ha attribuito particolare rilevanza a *Legionella*, introducendo per la prima volta specifiche disposizioni per la valutazione e la gestione del rischio lungo l'intera filiera idropotabile. (D. Lgs 18/2023, 2023)

1.4.2 Microrganismi di interesse sanitario

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa è una specie batterica Gram-negativa non fermentante, con cellule di forma bastoncellare e mobili grazie alla presenza di un flagello. È caratterizzata dalla produzione di diverse molecole pigmentate, tra cui le principali sono la piocianica, di colore blu, e la pioverdina, di colore giallo-verde fluorescente. Più raramente può produrre anche la piorubina, di colore rosso-bruno, e la piomelanina, di colore nero. (Antonelli et al., 2017)

Si tratta di un patogeno opportunisto che colpisce prevalentemente soggetti immunocompromessi, pazienti affetti da fibrosi cistica, broncopneumopatia cronica ostruttiva o gravi ustioni. Può causare infezioni a carico di diversi distretti corporei, tra cui il tratto respiratorio, il sangue, le vie urinarie e le ferite chirurgiche.

P. aeruginosa è inoltre uno dei principali agenti eziologici delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria ed è stato frequentemente isolato nell'ambito ospedaliero, dall'acqua, da soluzioni iniettabili, prodotti farmaceutici, cosmetici e dispositivi medico-chirurgici, comprese le apparecchiature per la ventilazione artificiale e la dialisi. La sua rilevanza clinica è ulteriormente accentuata dall'elevata resistenza agli antibiotici e dalla notevole capacità di adattamento a differenti condizioni ambientali. (LeChevallier et al., 2024)

Questa tipologia batterica è ampiamente distribuita nell'ambiente e può essere isolata da suolo, acque superficiali, reflue e marine, vegetazione e, più in generale, da numerosi ambienti umidi. Grazie alle sue minime esigenze nutrizionali è in grado di sopravvivere e moltiplicarsi negli ambienti acquatici formando biofilm sulle superfici e all'interno delle reti di distribuzione (Diggle & Whiteley, 2020), contribuendo tra l'altro, in modo indiretto, alla persistenza degli stipiti di *Legionella*.

La sua presenza è favorita in condizioni di ristagno idrico e può essere rilevata in serbatoi, rubinetti e apparecchiature domestiche per il trattamento dell'acqua potabile.

Nonostante la sua diffusione negli ambienti acquatici, non sono disponibili evidenze epidemiologiche che correlino la presenza di *P. aeruginosa* nelle acque destinate al consumo umano all'insorgenza di malattie gastroenteriche nella popolazione sana. Per questo motivo il D. Lgs 18/2023 non ne prevede la ricerca nelle acque destinate al consumo umano distribuite attraverso la rete idrica. La sua ricerca è prevista in altre matrici acquatiche, come le acque di piscina, nelle quali può essere associata ad infezioni cutanee, otiti e infezioni oculari. (Istituto Superiore di Sanità, 2007)

Stafilococchi patogeni

Al genere *Staphylococcus* appartengono cocchi Gram-positivi generalmente disposti in aggregati irregolari definiti "a grappolo" e catalasi-positivi. Quest'ultima caratteristica consente di distinguerli da altri cocchi Gram-positivi di interesse clinico, quali streptococchi ed enterococchi.

Il genere comprende numerose specie e sottospecie, alcune delle quali costituiscono la normale flora della cute e delle mucose dell'uomo e degli animali a sangue caldo, mentre altre sono importanti patogeni opportunisti. Gli stafilococchi sono inoltre ampiamente diffusi nell'ambiente e possono essere isolati da suolo, sabbia, polvere, aria e acqua, nonché da numerosi alimenti di origine animale, quali latte, carne e formaggi. (Murray et al., 2021)

Questi microrganismi possiedono una notevole capacità di adattamento e sono in grado di svilupparsi in condizioni ambientali molto variabili, sia in aerobiosi sia in anaerobiosi, in presenza di elevate concentrazioni di cloruro di sodio e in un ampio intervallo di temperatura. Grazie a tali caratteristiche, possono persistere negli ambienti idrici e colonizzare superfici e impianti di distribuzione, formando biofilm. In tali condizioni, alcuni ceppi sono in grado, quando si localizzano su substrati favorevoli, di produrre enterotossine stafilococciche responsabili di tossinfezioni particolarmente rilevanti in caso di contaminazione di alimenti o acque. Per questo motivo, la presenza di Stafilococchi patogeni nelle acque può rappresentare un indice di contaminazione e fornire informazioni sull'efficienza dei processi di trattamento e delle condizioni igienico-sanitarie della rete di distribuzione. (Istituto Superiore di Sanità, 2007)

Le specie di *Staphylococcus* vengono comunemente distinte in coagulasi-positive e coagulasi-negative sulla base della produzione dell'enzima coagulasi. Tra le specie coagulasi-positive, *Staphylococcus aureus* rappresenta il potenziale patogeno per eccellenza ed è uno dei più importanti agenti eziologici di infezioni nell'uomo sia in ambito comunitario sia ospedaliero. La sua rilevanza clinica è legata alla capacità di produrre numerosi fattori di virulenza, tra cui enterotossine, alla capacità di formare biofilm e alla possibilità di sviluppare resistenza a molteplici antibiotici, caratteristiche che ne favoriscono la persistenza e la diffusione in diversi contesti ambientali e sanitari. (Santos et al., 2020)

Salmonella spp

Il genere *Salmonella* appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* e comprende microrganismi bastoncellari, Gram-negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, mobili grazie alla presenza di flagelli peritrichi.

Attualmente sono riconosciuti oltre 2500 sierotipi di *Salmonella*, distinti sulla base delle diverse combinazioni degli antigeni somatici (O), capsulari (Vi) e flagellari (H). (Istituto Superiore di Sanità, 2007)

Le Salmonelle sono in grado di colonizzare numerose specie animali, che rappresentano il principale serbatoio del microrganismo. Per tale motivo, l'ingestione di alimenti contaminati, quali carne di pollame, uova e prodotti lattiero-caseari, rappresenta la principale forma di trasmissione all'uomo causando infezioni gastrointestinali di gravità variabile. *S. typhi* e *S. paratyphi* rappresentano delle eccezioni in quanto sono sierotipi adattati esclusivamente all'uomo che si trasmettono principalmente per via oro-fecale. Inoltre, la dose infettante è

normalmente elevata, ad eccezione di *S. typhi* che è in grado di causare malattia anche in seguito all'ingestione di un inoculo di entità ridotta. (Murray et al., 2021)

Nell'ambiente acquatico, *Salmonella* può essere presente in seguito a contaminazione fecale primaria, dovuta all'immissione diretta di scarichi fognari, oppure secondaria, conseguente ad esempio al dilavamento da suoli contaminati. Tuttavia, adeguati trattamenti di potabilizzazione, in particolare mediante clorazione, consentono generalmente un efficace controllo della sua diffusione. (Istituto Superiore di Sanità, 2007)

La ricerca di *Salmonella* nelle acque richiede generalmente l'analisi di elevati volumi di campione, al fine di aumentare la probabilità di rilevare il microrganismo qualora presente. L'esito dell'analisi viene espresso in termini qualitativi, come presenza o assenza.

1.5 Criteri analitici

I risvolti analitici riguardanti la valutazione della qualità dell'acqua destinata al consumo umano si ricollocano nella cosiddetta “evoluzione concettuale dei criteri di qualità”.

Con tale termine si configura la dinamica con la quale i criteri di qualità ormai da tempo trascendono la loro origine tradizionale di orientamenti volontari per assumere il ruolo di requisiti o obblighi.

Tale dinamica non è da ricondurre a modifiche sostanziali delle norme tecniche che delineano i criteri di qualità: proprio in quanto documenti tecnici queste non potrebbero prospettare caratteri di cogenza, ma l'evoluzione in questione va ricondotta a precise disposizioni di legge che hanno sancito la obbligatorietà di applicazione di norme tecniche.

La “finalità strategica” di questa relativamente nuova impostazione dei criteri di qualità è il perseguimento della tutela della salute e della salvaguardia delle risorse.

Il settore della igiene degli alimenti è stato un precursore nel contesto, con riferimento specifico alle norme tecniche concernenti la qualità analitica, vale a dire inizialmente la UNI CEI EN 45001 e, a far tempo in via definitiva dal 1° gennaio 2003, la UNI CEI EN ISO/IEC 17025. (UNI EN ISO 45001, 1990) (UNI CEI EN ISO/IEC 17025, 2018)

Si tratta delle norme tecniche che hanno rappresentato e tuttora costituiscono riferimento per la qualità analitica, e pertanto per l'attendibilità dei risultati. In qualunque ambito di prova si tratta, infatti, di un obiettivo fondamentale: a maggior ragione in un contesto in cui oggetto di valutazione siano i prodotti destinati alla alimentazione.

Garanzia di attendibilità dei risultati configura sostanzialmente la veridicità delle decisioni ad essi conseguenti.

Come già anticipato, il settore della igiene degli alimenti è stato un vero e proprio precursore della evoluzione concettuale dei criteri di qualità, ed i “momenti” fondamentali di tale evoluzione nel nostro Paese vanno configurati:

- nel Decreto Legislativo n. 156 del 26 maggio 1997, attuazione della Direttiva 93/99/CEE (D. Lgs. 156/1997, 1997);
- nell'Accordo assunto in data 17 giugno 2004 tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano (Accordo Stato-Regioni 17 Giugno 2004, 2004).

I due provvedimenti richiamati in precedenza riguardavano rispettivamente il controllo ufficiale e l'autocontrollo dei prodotti destinati alla alimentazione: trattandosi dei due “meccanismi” nei quali si articolava e si articola tuttora il contesto della igiene degli alimenti, analoghi dovevano essere i loro criteri di attuazione.

Il principio della obbligatorietà di applicazione dei criteri della qualità analitica è stato poi esteso all'acqua destinata al consumo umano dal Decreto del Ministero della Salute 14 giugno 2017, con decorrenza dal 1° gennaio 2020 (D.M. 14 Giugno 2017, 2017).

Tale estensione risulta appropriata essendo l'acqua a tutti gli effetti un alimento, come codificato sotto il profilo legislativo dal Regolamento (CE) n. 178/2002 (Regolamento (CE) n. 178/2002, 2002).

Inoltre, a proposito delle pertinenze epidemiologiche, considerato l'utilizzo capillare dell'acqua ed il concetto recentemente introdotto dal Decreto Legislativo n. 18 del 23 febbraio 2023 (D. Lgs 18/2023, 2023) della associazione del rischio al consumo dell'acqua, i necessari controlli analitici finalizzati a garantirne la qualità non potevano essere avulsi dall'indispensabile obiettivo della attendibilità dei risultati.

L'obbligo dell'applicazione dei dettami stabiliti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 si estende pertanto, con riferimento al Decreto Legislativo n. 18 del 23 febbraio 2023:

- ai controlli interni, vale a dire le attività analitiche poste in essere dagli enti gestori del servizio idrico, che corrispondono all'autocontrollo sui prodotti destinati alla alimentazione;

- ai controlli esterni, eseguiti da aziende sanitarie e aziende di protezione ambientale, configurabili a tutti gli effetti come attività di controllo ufficiale.

La corretta interpretazione del Decreto Legislativo n. 18 del 23 febbraio 2023 e della successiva integrazione (Decreto Legislativo n. 102 del 19 giugno 2025) consente però di evidenziare una più completa configurazione dei risvolti analitici applicabili al “problema acqua destinata al consumo umano”.

Viene infatti definito e valorizzato il “*sistema idro-potabile di distribuzione interno ai locali pubblici e privati, collocato fra il punto di consegna e il punto d’uso dell’acqua*”.

In tal modo si circoscrive l'ambito nel quale può effettivamente concretizzarsi un margine di rischio conseguente al consumo dell'acqua. Un aspetto del tutto innovativo introdotto dal Decreto Legislativo n. 18 del 23 febbraio 2023 è stato infatti l'inserimento del genere batterico *Legionella* tra i parametri microbiologici che devono essere oggetto di specifica valutazione per garantire qualità ed igienicità dell'acqua destinata al consumo umano.

“Habitat” di tale genere batterico è costituito dagli impianti idrici, vale a dire le strutture che costituiscono il “*sistema idro-potabile di distribuzione interno ai locali pubblici e privati, collocato fra il punto di consegna e il punto d’uso dell’acqua*”, già in precedenza richiamato.

Situazioni strettamente connesse alla recente pandemia da *Coronavirus* hanno tra l'altro largamente contribuito ad accentuare la diffusione degli stipiti di *Legionella* negli impianti idrici: si tratta dei cosiddetti periodi di “lockdown”, nei quali edifici pubblici venivano chiusi per tempi piuttosto consistenti, al fine di ostacolare il contagio virale. In tali periodi gli impianti idrici rimanevano inutilizzati e una simile situazione di ristagno favoriva grandemente la proliferazione degli stipiti in questione, soprattutto nelle strutture piuttosto datate, dove consistente risulta lo sviluppo di biofilm, substrato favorente la persistenza della tipologia batterica di cui trattasi.

Nel testo del provvedimento non viene specificamente riportato l'obbligo della conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 anche delle strutture analitiche che operino nei controlli riguardanti l'acqua prelevata dai sistemi di distribuzione interni, nonostante i criteri non dovrebbero essere divergenti da quelli in precedenza esplicitati, data la particolare delicatezza di tali valutazioni, oltre al concreto rischio per la salute degli utilizzatori che gli impianti idrici configurano.

1.6 Accreditamento dei laboratori e requisiti della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025

Nell'ambito dei controlli esterni sulle acque destinate al consumo umano, le attività analitiche di laboratorio sono affidate dalle Aziende Sanitarie Locali (ASL) territorialmente competenti alle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), che operano come laboratori incaricati delle analisi microbiologiche e chimiche. Tali attività rientrano nel sistema di sorveglianza della qualità dell'acqua e sono finalizzate alla tutela della salute pubblica. (Istituto Superiore di Sanità, 2024)

Pertanto, i laboratori incaricati di tali attività devono essere accreditati secondo quanto previsto dal Decreto del Ministero della Salute 14 giugno 2017 per le valutazioni analitiche riguardanti generi e specie microbiche che costituiscono il tradizionale fondamento per la definizione della idoneità dell'acqua per il consumo umano. Tale decreto, nell'Allegato II sulle specifiche per l'analisi dei parametri, prevede l'obbligatorietà dell'accREDITAMENTO in conformità alla norma tecnica internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17025 per tutte le strutture analitiche impegnate nei controlli interni o esterni nell'ambito delle acque destinate al consumo umano. Questo concetto è conforme a quanto avviene per autocontrolli e controlli ufficiali dei prodotti alimentari, considerando che l'acqua destinata al consumo umano è equiparata ai prodotti destinati all'alimentazione. (D.M. 14 Giugno 2017, 2017)

L'accREDITAMENTO attesta che il laboratorio di prova possiede i requisiti richiesti dalla norma tecnica internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17025 per lo svolgimento delle attività di valutazione della conformità ed è rilasciato da un organismo nazionale di accREDITAMENTO, in Italia rappresentato da Accredia. Esso non costituisce una certificazione del singolo risultato analitico, ma attesta la capacità del laboratorio di produrre risultati tecnicamente validi e affidabili nel tempo, garantendo l'imparzialità, la competenza e il corretto funzionamento del sistema di gestione dei laboratori. (Accredia, 2023)

L'accREDITAMENTO non si riferisce all'intera attività del laboratorio in modo generale, ma è limitato a specifiche prove analitiche definite nel cosiddetto "campo di accREDITAMENTO". Tale documento riporta l'elenco delle prove per le quali il laboratorio ha ottenuto il riconoscimento, specificando i metodi di prova utilizzati e le matrici di riferimento. Di conseguenza, solo le prove incluse all'interno di tale elenco rientrano nel riconoscimento rilasciato dall'organismo di accREDITAMENTO. (Accredia, 2026)

Il riferimento fissato nel contesto della normazione tecnica per la qualità analitica (vale a dire per i criteri che devono garantire la attendibilità dei risultati e la veridicità delle valutazioni ad essi conseguenti) è costituito dalla norma UNI CEN EN ISO/IEC 17025.

Tale norma, entrata in vigore definitivamente dal gennaio 2003 dopo un periodo di sovrapposizione con la precedente UNI CEI EN 45001 (UNI EN ISO 45001, 1990), rappresenta un documento tecnico fondamentale nell'impostazione dei criteri di qualità analitica.

In particolare, questa norma ha correttamente interpretato le sostanziali enunciazioni di principio codificate dal documento precedente, trasformandole in orientamenti operativi. Trattandosi di orientamenti di base (*"General requirements for the competence of testing and calibration laboratories"* è infatti il titolo originale attribuito da ISO), la applicazione delle medesima deve essere adeguatamente supportata da documenti tecnici che considerino specificamente i risvolti peculiari delle diverse discipline contraddistinte da aspetti analitici (come nel caso della microbiologia, a sua volta macro-disciplina, selettivamente considerata nella presente tesi).

Al riguardo, la corretta applicazione dei criteri di qualità analitica appare fondamentale nell'ambito dell'acqua destinata al consumo umano, vale a dire di un substrato povero di sostanze nutritive dove per le tipologie microbiche di specifico interesse, specificate dal D. Lgs. n. 18/2023, appare indubbiamente concreta la eventualità della formazione di cellule microbiche VBNC (Viable But NonCulturable).

I requisiti che contraddistinguono la norma UNI CEN EN ISO/IEC 17025 possono essere suddivisi sostanzialmente nei tradizionali:

- requisiti gestionali;
- requisiti tecnici.

Per il vero, la più recente versione della norma riporta termini formalmente difforni al riguardo, ma il significato rimane quello indicato.

I requisiti gestionali, o organizzativi, ripropongono sostanzialmente quanto riportato nelle altre norme, ad esempio la UNI EN ISO 9001, (UNI EN ISO 9001, 2015) e comprendono la parte "strutturale" del Sistema Qualità adottato da una organizzazione.

Tra tali requisiti è compreso ad esempio il personale, elemento caratterizzante di qualunque sistema, considerato che ciascuna funzione prevista deve trovare il proprio fondamento su:

- competenze istituzionalmente attribuite da disposizioni di legge;

- conoscenze e qualificazione maturate per l'adeguato adempimento dell'incarico formalmente espletato.

Analogamente un significato non trascurabile viene riconosciuto alla qualificazione dei fornitori di servizi o di materiali. Infatti, nella predisposizione di un prodotto (nel caso della UNI EN ISO 9001) o nella definizione di un risultato, la qualità delle materie prime, così come dei reagenti o delle apparecchiature, riveste un ruolo tutt'altro che trascurabile (considerato, tra l'altro, che una volta formalizzata la relativa accettazione, le relative responsabilità ricadono inevitabilmente sulla organizzazione che tale a formalizzazione ha dato seguito).

Tra i requisiti tecnici sono poi da considerare alcuni risvolti innovativi della norma UNI CEN EN ISO/IEC 17025.

I requisiti tecnici già costituiscono solitamente i punti maggiormente caratterizzanti e specifici di una norma e, nel caso del documento tecnico di cui trattasi, questi rappresentano altresì elementi del tutto lungimiranti per l'obiettivo dell'attendibilità dei risultati.

Il riferimento ricade sui punti relativi a:

- scelta dei metodi di prova;
- assicurazione della qualità dei risultati.

A proposito della scelta dei metodi, viene codificato il principio per cui al responsabile di laboratorio si riconosce la “chance” di potersi orientare non solo verso metodi normati (vale a dire porre in esecuzione il criterio più tradizionalmente considerato), ma anche di avvalersi di metodi diversi, pure interni al laboratorio, qualora ciò si riveli maggiormente funzionale all'obiettivo “strategico” più volte in precedenza richiamato.

Il requisito inderogabile viene individuato nella avvenuta validazione del metodo prescelto, a garanzia della relativa attendibilità tecnica.

Viene in tal modo valorizzato il ruolo della “componente umana”, fondamentale nel contesto di una macro-disciplina come la microbiologia, oggetto di una imponente evoluzione tecnico-scientifica non sempre recepita in tempi rapidi dagli organi istituzionali.

Tale significativa “apertura” rappresenta altresì un allineamento a recenti provvedimenti di legge, quali lo stesso D. Lgs. n. 18/2023 ed il Regolamento di Esecuzione (UE) 2024/2463 (anzi, per “correttezza anagrafica” va precisato come siano state queste disposizioni ad allinearsi opportunamente ai dettami della norma UNI CEN EN ISO/IEC 17025).

Per quanto riguarda infine la assicurazione della qualità dei risultati, vengono opportunamente evidenziati i criteri da attuare per perseguire tale indispensabile obiettivo. I criteri in questione prevedono in sostanza due modalità operative, a seguire esplicitate.

L'attuazione di controlli di qualità interni alla struttura analitica, attraverso un utilizzo costante ed appropriato di CRM (Certified Reference Materials), sotto la diretta supervisione del responsabile di laboratorio.

La partecipazione a cicli di prove interlaboratorio, vale a dire controlli di qualità esterni nei quali assume non trascurabile rilevanza il confronto con la operatività di strutture analitiche diverse. Considerata la rilevanza e delicatezza del contesto, garanzia inderogabile sulla attendibilità di tali prove dovrà essere costituita dalla conformità dei relativi “providers” alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2024, formalmente attestata.

2. SCOPO DEL LAVORO

La Direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2020, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, rifusione della precedente Direttiva 98/83/CEE del Consiglio, costituisce un momento fondamentale dell'evoluzione legislativa continentale riguardante primariamente la tutela della salute umana.

Al di là della introduzione del concetto di rischio associato al consumo dell'acqua (in realtà riproposizione del principio già introdotto dal Regolamento (CE) n. 178 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002), l'aspetto di maggiore significato sotto il profilo giuridico ed epidemiologico consiste nell'avere introdotto parametri innovativi di riferimento per la valutazione dell'eventuale rischio, quali il genere batterico *Legionella* e l'elemento chimico piombo.

La Direttiva (UE) 2020/2184 è stata attuata nel nostro Paese con il Decreto Legislativo 23 febbraio 2023, n. 18, a sua volta successivamente integrato dal Decreto Legislativo 19 giugno 2025, n. 102. Tali provvedimenti hanno contribuito, tra l'altro, ad orientare l'attenzione dell'opinione pubblica verso quello che viene definito “problema acqua”.

Tale deve essere infatti opportunamente considerato sulla base di dati inconfutabili riconducibili all'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT). Già nel proprio Rapporto annuale del marzo 2021, ISTAT denunciò una corrente perdita di acqua, attribuibile unicamente alle cattive condizioni della infrastruttura idrica, valutabile nel 42% del volume distribuito. A fronte della capillarità del servizio di approvvigionamento idrico esistente nel nostro Paese, pertanto, quasi la metà del volume di acqua distribuita non arriva ai consumatori non per eventi accidentali o imprevedibili, ma per le condizioni di criticità del sistema.

Nel Report “Le statistiche sull'acqua” pubblicato il 20 marzo 2026 in occasione della Giornata Mondiale sull'acqua che si tiene il 22 marzo di ogni anno, ISTAT ha inoltre riportato come l'84,8% del prelievo destinato ad uso umano deriva da acque sotterranee (sorgenti e pozzi) e il 15,1% da acque superficiali (corsi d'acqua, laghi naturali e bacini artificiali): ciò comprova una capacità non trascurabile di sfruttamento di una risorsa preziosa come le acque superficiali. Anche le acque marine trovano un utilizzo, che il rapporto ISTAT valuta in 9,2 milioni di metri cubi e localizza soprattutto nella regione Sicilia, per l'approvvigionamento delle isole minori, oltre che in Toscana e Lazio.

Il seguente studio, svolto presso il Laboratorio Specialistico Strumentale Nord Ovest dell'ARPA Piemonte, sito in Grugliasco (TO), affronta alcuni aspetti significativi del “problema

acqua destinata al consumo umano”, inerenti all’applicazione delle disposizioni di legge in precedenza richiamate. In particolare, verrà dedicata specifica attenzione ai risvolti di natura microbiologica che emergeranno dalle valutazioni analitiche effettuate su campioni di acqua in conformità con quanto previsto dall'articolo 13 del D. Lgs. n. 18/2023.

Al riguardo, la struttura analitica ospitante è accreditata, in conformità con la norma tecnica internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17025, per le valutazioni analitiche riguardanti generi e specie microbici che costituiscono il tradizionale fondamento per la definizione dell’idoneità dell'acqua per il consumo umano: ciò a garanzia della attendibilità dei risultati ottenuti e della veridicità delle decisioni agli stessi conseguenti. L'accreditamento delle prove espletate costituisce un obbligo sancito dal Decreto del Ministero della Salute 14 giugno 2017 per qualunque struttura analitica impegnata nei controlli sia interni sia esterni riguardanti le acque destinate al consumo umano.

Non verrà considerato il parametro di concezione innovativa per le acque destinate al consumo umano quale è il genere *Legionella*: una diversa struttura facente parte della ARPA Piemonte costituisce infatti centro di riferimento per tale determinazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento, trasporto e conservazione

La fase pre-analitica, nelle valutazioni di laboratorio, ricopre un ruolo cruciale, in quanto rappresenta uno dei passaggi in cui possono verificarsi molteplici errori, potenzialmente responsabili di variabilità dei risultati. (Lima-Oliveira et al., 2017)

Poiché i dati analitici devono riflettere le condizioni del materiale al momento del prelievo, è importante che le fasi di campionamento, trasporto e conservazione del campione siano eseguite in modo corretto e controllato, al fine di evitare qualunque compromissione della matrice. (Wątor & Dobrzyński, 2022).

Sono state elaborate delle norme tecniche che forniscono indicazioni sulle corrette procedure operative da adottare. In particolare, le procedure di campionamento delle acque destinate al consumo umano fanno riferimento alla norma ISO 19458, che fornisce indicazioni relative alla pianificazione dei programmi di campionamento, alle tempistiche e alle modalità di prelievo. (UNI EN ISO 19458, 2006)

Il prelievo dei campioni analizzati presso il Laboratorio Specialistico Strumentale Nord Ovest dell'ARPA Piemonte, non viene eseguito direttamente dal personale di laboratorio, ma è effettuato e gestito dalle Aziende Sanitarie Locali (ASL) del territorio.

In particolare, il laboratorio è responsabile dell'esecuzione delle analisi microbiologiche sui campioni prelevati nell'ambito dei controlli ufficiali effettuati sull'intera provincia di Torino e coinvolge complessivamente nove Aziende Sanitarie Locali.

I campioni vengono raccolti all'interno di recipienti sterili di volume variabile in funzione dei parametri microbiologici richiesti. Generalmente vengono utilizzati contenitori da 500 mL, che garantiscono un volume sufficiente per l'esecuzione delle analisi microbiologiche previste dalla normativa vigente. In presenza di richieste analitiche aggiuntive, di analisi di acqua imbottigliata o per parametri particolari (ad esempio *Legionella* spp. o *Salmonella* spp.) possono essere utilizzati contenitori di volume superiore.

I recipienti utilizzati sono addizionati con tiosolfato di sodio, un agente riducente che permette di inattivare il cloro residuo, eventualmente presente nelle acque destinate al consumo umano, interrompendo l'azione disinfettante e impedendo alterazioni della componente microbiologica presente al momento del prelievo.

Ogni campione deve essere sempre affiancato dal verbale di campionamento su cui sono riportate importanti informazioni quali: data, ora, luogo e punto di campionamento, personale coinvolto, temperatura, eventuali osservazioni e i parametri chimici e microbiologici richiesti.

Il campione deve poi essere trasportato e consegnato al laboratorio, rispettando le indicazioni riportate nella ISO 5667-3. In particolare, è necessario che sia protetto dalla luce e che sia mantenuto ad una temperatura inferiore ai 10°C durante il trasporto, al fine di preservarne la rappresentatività. (UNI EN ISO 5667-3, 2024)

Per le acque destinate al consumo umano è inoltre previsto che il campione venga analizzato dal laboratorio entro 24 ore dal campionamento, così da garantire il mantenimento delle condizioni originali ed evitare qualunque modifica dell'ecologia microbica originale. All'arrivo presso il laboratorio, i campioni vengono sottoposti alle procedure di accettazione, registrazione della temperatura e inserimento nel sistema gestionale per poi essere conservati in frigorifero a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ fino all'inizio delle analisi.

Talvolta i campioni possono prevedere implicazioni fiscali, ovvero essere sigillati in loco subito dopo il prelievo. In questo caso sul verbale viene riportata la data e l'ora di inizio analisi per permettere l'assistenza alla stessa.

3.2 Tecniche analitiche

Le analisi microbiologiche eseguite sui campioni di acqua seguono le indicazioni riportate nella norma ISO 8199, che fornisce linee guida per la preparazione dei campioni, l'impiego dei terreni di coltura, delle attrezzature di laboratorio e della vetreria.

La norma descrive inoltre le principali tecniche colturali disponibili e i criteri per la scelta di quella più appropriata, in funzione dell'obiettivo analitico. Il principio generale di tali tecniche consente nell'inoculare un volume noto di campione in un terreno di coltura idoneo, al fine di favorire la moltiplicazione dei microrganismi oggetto di indagine durante l'incubazione e consentire l'enumerazione delle unità formanti colonie (UFC) sviluppatesi.

La scelta della tecnica colturale più idonea dipende sia dalle caratteristiche dei microrganismi ricercati sia dalla natura del campione di acqua da analizzare. (UNI EN ISO 8199, 2018)

3.2.1 Tecnica della filtrazione su membrana

La tecnica della filtrazione su membrana rappresenta uno dei criteri analitici maggiormente utilizzati per il monitoraggio microbiologico di campioni di acqua a bassa carica microbica.

Tale tecnica consente la determinazione del numero di microrganismi presenti nel campione andando a valutare l'eventuale crescita di colonie su una membrana filtrante dopo che è stata posta su un terreno di coltura idoneo. Il risultato viene espresso come UFC (Unità formanti colonia) in relazione al volume di campione filtrato. (APAT & CNR - IRSA, 2003)

La tecnica della filtrazione su membrana viene impiegata per la determinazione di diversi parametri microbiologici previsti dalla normativa vigente, ad eccezione del conteggio delle colonie a 22°C per la quale viene utilizzata la tecnica per inclusione su piastra.

I principali materiali utilizzati per la tecnica di filtrazione su membrana sono quelli a seguire esplicitati.

- **Sistema filtrante** (*Fig.1*)

È costituito dalla rampa in acciaio, formata da supporti in serie, ciascuno dotato di un proprio rubinetto, su cui vengono posizionati imbusti graduati sterili. La rampa è collegata ad una pompa da vuoto, che genera un vuoto pari a circa 700 mbar per consentire la filtrazione del campione, e a due contenitori per la raccolta dell'acqua filtrata.

- **Membrane filtranti**

Sono dischetti in esteri di cellulosa dal diametro di 47 mm e con pori di dimensione 0.45 µm. La superficie porosa permette di trattenere eventuali microrganismi presenti nel campione ed è caratterizzata da una griglia che facilita il conteggio delle colonie.

- **Pinzette sterili**

- **Pipette sterili monouso**

- **Becco Bunsen**

- **Piastre Petri**

Sono piastre dal diametro di 55 mm contenenti terreni di coltura selettivi e/o differenziali specifici per i microrganismi ricercati.

- **Incubatore termostatico**



Figura 1: Sistema filtrante con imbuto graduati

La filtrazione viene eseguita assemblando il sistema di filtrazione e posizionando gli imbuto graduati sterili sui supporti della rampa. Le membrane filtranti vengono trasferite sul disco poroso presente alla base dell'imbuto mediante pinzette preventivamente sterilizzate alla fiamma del becco Bunsen.

Il campione viene accuratamente omogeneizzato e si procede alla filtrazione di un volume noto, selezionato in funzione del parametro microbiologico da determinare.

Al termine della filtrazione, l'imbuto viene rimosso e la membrana trasferita sulla superficie del terreno di coltura. Tale fase risulta estremamente delicata al fine di evitare la formazione di bolle d'aria, che non consentirebbero il corretto contatto tra membrana e terreno ostacolando quindi l'eventuale crescita batterica.

Nel caso in cui sullo stesso campione siano richieste analisi per parametri differenti, la filtrazione viene ripetuta seguendo la medesima procedura operativa senza dover cambiare l'imbuto. (UNI EN ISO 7704, 2023)

3.2.2 Tecnica dell'inclusione in agar

La tecnica dell'inclusione in agar viene utilizzata, con riferimento ai parametri richiesti per l'acqua destinata al consumo umano, principalmente per la determinazione del conteggio delle colonie a 22°C. Si tratta di un parametro indicatore della presenza di microrganismi psicrofili vitali presenti in un campione, generalmente appartenenti alla microflora ambientale delle acque, i quali non necessariamente rivestono un significato sanitario. (Allen et al., 2004)

I principali materiali utilizzati per la tecnica di inclusione sono riportati a seguire.

- **Piastra Petri** da 90 mm

- **Pipette sterili monouso**
- **Becco Bunsen**
- **Incubatore termostatico**

La tecnica prevede di seminare un'aliquota di campione pari a 1 mL in una capsula Petri vuota e successivamente aggiungere circa 15 mL di terreno di coltura mantenuto allo stato liquido mediante bagno termostatico a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Per consentire una miscelazione omogenea tra il campione e il terreno si eseguono movimenti rotatori e nelle quattro direzioni. Successivamente il terreno viene lasciato solidificare e le piastre vengono poi incubate capovolte a $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ per 68 ± 4 ore.

3.3 Ricerca ed enumerazione dei parametri microbiologici

3.3.1 Batteri coliformi ed *Escherichia coli*

Per la ricerca e l'enumerazione dei batteri coliformi e di *Escherichia coli* è stato utilizzato il metodo descritto nella norma UNI EN ISO 9308-1:2017, basato sulla tecnica della filtrazione su membrana.

Il terreno selettivo e differenziale impiegato è il Chromogenic Coliform Agar (CCA), formulato per consentire l'identificazione e la conta simultanea dei batteri coliformi e di *E. coli* in campioni di acqua con bassa carica batterica.

La discriminazione tra batteri coliformi ed *E. coli* è resa possibile dalla presenza di due substrati cromogeni, Salmon- β -D-galattoside e X- β -G-glucuronide. Il primo viene idrolizzato dall'enzima β -D-galattosidasi, caratteristico dei batteri coliformi, mentre il secondo viene idrolizzato dalla β -D-glucuronidasi, enzima caratteristico di *E. coli*.

Composizione terreno CCA:

Tabella 3: Composizione terreno CCA (Biolife Italiana S.r.l., 2023a)

Idrolizzato enzimatico di caseina	1,00 g	Azoto, carbonio, aminoacidi e minerali per la crescita microbica
Estratto di lievito	2,00 g	Vitamine del gruppo B
Sodio cloruro	5,00 g	Mantenimento equilibrio osmotico

Sodio fosfato monobasico diidrato	2,20 g	Sistema tampone
Sodio fosfato bibasico	2,70 g	Sistema tampone
Sodio piruvato	1,00 g	Stimolante metabolico per cellule danneggiate
Sorbitolo	1,00 g	Fonte energetica fermentabile
Triptofano	1,00 g	Substrato per test dell'indolo
Tergitol® 7	0,15 g	Agente selettivo (inibitore batteri Gram-positivi)
Salmon-β-D-galattoside	0,20 g	Substrato cromogeno per β-D-galattosidasi
X-β-G-glucuronide	0,10 g	Substrato cromogeno per β-D-glucuronidasi
Isopropyl-β-D-tiogalattopiranoside	0,10 g	Induttore dell'operone lattosio
Agar	10,6 g	Agente solidificante

Il metodo descritto dalla ISO 9308-1 prevede l'applicazione della tecnica di filtrazione su membrana utilizzando 100 mL di campione. La membrana viene successivamente posta sulla superficie del terreno CCA ed incubata a $36^{\circ}\text{C} \pm 2$ per 21÷24 ore.

Al termine dell'incubazione si procede all'osservazione delle caratteristiche morfologiche e cromatiche e alla conta delle colonie.

Le colonie di colore da rosa a rosse, positive all'attività β-D-galattosidasica, vengono considerate come presunti batteri coliformi diversi da *E. coli*.

Le colonie di colore da blu scuro a viola, positive sia all'attività β-D-galattosidasica sia all'attività β-D-glucuronidasica, vengono considerate *E. coli*.

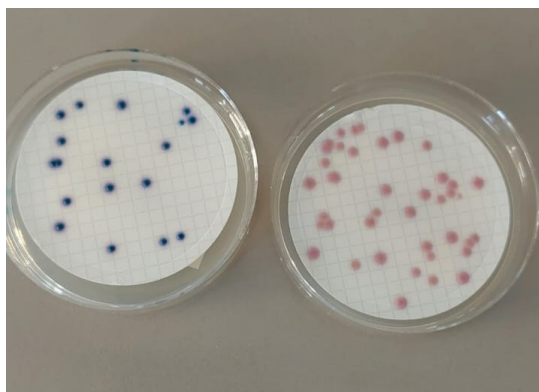


Figura 2: *Escherichia coli* (sinistra) e Batteri coliformi (destra)

Si procede quindi alla prova di conferma di almeno 10 colonie dei presunti batteri coliformi, al fine di escludere eventuali risultati falsi positivi dovuti alla crescita di batteri ossidasi positivi. I batteri coliformi, infatti, sono caratterizzati dall'assenza dell'enzima citocromo c ossidasi e risultano pertanto ossidasi negativi. Qualora siano presenti più di 10 colonie sospette, la selezione di quelle da sottoporre a conferma viene effettuata scegliendo le colonie con caratteristiche morfologiche e cromatiche maggiormente rappresentative, come indicato dalla ISO 8199.

La conferma viene effettuata mediante test dell'ossidasi utilizzando strisce di carta impregnate con N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiammina dicloridrato. Una colonia viene trasferita sulla striscia mediante ansa sterile monouso e osservata per la comparsa della reazione cromatica. La presenza dell'enzima determina la formazione di indofenolo e la comparsa di una colorazione blu-viola entro 5 secondi (test positivo), mentre l'assenza di viraggio indica un risultato negativo. Le colonie ossidasi negative vengono confermate come batteri coliformi. (Thermo Fisher Scientific, 2023)

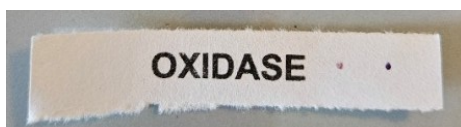


Figura 3: Test dell'ossidasi

Il numero di batteri coliformi totali viene calcolato sommando le colonie rosa-rosse confermate ossidasi negative alle colonie blu-viola attribuite a *Escherichia coli*. (UNI EN ISO 9308-1, 2017) (UNI EN ISO 8199, 2018)

3.3.2 Enterococchi intestinali

Per la determinazione degli Enterococchi intestinali nei campioni di acqua si fa riferimento alla norma UNI EN ISO 7899-2:2003. Tale metodo è applicabile ad acque destinate al consumo umano, acqua di piscina e acque pulite o disinfettate, e prevede l'impiego della tecnica di filtrazione su membrana. Risulta pertanto particolarmente adatto all'analisi di elevati volumi di acqua caratterizzati da cariche ridotte di Enterococchi intestinali.

Il terreno selettivo e differenziale utilizzato è lo Slanetz Bartley Agar, la cui composizione comprende:

Tabella 4: Composizione terreno Slanetz Bartley Agar (Biolife Italiana S.r.l., 2023e)

Triptosio	20,00 g	Azoto, carbonio, vitamine, aminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica
Estratto di lievito	5,00 g	Azoto, carbonio, vitamine, aminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica
Glucosio	2,00 g	Fonte di carbonio ed energia
Potassio fosfato bibasico	4,00 g	Sistema tampone
Sodio azide	0,40 g	Agente selettivo (inibitore batteri Gram-negativi)
Trifenil tetraziolo cloruro (TTC)	0,10 g	Indicatore ridotto in forma insolubile
Agar	10,0 g	Agente solidificante

Il metodo descritto dalla ISO 7899-2 prevede l'applicazione della tecnica di filtrazione su membrana analizzando 100 mL di campione. La membrana viene successivamente posta sulla superficie del terreno Slanetz Bartley Agar e incubata a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 44 ± 4 ore.

Al termine dell'incubazione si osserva la crescita e la colorazione delle colonie. Vengono considerate colonie tipiche quelle che mostrano una colorazione rossa, mattone o rosa.



Figura 4: Presunti Enterococchi intestinali

Si procede successivamente alla prova di conferma mediante l'osservazione dell'idrolisi dell'esculina sul terreno Bile Esculina Azide Agar (BEAA) la cui composizione comprende:

Tabella 5: Composizione terreno BEAA (Biolife Italiana S.r.l., 2022b)

Tryptone	17,00 g	Azoto, carbonio, aminoacidi, vitamine del gruppo B e oligoelementi per la crescita microbica
Peptone	3,00 g	Azoto, carbonio, aminoacidi, vitamine del gruppo B e oligoelementi per la crescita microbica
Estratto di lievito	5,00 g	Azoto, carbonio, aminoacidi, vitamine del gruppo B e oligoelementi per la crescita microbica
Bile di bue	10,00 g	Agente selettivo (inibitore batteri Gram-positivi diversi dagli enterococchi)
Sodio cloruro	5,00 g	Mantenimento equilibrio osmotico
Esculina	1,00 g	Substrato differenziale
Ferro Ammonio Citrato	0.50 g	Indicatore
Sodio Azide	0,15 g	Agente selettivo (inibitore batteri Gram-negativi)
Agar	13,00 g	Agente solidificante

La membrana viene trasferita dal terreno Slanetz Bartley Agar al terreno BEAA e incubata a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 2 ore.

Gli Enterococchi intestinali sono in grado di idrolizzare l'esculina in glucosio ed esculetina (6-7 diidrossicumarina). Quest'ultima reagisce con il citrato ferrico presente nel terreno formando un complesso di colore marrone scuro o nero.

Al termine dell'incubazione vengono contate come Enterococchi intestinali tutte le colonie che mostrano questa colorazione. (UNI EN ISO 7899-2, 2003)

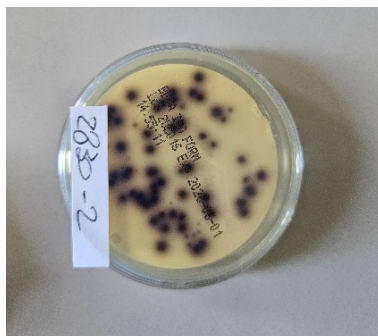


Figura 5: Enterococchi intestinali

3.3.3 Conteggio delle colonie a 22°C

Il conteggio delle colonie a 22°C viene effettuato seguendo la norma UNI EN ISO 6222:2001, mediante la tecnica dell'inclusione in agar.

La procedura analitica consente la determinazione di tutti i microrganismi coltivabili presenti nel campione, comprendenti principalmente batteri, ma anche lieviti e muffe. Tale parametro è utile quindi per valutare le caratteristiche delle fonti di acqua e l'efficienza dei processi di trattamento e dei sistemi di distribuzione.

Il terreno utilizzato per l'inclusione è Yeast Extract Agar, un terreno altamente nutritivo la cui composizione comprende:

Tabella 6: Composizione terreno Yeast Extract Agar (Biolife Italiana S.r.l., 2023f)

Triptone	6,00 g	Azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica
Estratto di lievito	3,00 g	Vitamine del gruppo B
Agar	15,00 g	Agente solidificante

Il terreno viene mantenuto in uno stato liquido mediante bagno termostatico alla temperatura di $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ prima dell'utilizzo.

Si procede inoculando 1 ml di campione nella piastra Petri sterile e miscelandolo con circa 15 mL di terreno. Dopo la solidificazione, le piastre vengono incubate a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 68 ± 4 ore.

Al termine del periodo di incubazione si procede al conteggio di tutte le colonie presenti nella piastra, utilizzando un fondo scuro per facilitare la lettura.

I campioni che giungono in laboratorio il mercoledì vengono incubati in un apposito frigorifero programmato per 72 ore a 22°C e 48 ore a 5°C (temperatura di refrigerazione).

Il risultato viene espresso come UFC/ml indicando anche l'incertezza di misura. (UNI EN ISO 6222, 2001)

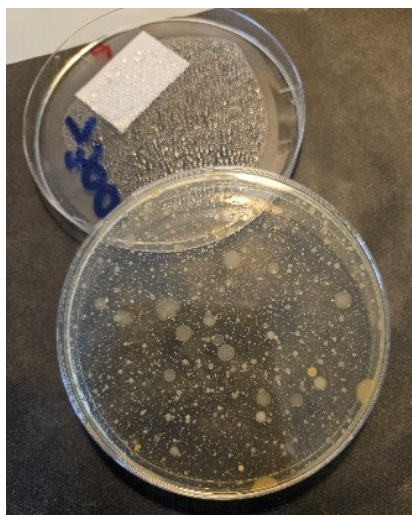


Figura 6: Conteggio colonie a 22°C

3.3.4 *Clostridium perfringens*

Per la ricerca di *Clostridium perfringens* nelle acque destinate al consumo umano si fa riferimento al Rapporto ISTISAN 07/05 e, in particolare, al Metodo ISS A 005B, che applica la tecnica della filtrazione su membrana.

Il terreno utilizzato è Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar addizionato con D-cicloserina, un antibiotico selettivo che inibisce gran parte della flora batterica interferente e favorisce l'isolamento di *C. perfringens*.

La composizione prevede:

Tabella 7: Composizione terreno TSC Agar (Biolife Italiana S.r.l., 2024)

Idrolisato pancreatico di caseina	15 g	Azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita batterica
Peptone di soia	5 g	Azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita batterica
Estratto di lievito	5 g	Vitamine del gruppo B
Ferro (III) ammonio citrato	1 g	Indicatore
Sodio metabisolfito anidro (Na ₂ S ₂ O ₅)	1 g	Indicatore
Agar	15 g	Agente solidificante
D-Cicloserina	400 mg	Antibiotico

Il metodo prevede la filtrazione di 100 mL di campione e il successivo trasferimento della membrana sul terreno TSC Agar. L'incubazione viene effettuata a $44^{\circ}\text{C} \pm 1$ per 21 ± 3 ore in condizioni di anaerobiosi, garantite dall'introduzione delle piastre in giara a chiusura ermetica.

L'anaerobiosi viene ottenuta mediante l'inserimento di una busta di anaerobiosi, in grado di rimuovere l'ossigeno presente e produrre CO₂, creando condizioni favorevoli alla crescita dei batteri anaerobi. In aggiunta, viene inserito un indicatore di anaerobiosi che consente di verificare il raggiungimento e il mantenimento delle condizioni anaerobiche durante l'incubazione.

Al termine dell'incubazione, le colonie presuntive di *Clostridium perfringens* appaiono di colore nero o grigio-nero a causa della riduzione del solfito a solfuro da parte degli stipiti batterici presenti e della successiva reazione del solfuro con il ferro ammonio citrato presente nel terreno, che determina la formazione di un precipitato nero di solfuro ferroso.

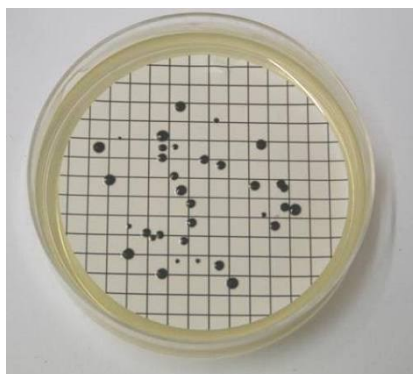


Figura 7: Presunte colonie di C. perfringens (Standing Committee of Analysts, 2020)

Le colonie presuntive devono essere sottoposte a conferma mediante semina su Columbia Blood Agar, terreno arricchito utilizzato per l'osservazione dell'attività emolitica batterica. A tale scopo, le colonie selezionate vengono inoculate su due piastre, una incubata in anaerobiosi e una in aerobiosi, entrambe a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

Composizione Columbia Blood Agar:

Tabella 8: Composizione Columbia Blood Agar (Biolife Italiana S.r.l., 2025a)

Peptocomplex	10 g	Azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica
Triptosio	10 g	Azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica
Peptone	3 g	Azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica
Amido di mais	1 g	Fonte di energia e funzione disintossicante
Sodio cloruro	5 g	Mantenimento equilibrio osmotico
Agar	12 g	Agente solidificante
Sangue defibrinato di montone	50 mL	Attività emolitica dei batteri
Acqua purificata	1000 mL	Solvente

Le colonie di *C. perfringens* mostrano tipicamente una crescita più abbondante in anaerobiosi e producono aree di emolisi chiarificate sulla superficie del terreno. Le colonie cresciute in anaerobiosi vengono quindi sottoposte a ulteriori prove di conferma mediante identificazione biochimica.

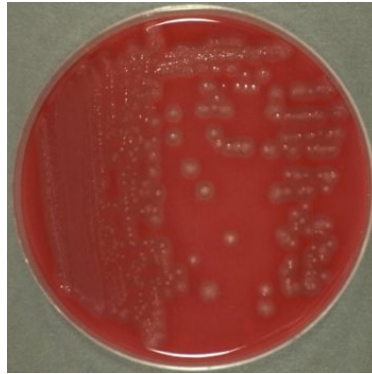


Figura 8: Clostridium perfringens (University of Copenhagen, 2011)

L'identificazione biochimica viene effettuata mediante il sistema API 20 A, una galleria miniaturizzata costituita da 20 test biochimici che consentono di valutare differenti reazioni metaboliche e di fermentazione caratteristiche dei batteri anaerobi.

La sospensione batterica viene preparata stemperando le colonie cresciute in anaerobiosi su Columbia Blood Agar all'interno di una fiala di API 20A Medium fino al raggiungimento di una torbidità pari a 3 McFarland, verificata mediante densitometro. Dopo aver inumidito la vaschetta di incubazione con 5 mL di acqua distillata, la striscia di API 20 A viene posizionata al suo interno. La sospensione batterica viene quindi distribuita nelle 20 microprovette della galleria contenenti substrati disidratati, facendo attenzione a non creare bolle. Per il test GEL, contrassegnato da un rettangolo, vengono riempite sia la provetta sia la cupola, mentre per il test IND, sottolineato da una linea, viene riempita la provetta con la sospensione e la cupola con olio di paraffina per evitare l'evaporazione dell'indolo.

La galleria viene incubata a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 ore in condizioni di anaerobiosi.

Al termine dell'incubazione si procede alla rivelazione di alcune reazioni mediante l'aggiunta di specifici reattivi.

Nei test contenenti carboidrati viene aggiunta una goccia di reattivo BCP per evidenziare l'eventuale acidificazione del substrato dopo 2-3 minuti.

Per il test dell'indolo si aggiunge una goccia del reagente XYL (xilene) allo strato di olio di paraffina, lasciando agire 2-3 minuti. Successivamente viene aggiunta una goccia di reattivo EHR (Reagente di Ehrlich), lasciando agire per 5 minuti.

Per il test CAT vengono infine aggiunte due gocce di perossido di idrogeno al 3% ad una microprovetta con reazione positiva, per la valutazione dell'attività catalasica.

L'identificazione viene effettuata mediante l'attribuzione di un codice numerico ottenuto dall'interpretazione delle reazioni positive e negative osservate nei 20 pozzetti, confrontate con una tabella di riferimento. Sulla scheda dei risultati i test sono suddivisi in gruppi di tre e per ognuno è indicato un valore di 1, 2 o 4. La somma dei valori corrispondenti alle reazioni positive per ciascun gruppo genera un codice identificativo di 7 cifre. La prova della catalasi costituisce il ventunesimo test da registrare sulla scheda dei risultati.

Il codice ottenuto viene inserito all'interno del software APIWEB che consente l'identificazione del microrganismo in base alle sue caratteristiche biochimiche. (BioMérieux, 2019a) (Istituto Superiore di Sanità, 2007)

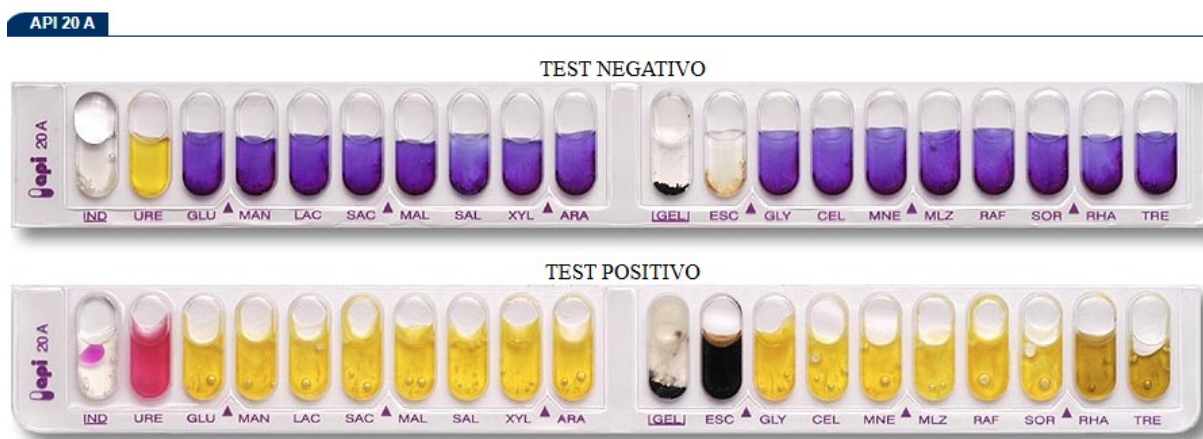


Figura 9: API 20 A (BioMérieux, 2019a)

3.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Per l'isolamento e la conta di *Pseudomonas aeruginosa* si fa riferimento alla norma UNI EN ISO 16266:2008 che applica la tecnica della filtrazione su membrana.

Il metodo prevede la filtrazione di 250 mL di campione attraverso una membrana filtrante che viene successivamente trasferita sul terreno selettivo CN Agar.

Composizione del terreno:

Tabella 9: Composizione terreno CN Selective Agar (Biolife Italiana S.r.l., 2023b)

Peptone di gelatina	16,0 g	Aminoacidi, azoto e carbonio per la crescita microbica
Idrolizzato acido di caseina	10,0 g	Azoto, vitamine e fattori di crescita
Potassio solfato anidro	10,0 g	Stimolazione produzione pigmenti
Magnesio cloruro anidro	1,4 g	Stimolazione produzione pigmenti
Agar	11,5 g	Agente solidificante
Cetrimide	200 mg	Inibisce batteri Gram-positivi e batteri Gram-negativi diversi da <i>Pseudomonas</i>
Acido nalidixico	15,0 mg	Antibiotico inibitore di batteri Gram-negativi diversi da <i>Pseudomonas</i>
Glicerolo	10 ml	Fonte di energia

Il terreno CN Agar è selettivo per *P. aeruginosa* grazie alla presenza di cetrimide e acido nalidixico, che inibiscono la crescita di gran parte della flora batterica favorendo l'isolamento del microrganismo ricercato.

P. aeruginosa è in grado di produrre diversi pigmenti, tra cui la piocianina, di colore verde-blu, la piorubina, di colore rosso mattone e la pioverdina, di colore giallo-verde fluorescente se osservata sotto luce ultravioletta.

Dopo l'incubazione a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 44 ± 4 ore, le colonie vengono esaminate sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche.

Le colonie fluorescenti di colore verde-blu, dovuto alla produzione di piocianina, sono considerate tipiche e non vengono sottoposte ad ulteriori conferme.

Le colonie di colore giallo-verde fluorescenti o rosso mattone vengono invece sottoposte a test di conferma.

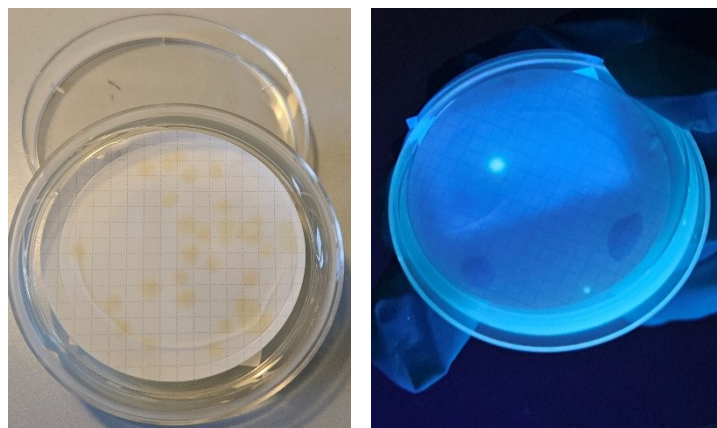


Figura 10: Presunte colonie di P. aeruginosa

Per la conferma, una colonia isolata viene seminata sul terreno generale Triptone Soia Agar (TSA) per ottenere una coltura pura.

Composizione TSA:

Tabella 10: Composizione terreno TSA (Biolife Italiana S.r.l., 2026)

Digerito pancreatico di caseina	15 g	Azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita batterica
Peptone di soia	5 g	Azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita batterica
Sodio cloruro	5 g	Mantenimento equilibrio osmotico
Agar	15 g	Agente solidificante
Acqua purificata	1000 ml	Solvente

Si incuba la subcultura a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 ore. Successivamente, l'identificazione biochimica viene effettuata mediante sistema API 20 NE, specifico per l'identificazione dei batteri Gram-negativi non appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

Dopo aver inumidito la vaschetta di incubazione con 5 mL di acqua distillata, la striscia di API 20 NE viene posizionata al suo interno.

La sospensione batterica viene preparata stemperando una colonia isolata cresciuta su TSA all'interno di una fiala di API NaCl 0,85% Medium da 2 ml fino al raggiungimento di una

torbidità pari a 0,5 McFarland, verificata mediante densitometro. Questa sospensione batterica viene distribuita nelle microprovette per i test da NO₃ a PNPg.

Successivamente vengono trasferiti 200 µl della sospensione batterica da 0,5 McFarland in una fiala di API AUX Medium. Questa seconda sospensione viene utilizzata per riempire le microprovette dei test da GLU a PAC, contrassegnati da un rettangolo, procedendo al riempimento sia della provetta sia della cupola. Infine, per i test GLU, ADH e URE, viene riempita la cupola con olio di paraffina per creare una condizione di anaerobiosi.

La galleria viene incubata a 29°C ± 2°C per 24 ± 2 ore in aerobiosi.

Al termine dell'incubazione si procede alla rivelazione di alcune reazioni mediante l'aggiunta di specifici reattivi.

Nel test NO₃ viene aggiunta una goccia dei reattivi NIT1 e NIT2 per verificare la riduzione dei nitrati dopo 5 minuti. Una colorazione rossa indica reazione positiva, al contrario, l'assenza di colore è indice di reazione negativa ed è quindi necessario aggiungere 2-3 mg di reattivo Zn per verificare l'assenza di riduzione dei nitriti. Dopo 5 minuti, la presenza di colore rosa-rosso indica reazione negativa, invece in caso di incolore viene indicata reazione positiva.

Nel test TRP viene aggiunta una goccia del reattivo JAMES e si osserva immediatamente l'eventuale variazione di colore all'interno della cupola.

L'identificazione viene effettuata mediante l'attribuzione di un codice numerico ottenuto dall'interpretazione delle reazioni positive e negative osservate nei 20 pozzetti, confrontate con una tabella di riferimento. Sulla scheda dei risultati i test sono suddivisi in gruppi di tre e per ognuno è indicato un valore di 1, 2 o 4. La somma dei valori corrispondenti alle reazioni positive per ciascun gruppo genera un codice identificativo di 7 cifre. La prova dell'ossidasi, eseguita mediante strisce di carta impregnate con N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiammina dicloridrato, costituisce il ventunesimo test da registrare sulla scheda dei risultati.

Il codice ottenuto viene inserito all'interno del software APIWEB che consente l'identificazione del microrganismo in base alle sue caratteristiche biochimiche. (BioMérieux, 2019c). (UNI EN ISO 16266, 2008)

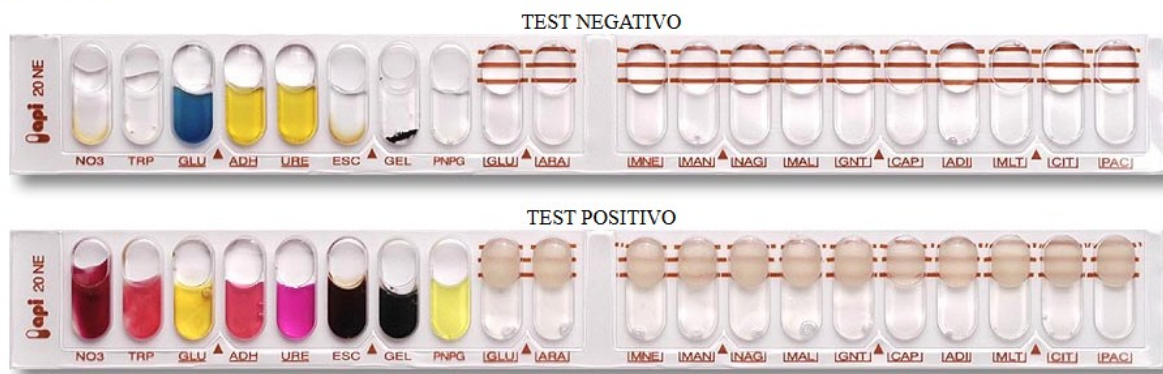


Figura 11: API 20 NE (BioMérieux, 2019c)

3.3.6 Stafilococchi patogeni

Il metodo utilizzato per il rilevamento e la conta degli stafilococchi patogeni nell'acqua destinata al consumo umano è descritto nella norma AFNOR NF T90-412.

La norma applica il metodo della filtrazione su membrana al fine di isolare e identificare gli stafilococchi coagulasi-positivi, tra cui il più noto è *Staphylococcus aureus*. Vengono filtrati 250 mL di campione su una membrana filtrante che viene successivamente posta su Baird-Parker Agar addizionato a plasma di coniglio e fibrinogeno (BP + RPF), ovvero un terreno selettivo e differenziale.

Composizione terreno:

Tabella 11: Composizione terreno BP + RPF (Biolife Italiana S.r.l., 2022a)

Tryptone	10 g	Azoto, carbonio vitamine del gruppo B e minerali per la crescita microbica
Estratto di carne	5 g	Azoto, carbonio vitamine del gruppo B e minerali per la crescita microbica
Estratto di lievito	1 g	Azoto, carbonio vitamine del gruppo B e minerali per la crescita microbica
Sodio piruvato	10 g	Recupero e crescita di <i>S. aureus</i> stressato
Glicina	12 g	Inibitore di microrganismi ad eccezione dei coagulasi-positivi

Litio cloruro	5 g	Inibitore di microrganismi ad eccezione dei coagulasi-positivi
Agar	15 g	Agente solidificante
Fibrinogeno	3,8 g	Substrato per rilevamento enzima coagulasi
Inibitore della tripsina	25 mg	Substrato per rilevamento enzima coagulasi
Plasma di coniglio (EDTA)	25 ml	Substrato per rilevamento enzima coagulasi
Potassio tellurito	215 mg	Inibitore di microrganismi ad eccezione dei coagulasi-positivi
Acqua distillata	975 ml	Solvente

L'incubazione avviene a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 44 ± 4 ore, con prima osservazione delle piastre a 21 ± 3 ore.

Gli stafilococchi coagulasi-positivi producono colonie di colore nero o grigio scuro, derivante dalla riduzione del tellurito di potassio contenuto nel terreno, con la formazione di un caratteristico alone opaco al di sotto della membrana. Quest'ultimo è dovuto all'attività dell'enzima coagulasi che reagisce con il plasma presente nel terreno, trasformando il fibrinogeno in fibrina che, precipitando, determina la formazione dell'alone tipico.

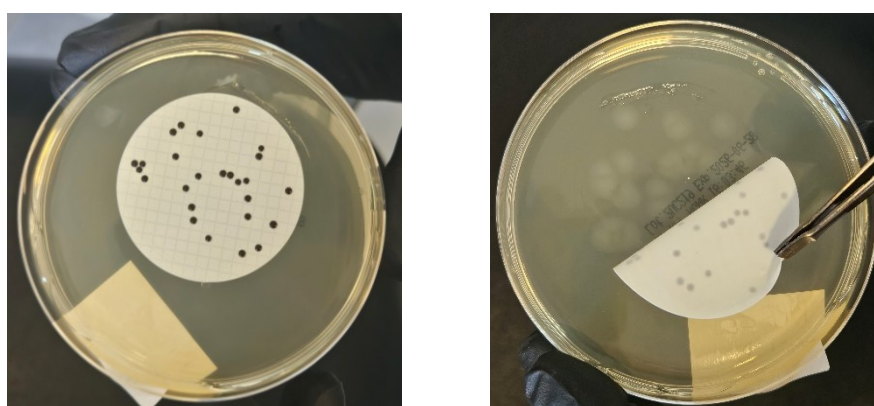


Figura 12: Stafilococchi coagulasi-positivi

La presenza nel terreno dell'RPF consente un'identificazione presuntiva degli stafilococchi coagulasi-positivi, come *S. aureus*, rispetto a quelli coagulasi-negativi, come *S. epidermidis*.

Questi ultimi non possiedono l'enzima coagulasi e non determinano la formazione dell'alone sul terreno.

Le colonie con le caratteristiche tipiche vengono sottoposte ad ulteriori prove di conferma mediante colorazione di Gram e/o test di agglutinazione al lattice.

Una colonia sospetta isolata viene trasferita sul terreno generico TSA (tabella n. 10) per ottenere una coltura pura e successivamente sottoposta alla colorazione di Gram. La tecnica prevede la fissazione del preparato su un vetrino e l'utilizzo sequenziale di coloranti quali cristal-violetto, *Lugol*, decolorante alcolico e safranina. Il principio della colorazione consente di distinguere i batteri Gram-positivi, che trattengono il complesso cristal violetto-iodio e appaiono di colore viola, dai Gram-negativi, che si decolorano e assumono la controcolorazione rosa.

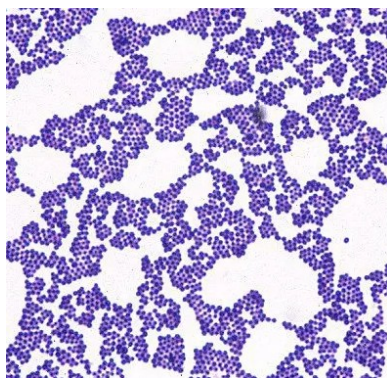


Figura 13: Stafilococchi coagulasi positivi (Centorrino, 2019)

L'identificazione può essere confermata anche tramite il test di agglutinazione al lattice. Tale metodica si basa sull'utilizzo di particelle di lattice di polistirene blu sensibilizzate con fibrinogeno ed IgG. In presenza di stafilococchi con coagulasi legata e/o proteina A si verifica una reazione di agglutinazione entro 20 secondi visibile ad occhio nudo, indicativa di positività. (NF T90-412, 2016)

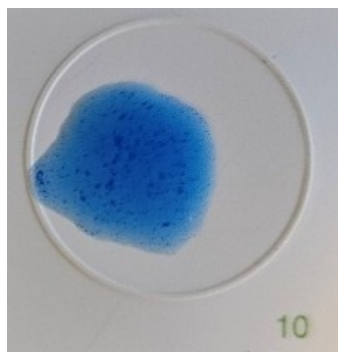


Figura 14: Agglutinazione positiva

3.3.7 *Salmonella* spp.

Per la ricerca di *Salmonella* nelle acque destinate al consumo umano si fa riferimento ai Rapporti ISTISAN 07/05, e in particolare al metodo ISS A 011A, che applica la tecnica della filtrazione su membrana. Si tratta di un parametro poco richiesto per le acque destinate al consumo umano, ma altamente richiesto per le acque superficiali da potabilizzare.

Il metodo prevede una valutazione qualitativa di *Salmonella*, ovvero consente di valutare la presenza o l'assenza in 1 L di campione.

Inizialmente si procede con la fase di pre-arricchimento al fine di rivitalizzare i microrganismi all'interno di un brodo di coltura non selettivo. Viene filtrato 1 L di campione mediante membrane filtranti con pori da 0,45 µm e poste in 100 mL di Acqua Peptonata Tamponata, composta da:

Tabella 12: Composizione Acqua Peptonata Tamponata (Biolife Italiana S.r.l., 2022c)

Peptone	10,0 g	Carbonio, azoto, vitamine e minerali per la crescita microbica
Sodio cloruro	5,0 g	Mantenimento equilibrio osmotico
Disodio idrogeno fosfato anidro	3,5 g	Soluzione tampone
Fosfato di potassio	1,5 g	Soluzione tampone

L'incubazione avviene a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

Successivamente si ha la fase di arricchimento in cui un'aliquota della brodocoltura viene inserita in brodo di Rappaport, in rapporto 1:100, ed incubata a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

Composizione Rappaport:

Tabella 13: Composizione terreno Rappaport (Biolife Italiana S.r.l., 2023c)

Triptone	4,54 g	Carbonio, azoto e oligoelementi per la crescita microbica
Potassio fosfato monobasico	1,45 g	Sistema tampone
Sodio cloruro	7,2 g	Mantenimento equilibrio osmotico

Magnesio cloruro anidro	13,3 g	Riduce tossicità e crea ambiente ipertonico
Verde malachite ossalato	0,036 g	Inibitore di batteri Gram-positivi e molti Gram-negativi
Acqua purificata	1000 ml	Solvente

Un'altra aliquota viene, invece, inserita in brodo alla Selenite, in rapporto 1:100 ed incubata a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ sempre per 18-24 ore.

Composizione Selenite:

Tabella 14: Composizione terreno Selenite (Biolife Italiana S.r.l., 2023d)

Tryptone	5,00 g	Carbonio, azoto e oligoelementi per la crescita microbica
Lattosio	4,00 g	Fornisce energia e mantiene pH neutro
Sodio fosfato bibasico	10,00 g	Soluzione tampone e riduce tossicità
Sodio selenito acido	4,00 g	Inibisce batteri Gram-positivi e molti Gram-negativi
L-cistina	0,01 g	Favorisce crescita di <i>Salmonella</i>

L'impiego combinato del brodo di Rappaport e del brodo alla Selenite consente di aumentare la probabilità di recupero dei diversi sierotipi di *Salmonella*.

La terza ed ultima fase è quella di isolamento, in cui si eseguono strisci delle due brodoculture sul terreno di isolamento Hektoen, per poi essere incubato a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ per 20-24 ore.

Composizione terreno Hektoen:

Tabella 15: Composizione terreno Hektoen (Biolife Italiana S.r.l., 2025b)

Tryptosio	12,0 g	Azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica
Estratto di lievito	3,0 g	Vitamine del gruppo B

Sali biliari n°3	9,0 g	Inibiscono batteri Gram-positivi e molti Gram-negativi
Lattosio	12,0 g	Carboidrato
Saccarosio	12,0 g	Carboidrato fermentabile
Salicina	2,0 g	Carboidrato fermentabile
Sodio Cloruro	5,0 g	Mantenimento equilibrio osmotico
Sodio tiosolfato	5,0 g	Substrato per produzione di idrogeno solforato (H ₂ S)
Ferro ammonio citrato	1,5 g	Indicatore di ferro
Agar	15,0 g	Agente solidificante
Blu di bromotimolo	0,065 g	Indicatore di pH
Fucsina acida	0,1 g	Indicatore di pH
Acqua purificata	1000 ml	Solvente

Le colonie sospette di *Salmonella* appaiono di colore verde o verde-blu e possono presentare centro nero dovuto alla produzione di idrogeno solforato (H₂S). Invece, colonie giallo-arancio con possibile alone derivano dalla fermentazione di lattosio, saccarosio e salicina da parte di batteri coliformi e alcune specie di *Proteus* con produzione di acidi che determinano un viraggio del Blu di bromotimolo.



Figura 15: Presunte colonie di Salmonella (Generon, n.d.)

In caso di crescita delle colonie scure sul terreno di isolamento, si procede a prove di conferma. Per prima cosa si esegue una subcoltura delle colonie sospette su Triptone Soia Agar (TSA) e si incuba a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. Successivamente si esegue il test di agglutinazione e una conferma biochimica mediante test API 20 E.

Per il test di agglutinazione si utilizza un antisiero polivalente per la determinazione degli antigeni somatici (O), flagellari (H) e capsulare (Vi) di *Salmonella*, all'interno del quale si stempera una colonia batterica. La positività si ottiene nel momento in cui si osserva l'agglutinazione tramite la formazione di granuli bianchi.



Figura 16: Test di agglutinazione per l'identificazione di Salmonella (SSI Diagnostica, 2021)

Per il test API si procede inumidendo la vaschetta di incubazione con 5 mL di acqua distillata e si posiziona al suo interno la striscia di API 20 E.

La sospensione batterica viene preparata stemperando una colonia isolata cresciuta su TSA all'interno di una fiala di API Suspendium Medium da 5 ml. La sospensione batterica viene

quindi distribuita nelle 20 microprovette della galleria contenenti substrati disidratati, facendo attenzione a non creare bolle.

Per i CIT, GEL e VP, contrassegnati da un rettangolo, si procede al riempimento sia della provetta sia della cupola. Per i test ADH, LDC, ODC, H₂S e URE, sottolineato da una linea, viene riempita la cupola con olio di paraffina per creare una condizione di anaerobiosi.

La galleria viene incubata a 36°C ± 2°C per 18-24 ore.

Al termine dell'incubazione si procede alla rivelazione di alcune reazioni mediante l'aggiunta di specifici reattivi.

Nel test TDA viene aggiunta una goccia del reattivo TDA. Nel test VP viene aggiunta una goccia del reattivo VP1 e una goccia del reattivo VP2 e si attendono 10 minuti. Infine, nel test IND viene aggiunta una goccia del reattivo JAMES.

L'identificazione viene effettuata mediante l'attribuzione di un codice numerico ottenuto dall'interpretazione delle reazioni positive e negative osservate nei 20 pozzetti, confrontate con una tabella di riferimento. Sulla scheda dei risultati i test sono suddivisi in gruppi di tre e per ognuno è indicato un valore di 1, 2 o 4. La somma dei valori corrispondenti alle reazioni positive per ciascun gruppo genera un codice identificativo di 7 cifre. La reazione di ossidasi, eseguita mediante l'utilizzo di strisce di carta impregnate con N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiammina dicloridrato, costituisce il ventunesimo test di identificazione da annotare sulla scheda dei risultati.

Il codice ottenuto viene inserito all'interno del software APIWEB che consente l'identificazione del microrganismo in base alle sue caratteristiche biochimiche. (BioMérieux, 2019b) (Istituto Superiore di Sanità, 2007)

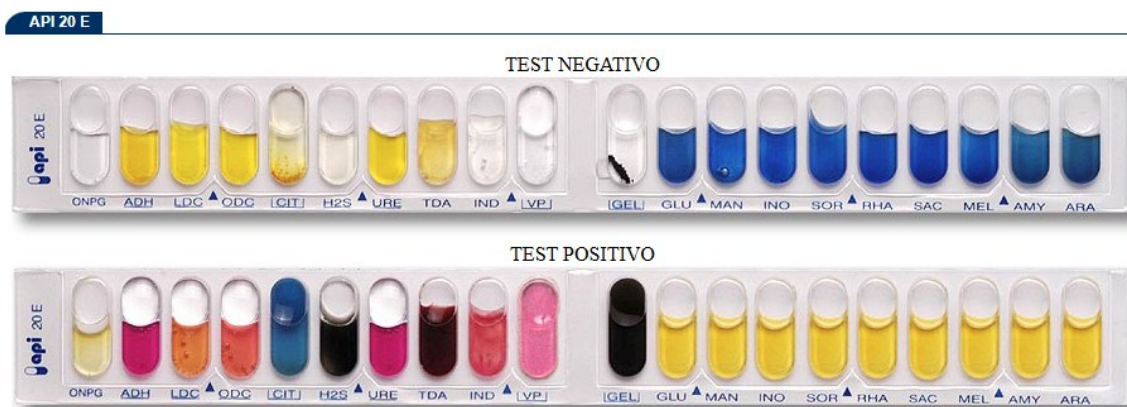


Figura 17: API 20 E (BioMérieux, 2019b)

3.4 Controllo di qualità dei terreni colturali

I terreni colturali utilizzati durante le analisi microbiologiche devono essere sottoposti a controlli di qualità al fine di garantirne l'affidabilità e le prestazioni. Tali controlli vengono eseguiti secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 11133:2020.

Durante le analisi viene eseguito un controllo di sterilità mediante il bianco di processo. Tale controllo consiste nell'applicazione dell'intera procedura analitica utilizzando acqua sterile al posto del campione. Le piastre vengono incubate nelle medesime condizioni previste per i campioni e successivamente osservate per verificare l'assenza di crescita microbica. L'eventuale comparsa di colonie potrebbe infatti indicare una contaminazione del terreno di coltura, della strumentazione utilizzata o delle fasi operative.

All'apertura di ogni nuovo lotto di terreno utilizzato per i test di conferma, viene inoltre eseguito un test di fertilità, finalizzato a verificare la capacità del terreno di supportare la crescita dei microrganismi target. Il controllo viene eseguito inoculando sul terreno un ceppo di riferimento idoneo (ATCC), conservato a -80°C in sistema Cryobank, che dopo l'incubazione deve mostrare le caratteristiche di crescita attese.

Viene inoltre eseguito un test di selettività mediante l'inoculo di un ceppo di controllo negativo, costituito da un microrganismo non target, al fine di verificare l'efficacia dell'azione inibitoria del terreno.

Rimane tuttavia a discrezione del laboratorio la decisione di eseguire ulteriori verifiche prestazionali su terreni acquistati pronti, pur se corredati da certificati di qualità.

I risultati ottenuti permettono di confermare l'idoneità del lotto per il successivo utilizzo nelle analisi microbiologiche. (UNI EN ISO 11133, 2020)

3.5 Espressione dei risultati ed emissione del rapporto di prova

I risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche precedentemente descritte vengono confrontati con i valori limite e le indicazioni presenti nel Decreto Legislativo n. 18/2023.

Per i parametri microbiologici richiesti nella parte A dell'allegato I del Decreto, quali *Escherichia coli* ed Enterococchi, è richiesta l'assenza in 100 mL. Il dato negativo viene quindi indicato come zero.

Tra i parametri indicatori presenti nella parte C1 dell'allegato I del decreto sono presenti il conteggio delle colonie a 22°C, per cui è richiesta l'assenza di variazioni anomale e per cui il dato negativo viene indicato come <1, e Batteri coliformi e *Clostridium perfringens* per cui è richiesta l'assenza in 100 ml e quindi il dato negativo è indicato come zero.

Sulla base dell'Articolo 15 del D. Lgs. 18/2023 relativo ai "Provvedimenti correttivi e limitazioni d'uso", in presenza di un superamento limite, di uno o più parametri riportati nell'Allegato I parte A, viene inviata al committente immediata comunicazione di campione non conforme senza considerare l'incertezza di misura, che può essere riportata sul rapporto di prova su richiesta del committente.

In presenza di superamento dei valori di parametro presenti nell'Allegato I parte C, il decreto stabilisce la necessità di valutare se ciò costituisce un rischio per la salute umana e adottare provvedimenti conseguenti.

In particolare, per il conteggio delle colonie a 22°C, si deve esprimere il risultato tenendo conto dell'incertezza di misura, ovvero un parametro associato al risultato che descrive la dispersione dei valori attribuibili al misurando. Infatti, l'incertezza di misura tiene conto di due fattori: la varianza intrinseca di distribuzione rappresentata dalla distribuzione di Poisson, che indica la variabilità associata alla distribuzione di particelle nella sospensione, e la varianza operativa che racchiude tutte le incertezze associate alla fase analitica. (UNI EN ISO 29201, 2012)

In questo caso, le regole decisioni adottate sull'utilizzo dell'incertezza prevedono che venga fatta una segnalazione al committente quando il limite inferiore supera il valore di riferimento fissato a 100 UFC/mL, come indicato nelle Linee Guida della Regione Piemonte. (Arpa Piemonte, 2023)

Per tutti gli altri parametri che possono essere richiesti in aggiunta, come *Pseudomonas aeruginosa*, Stafilococchi patogeni e *Salmonella* spp., non è richiesto un valore di parametro uguale a zero e pertanto il risultato negativo viene indicato come <1, specificando l'unità di misura.

I risultati costituiscono la base per l'emissione del Rapporto di Prova, un documento ufficiale che certifica i risultati di tutte le analisi, chimiche e biologiche, eseguite sul campione. Vengono riportate le informazioni indicative del campione, i metodi utilizzati specificando quali sono accreditati e quali no, i risultati analitici, la dichiarazione di conformità e la regola decisionale adottata se non è riportata sulla normativa di riferimento.

3.6 Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati ottenuti dalle analisi microbiologiche svolte nel laboratorio è stata effettuata utilizzando il programma RStudio, un'interfaccia grafica che consente di utilizzare il software statistico R per eseguire analisi statistiche avanzate, gestire i dataset ed elaborare dati e grafici.

I risultati ottenuti dalle analisi sono stati inseriti all'interno di un dataset creato in modo da avere le unità statistiche (i campioni) sulle righe e le variabili di interesse nelle colonne. Tra le variabili di interesse rientrano le informazioni relative al campionamento (data, punto di campionamento e ASL) e i parametri ricercati.

Per ogni parametro è stata creata una variabile binaria, nella quale il valore 1 indica la non conformità del campione e il valore 0 indica la conformità.

Al fine di rendere i dati idonei alle successive analisi statistiche, i valori espressi come superiori a 100 UFC/volume e superiori a 300 UFC/volume sono stati convertiti rispettivamente nei valori numerici 101 e 301. Analogamente, i valori indicati come inferiori a 1, laddove previsti dalla normativa di riferimento, sono stati convertiti in valore 0.

Tale riorganizzazione dei dati ha consentito l'applicazione di test statistici specifici, calcoli matematici e rappresentazioni grafiche al fine di interpretare i risultati ottenuti. In particolare, l'analisi statistica è stata effettuata al fine di determinare la frequenza di campioni non conformi, sia complessivamente sia per singolo parametro e verificare l'eventuale presenza di relazioni significative tra le non conformità dei campioni e la stagionalità.

3.6.1 Statistica descrittiva

L'analisi statistica descrittiva è stata effettuata per comprendere al meglio le caratteristiche principali del dataset in esame e fornire una rappresentazione grafica della distribuzione delle variabili.

Sono state calcolate le frequenze assolute e relative dei campioni non conformi, sia complessivamente sia per singolo parametro microbiologico, e successivamente anche in relazione alla stagionalità.

Per le variabili quantitative, invece, sono stati calcolati gli indici di tendenza centrale, che permettono di individuare il valore attorno al quale si distribuiscono i dati, e gli indici di

dispersione, che descrivono il grado di variabilità e la dispersione dei dati rispetto al valore centrale.

In particolare, tra gli indici di tendenza centrale sono state misurate la media e la mediana, quest'ultima intesa come il valore centrale che divide la serie ordinata dei dati in due parti uguali.

Gli indici di dispersione valutati includono la deviazione standard, che misura la dispersione dei dati rispetto alla media, il valore massimo, il valore minimo e l'intervallo interquartile, che rappresenta la dispersione dei dati compresi tra il primo e il terzo quartile (25° e 75° percentile).

Successivamente, sono state realizzate rappresentazioni grafiche al fine di descrivere in modo più efficace la distribuzione dei dati e osservare eventuali relazioni tra le variabili.

3.6.2 Test statistici

Per valutare l'eventuale associazione tra la frequenza dei campioni non conformi e la variabili esplicativa di interesse (stagione di campionamento) è stato utilizzato il test del Chi-Quadrato di Pearson. Si tratta di un test statistico che permette di valutare l'eventuale relazione tra due variabili categoriche, confrontando le frequenze osservate con quelle attese in condizioni di indipendenza. Il test risulta essere particolarmente adeguato in presenza di un'elevata numerosità campionaria.

L'ipotesi nulla di partenza (H_0) rappresenta l'indipendenza tra le due variabili in esame, mentre l'ipotesi alternativa (H_1) prevede l'esistenza di un'associazione statisticamente significativa. I risultati vengono valutati in base al valore del p -value, che rappresenta la probabilità che i risultati osservati siano dovuti al caso, assumendo vera l'ipotesi nulla di indipendenza. Generalmente, si assume un livello di significatività (α) pari a 0.05, pertanto l'ipotesi nulla viene rifiutata quando il p -value risulta inferiore a 0.05, indicando la presenza di un'associazione statisticamente significativa tra le variabili. Al contrario, per valori di p -value superiore a 0.05 non vi sono evidenze sufficienti per rifiutare l'ipotesi nulla di indipendenza.

Il test del Chi-quadro può risultare inaccurato in presenza di frequenze attese molto basse, aumentando il rischio di rigettare l'ipotesi nulla pur essendo vera. In presenza di frequenze attese inferiori a 5, è stato quindi utilizzato il Test Esatto di Fisher, che calcola il valore esatto di p -value senza ricorrere ad approssimazioni.

Per stimare l'effetto della variabile esplicativa sulla probabilità di osservare una non conformità è stata inoltre applicata una regressione logistica binaria penalizzata secondo Firth. Tale approccio è indicato in presenza di eventi rari e categorie con ridotta numerosità.

I coefficienti stimati del modello, sono stati successivamente trasformati in Odds Ratio (OR), mediante la funzione esponenziale.

L'OR, o "rapporto crociato", consente di valutare la forza dell'associazione tra le variabili esplicative e la non conformità dei campioni. Un valore di OR pari a 1 indica assenza di associazione tra le variabili; valori superiori a 1 indicano una maggiore probabilità di osservare una non conformità nel gruppo considerato, mentre valori compresi tra 0 e 1 indicano una probabilità ridotta. È stato inoltre calcolato l'intervallo di confidenza al 95% dell'Odds Ratio (95% CI) che fornisce una misura della precisione della stima ottenuta. Un intervallo di confidenza stretto è indice di una stima precisa, mentre un intervallo che comprende il valore 1 indica un'associazione non statisticamente significativa.

Per confrontare, invece, i gruppi stagionali in relazione ai valori dei singoli parametri microbiologici nei soli campioni risultati positivi, è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis. La scelta del test è stata effettuata dopo la verifica delle assunzioni di normalità ed omoschedasticità, rispettivamente mediante il test di Shapiro-Wilk e il test di Bartlett, che hanno evidenziato valori di $p\text{-value} < 0.05$, indicando la non normalità dei dati e la non omogeneità delle varianze.

Il test di Kruskal-Wallis è un test non parametrico basato sul confronto dei ranghi tra i gruppi ed è considerato l'equivalente non parametrico dell'ANOVA ad una via. L'ipotesi nulla (H_0) prevede l'assenza di differenze tra i gruppi stagionali, mentre l'ipotesi alternativa (H_1) prevede che almeno un gruppo presenti una distribuzione diversa rispetto agli altri. In presenza di risultati statisticamente significativi, si rifiuta l'ipotesi nulla di uguaglianza tra i gruppi e si procede all'applicazione dei test post-hoc di Dunn con correzione di Bonferroni, ovvero confronti a coppie tra i gruppi, al fine di individuare in modo più specifico tra quali stagioni si osservano differenze statisticamente significative.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Una prima analisi è stata condotta utilizzando i dati ottenuti da 3147 campioni di acqua destinata al consumo umano prelevati nell'intera provincia di Torino dalle 9 ASL territorialmente competenti e analizzati nell'anno 2025 presso il Laboratorio Specialistico Strumentale Nord Ovest dell'ARPA Piemonte, con sede a Grugliasco. La scelta del periodo di studio deriva dalla volontà di analizzare un intero anno solare, in modo da ottenere una panoramica complessiva dell'andamento dei risultati e comprendere l'intera successione stagionale.

Una seconda analisi ha invece previsto il confronto tra i dati relativi al primo semestre del 2025 e quelli relativi allo stesso periodo del 2026, corrispondente ad una parte del periodo di internato di tesi.

Poiché i dati provengono dal laboratorio di ARPA Piemonte, tutte le informazioni identificative sono state rese anonime mediante codici alfanumerici. Inoltre, il dataset utilizzato per le analisi è stato ottenuto escludendo i risultati relativi ai controlli di qualità interlaboratorio, in quanto non rappresentativi dei campioni provenienti dal territorio e potenzialmente in grado di introdurre bias nell'analisi.

4.1 Valutazione delle non conformità

Come illustrato nei capitoli precedenti, il Decreto Legislativo 18/2023 introduce il criterio dell'assenza dei microrganismi riportati nell'Allegato I, parti A e C. Fa eccezione il parametro del conteggio delle colonie a 22°C per il quale il decreto considera elemento probante la mancanza di variazioni anomale rispetto ai valori normalmente riscontrati.

Un campione viene classificato come **“non conforme”** qualora presenti la positività di almeno uno dei parametri microbiologici per i quali è richiesta l'assenza. Nel caso del conteggio delle colonie a 22°C e degli altri parametri per i quali la normativa non stabilisce un limite di assenza, un risultato diverso da zero comporta l'emissione di una **“segnalazione”** al committente, affinché l'ASL competente possa effettuare una valutazione del potenziale rischio per la salute umana. Questo principio è stato utilizzato nell'analisi dei dati.

Dall'analisi dell'intero dataset è emerso che, sui 3147 campioni analizzati, 124 (3,94%) sono risultati non conformi ai requisiti microbiologici previsti nell'Allegato I parte A del Decreto Legislativo 18/2023, mentre i restanti 3023 (96,06%) sono risultati conformi.

I campioni non conformi sono stati successivamente distinti in base alla tipologia di contaminazione rilevata. In particolare, sono state definite non conformità presumibilmente di origine ambientale quelle caratterizzate dalla presenza esclusiva di batteri coliformi, riscontrate in 76 campioni. Le restanti non conformità sono state invece classificate come non conformità fecali, in quanto caratterizzate dalla presenza di *Escherichia coli* e/o Enterococchi intestinali, indicatori di contaminazione di origine fecale. (Figura 18)

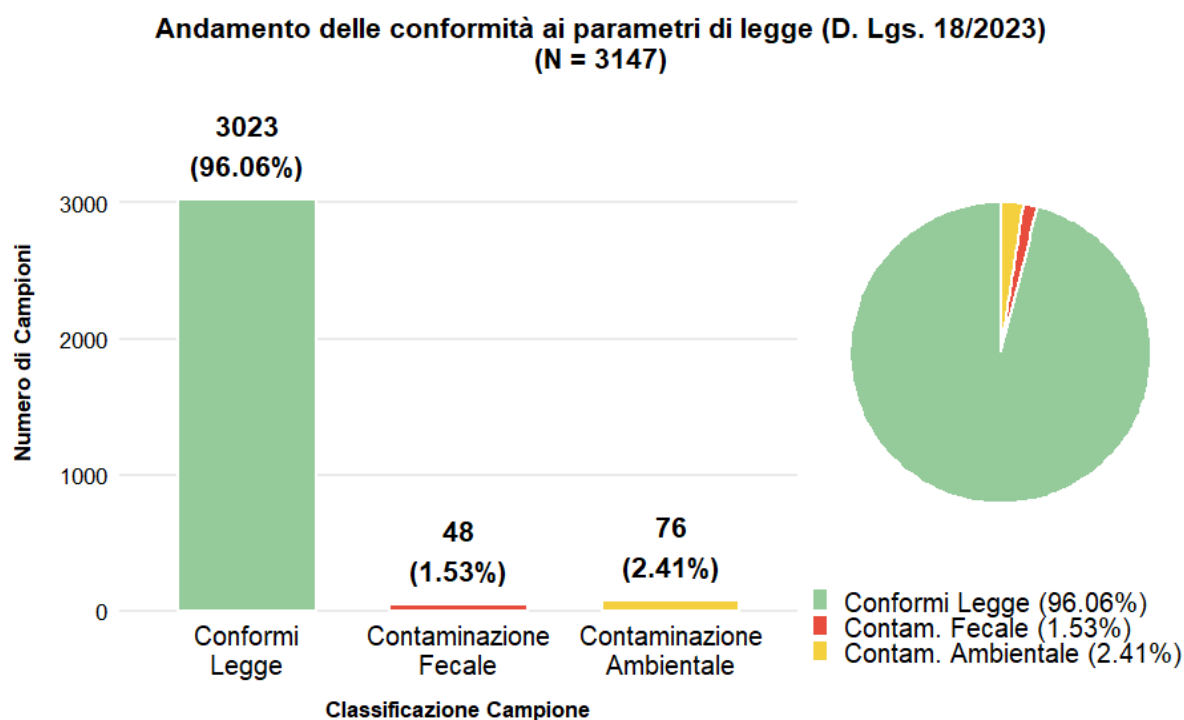


Figura 18: Distribuzione dei campioni conformi e non conformi con classificazione delle non conformità in relazione alla rispettiva origine

Nel complesso, la percentuale di campioni conformi (96,06%) suggerisce che le acque destinate al consumo umano della provincia di Torino presentano, nel periodo considerato, un buon livello di qualità microbiologica.

La situazione epidemiologica delineatasi appare pertanto soddisfacente, considerato il significato rivestito dal “substrato acqua destinata al consumo umano” in particolare secondo la configurazione proposta dalla recente legislazione in vigore.

Nel totale dei campioni analizzati, 2905 comprendono tra i parametri richiesti anche il conteggio delle colonie a 22°C e ulteriori parametri microbiologici aggiuntivi, come riportato a seguire.

Complessivamente, per 35 campioni è stata emessa una segnalazione al committente a seguito del superamento del valore di riferimento per la conta delle colonie a 22°C (>100 UFC/mL, stabilito dalle Linee Guida della Regione Piemonte) e/o della positività degli altri parametri aggiuntivi. (Figura 19)

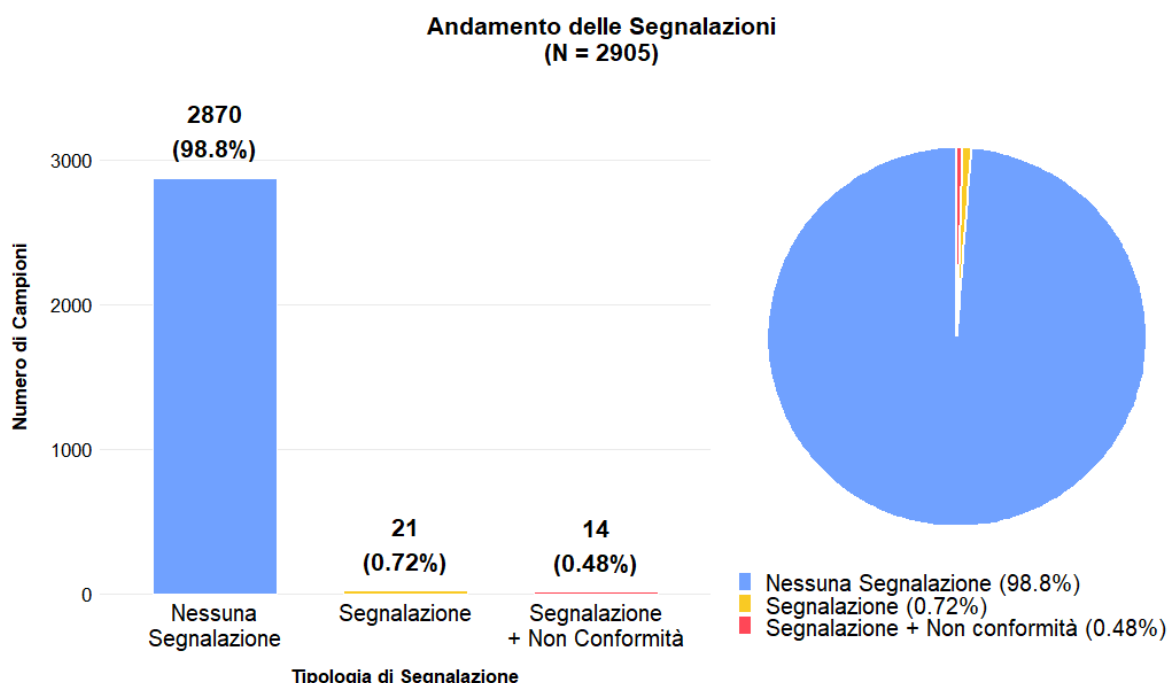


Figura 19: Distribuzione dei campioni senza segnalazioni e con segnalazioni

Come evidenziato nella Figura 19, la maggior parte dei campioni analizzati non ha mostrato criticità rilevanti.

Tra le 35 segnalazioni complessive registrate, la distribuzione evidenzia che per 21 campioni è stata emessa esclusivamente una segnalazione, non presentando ulteriori positività per i parametri microbiologici previsti dal Decreto. Tale risultato suggerisce un possibile incremento della normale microflora ambientale che deve essere esaminata dalle ASL competenti al fine di escludere variazioni anomale, ma non sono evidenti contaminazioni fecali.

Nei restanti 14 campioni, invece, alla segnalazione è stata associata contestualmente anche una non conformità di almeno uno dei parametri previsti dalla parte A dell'Allegato I, indicando un quadro microbiologico complessivamente alterato.

Per comprendere quali parametri microbiologici abbiano contribuito maggiormente alle non conformità e alle segnalazioni osservate, è stata analizzata la frequenza di positività di ciascun parametro rispetto al numero di richieste (Tabella 16).

Tabella 16: Frequenza percentuale delle positività dei singoli parametri in relazione al numero di richieste

PARAMETRO	POSITIVI	RICHIESTA	% POSITIVITÀ
<i>E. coli</i>	28	3146	0,89%
Enterococchi	34	3133	1,09%
Coliformi	120	3146	3,81%
CBT 22°C	31	2898	1,07%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	70	5,71%
<i>Clostridium perfringens</i>	0	89	0%
<i>Salmonella spp.</i>	0	2	0%
Stafilococchi patogeni	0	1	0%

Dalla tabella 16 emerge che il parametro con maggiore frequenza di positività è rappresentato dai batteri coliformi, con un tasso di positività pari al 3.81%. Il tasso di positività di *Pseudomonas aeruginosa* risulta essere relativamente elevato (5.71%), ma tale valore, comunque da valutarsi in relazione al numero limitato di richieste di analisi (70 richieste), va correttamente ricollegato al significato microbiologico ed epidemiologico della specie batterica *P. aeruginosa*, sostanzialmente ubiquitaria oltre che persistente. Inoltre, nel substrato acqua destinata al consumo umano il significato di tale tipologia microbica può essere delineato in termini di mancata protezione. Questo parametro non rappresenta uno dei principali motivi di segnalazione.

Osservando la frequenza di richiesta riportata nella tabella 16 per ogni parametro, è possibile evidenziare come il monitoraggio microbiologico rispecchi l'impostazione introdotta dal Decreto Legislativo 18/2023. In particolare, il numero di richieste relative a *E. coli* ed Enterococchi intestinali risulta omogeneo vista l'importanza a loro attribuita come indicatori di

contaminazione fecale. Nel Decreto Legislativo 31/2001, infatti, la loro determinazione era prevista con frequenze differenti a seconda che si trattasse di controllo di routine o di verifica.

Si osserva inoltre un'elevata frequenza di richiesta della conta delle colonie a 22°C, in quanto rappresenta un utile e immediato indicatore della qualità microbiologica dell'acqua e dell'efficienza della gestione della rete idrica.

Al contrario, si evidenzia una frequenza limitata di richiesta per gli stafilococchi patogeni, *P. aeruginosa* e *Salmonella* spp, coerente con il fatto che tali parametri vengono richiesti solo in particolari monitoraggi o a seguito di specifiche esigenze di controllo.

Per quanto riguarda *C. perfringens* si evidenzia una frequenza di richiesta leggermente superiore rispetto ad altri parametri non inclusi tra i principali indicatori microbiologici. Infatti, è stato inserito nella parte C dell'Allegato I per la sua capacità di formare spore altamente resistenti nell'ambiente, rendendolo un indicatore utile per evidenziare contaminazioni pregresse o persistenti.

Oltre alla valutazione della prevalenza dei microrganismi, è stata eseguita un'analisi descrittiva delle variabili quantitative, calcolando gli indici di tendenza centrale e gli indici di dispersione esclusivamente sui campioni risultati positivi (Tabella 17).

Tabella 17: Analisi descrittiva delle concentrazioni microbiche

Parametro	N° positivi	Min	1° Quartile	Mediana	Media	3° Quartile	Max	Dev. Standard
<i>E. coli</i>	28	1	1.0	2.0	6.0	4.3	55	10.9
Enterococchi	34	1	1.0	2.5	6.4	5.0	101	17.1
Coliformi	120	2	6.0	12.5	26.6	32.5	101	30.1
CBT 22°c	31	124	165.5	301.0	241.5	301.0	301	69.0
<i>P. aeruginosa</i>	4	2	2.8	6.5	29.0	32.8	101	48.1

I dati riportati nella tabella evidenziano un'elevata variabilità delle cariche microbiologiche tra i campioni risultati positivi.

Per quanto riguarda i parametri microbiologici *E. coli* ed Enterococchi, la maggior parte delle positività è caratterizzata da cariche basse. La mediana, che rappresenta il valore centrale che divide la serie ordinata dei dati in due parti uguali indicando quindi entro quale valore si trova il 50% dei risultati, mostra valori estremamente contenuti (rispettivamente 2.0 UFC e 2.5 UFC). Inoltre, anche il 3° quartile conferma che nel 75% dei campioni risultati positivi alle analisi le cariche rimangono entro valori bassi (4.3 UFC e 5.0 UFC). Per entrambi i parametri, si osserva però un'elevata asimmetria positiva della distribuzione dei dati, determinata da picchi isolati che causano un aumento del valore medio in confronto con le mediane. Questo è inoltre confermato dall'elevato valore della deviazione standard, che misura la dispersione dei dati rispetto alla media (figura 20).

Nonostante i valori contenuti, però, è importante sottolineare come la presenza nell'acqua destinata al consumo umano di microrganismi indicatori di contaminazione fecale rappresenta una condizione di potenziale rischio per la salute del consumatore, confermando l'adeguata impostazione del provvedimento di cui si tratta.

Un comportamento analogo si può osservare per i batteri coliformi, che presentano però un andamento della carica più elevato, con la mediana corrispondente a 12.5 UFC. Livelli di carica più elevati possono però essere associati alla presenza di ceppi di origine ambientale e non strettamente fecale, come si può anche notare dal numero più elevato di positività rispetto a *E. coli*, che viene ricercato mediante lo stesso metodo analitico e sullo stesso terreno di coltura.

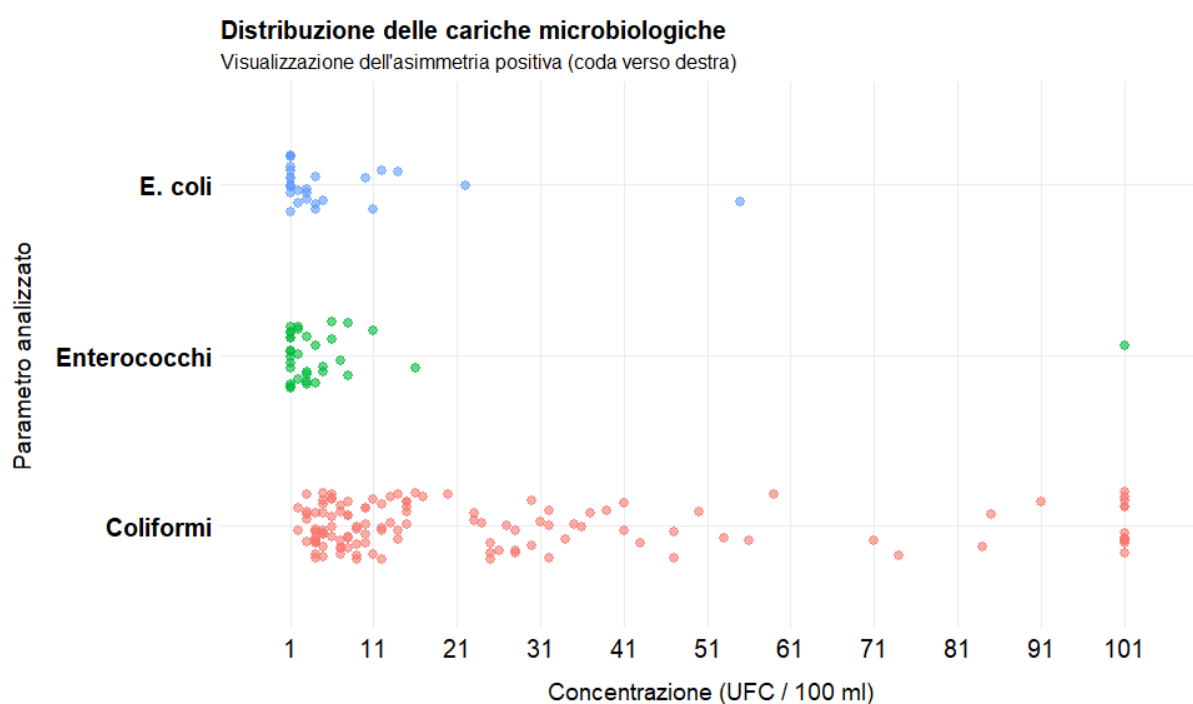


Figura 20: Distribuzione cariche microbiologiche (*E. coli*, Enterococchi e Coliformi) con asimmetria positiva

Un andamento diverso si può notare per la conta delle colonie a 22°C, infatti la distribuzione presenta un'asimmetria opposta rispetto ai casi precedenti in quanto la media è inferiore alla mediana, con quest'ultima che vale 301 come il 3° quartile e il massimo (figura 21). Questi valori derivano dalla presenza di un elevato numero di campioni, in particolare 16 su 31 positivi, che presentano una carica >300 UFC/mL (quantificata per le analisi come 301 UFC). Va specificato però che la “positività” del parametro si ha nel momento in cui anche il limite inferiore dell'intervallo di incertezza supera il valore di riferimento di 100 UFC/mL indicato nelle Linee Guida della Regione Piemonte, e questo si ha nel momento in cui si riscontrano più di 121 UFC.

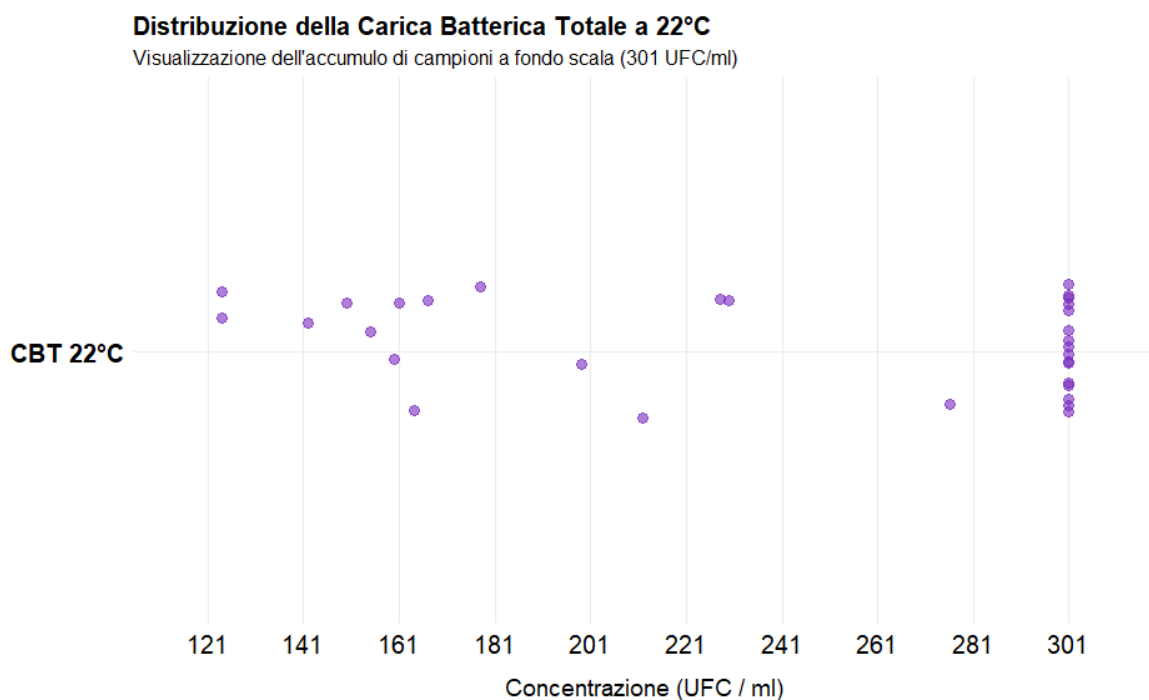


Figura 21: Distribuzione carica batterica a 22°C

Per quanto riguarda parametri aggiuntivi, solo *P. aeruginosa* ha mostrato positività, in particolare in 4 campioni (3 pozzi e 1 casetta dell'acqua). In questo caso si osservano valori di media e deviazione standard elevati (rispettivamente 29 UFC e 48.13 UFC) in seguito alla presenza di un picco isolato di carica >100 UFC (quantificato per le analisi come 101 UFC). Per i parametri di *C. perfringens*, *Salmonella* spp. e stafilococchi patogeni non sono stati riscontrati casi di positività.

4.2 Valutazione dell'andamento stagionale delle non conformità

I campioni analizzati nell'anno 2025 sono stati classificati in base alla stagione del prelievo in inverno (dicembre, gennaio e febbraio), primavera (marzo, aprile e maggio), estate (giugno, luglio e agosto) e autunno (settembre, ottobre e novembre).

Per ogni stagione è stato calcolato il numero di positivi e il relativo tasso di positività come mostrato nella tabella 18.

Tabella 18: Andamento stagionale dei campioni analizzati nell'anno 2025

	INVERNO	PRIMAVERA	ESTATE	AUTUNNO
N° positivi	5	26	55	38
N° negativi	429	851	898	845
% positività	1.15 %	2.96 %	5.77 %	4.30 %

I dati mostrano un aumento della frequenza di campioni non conformi dalla stagione invernale fino all'estate, passando da un tasso di positività dell'1.15% in inverno, al 2.96% in primavera e raggiungendo il valore massimo del 5.77% durante l'estate. I valori iniziano poi a diminuire con l'autunno in cui si registra un tasso di positività del 4.30%.

L'andamento crescente è stato rappresentato graficamente mediante un grafico a barre che riporta la percentuale di campioni non conformi nelle diverse stagioni (Figura 22).

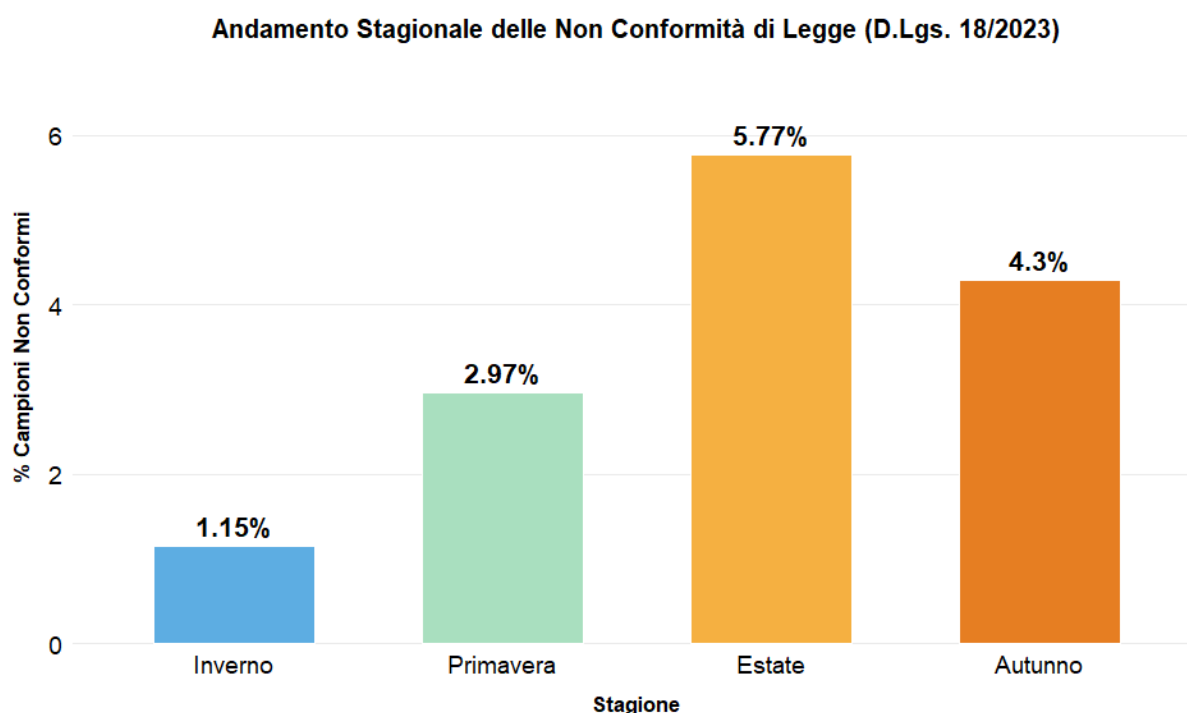


Figura 22: Andamento stagionale delle non conformità ai sensi del D. Lgs. 18/2023

L'andamento stagionale delle non conformità è stato verificato anche mediante il Test del Chi-quadro di Pearson al fine di valutare l'ipotesi che la presenza di non conformità nei campioni sia dipendente dalla stagione. Il test ha mostrato un'associazione statisticamente significativa tra le due variabili con un p-value inferiore a 0.05.

Al fine di quantificare la forza di questa associazione, è stata eseguita un'analisi di regressione logistica penalizzata di Firth impostando la stagione "inverno" come categoria di riferimento (baseline). I risultati sono riportati nella Tabella 19.

Tabella 19: Odds Ratio (OR), intervallo di confidenza al 95% (95% CI) e p-value delle non conformità nelle diverse stagioni rispetto all'inverno (baseline) stimati mediante regressione logistica penalizzata di Firth

	PRIMAVERA	ESTATE	AUTUNNO
OR (95% CI)	2.43 (1.04 – 6.85)	4.82 (2.18 – 13.19)	3.56 (1.57 – 9.85)
p-value	0.040 *	< 0.001 *	0.001 *

* valore statisticamente significativo

Il modello ha evidenziato un aumento statisticamente significativo della probabilità di osservare una non conformità rispetto all'inverno in tutte le altre stagioni. In particolare, il rischio risulta circa 2.4 volte superiore in primavera (OR = 2.43, 95%CI [1.04, 6.85]), quasi 5 volte superiore in estate (OR = 4.82, 95%CI [2.18, 13.19]) e quasi 4 volte superiore in autunno (OR = 3.56, 95%CI [1.57, 9.85]).

In seguito, è stata eseguita una valutazione dei singoli parametri microbiologici di interesse, quali *Escherichia coli*, Enterococchi e Batteri coliformi, al fine di verificare la presenza di eventuali variazioni stagionali sia nella prevalenza della contaminazione (conformità/non conformità del parametro) sia nel valore quantitativo del parametro (UFC/100mL) osservata nei campioni positivi.

La figura 23 mostra il tasso di positività percentuale di ogni parametro nelle diverse stagioni dell'anno. Da una prima valutazione descrittiva, il grafico evidenzia una tendenza generale all'incremento delle positività nei mesi caldi con picchi massimi registrati durante la stagione estiva per tutti e tre i microrganismi monitorati.

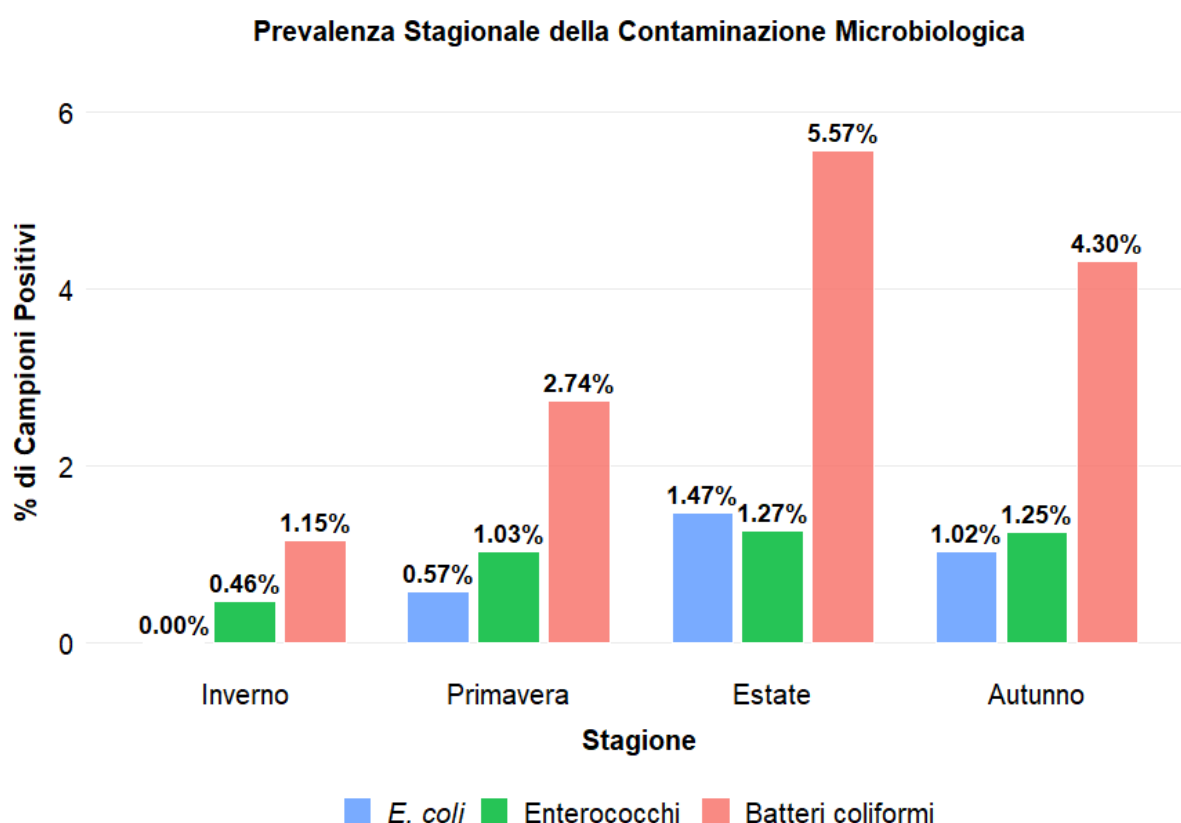


Figura 23: Prevalenza stagionale della contaminazione microbiologica per *E. coli*, Enterobatteri e Batteri coliformi

Per confermare l'andamento osservato nel grafico, è stato utilizzato il test del Chi-quadro, qualora le frequenze attese risultassero maggiori di 5, o in alternativa il test esatto di Fisher, al fine di verificare la presenza di un'associazione statisticamente significativa tra le due variabili in esame. Il test ha evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra la stagionalità e la positività per *E. coli* e per i Batteri coliformi, mentre per gli Enterococchi non è stata osservata alcuna associazione significativa.

Successivamente, è stato utilizzato il modello di regressione logistica penalizzata di Firth, utilizzando l'inverno come categoria di riferimento, i cui risultati sono riportati nella Tabella 20.

Tabella 20: Odds Ratio (OR), intervallo di confidenza al 95% (95% CI) e p-value delle non conformità di E. coli, Enterococchi e Coliformi nelle diverse stagioni rispetto all'inverno (baseline) stimati mediante regressione logistica penalizzata di Firth

	OR (95% CI)		
	p-value		
	PRIMAVERA	ESTATE	AUTUNNO
<i>E. Coli</i>	5.48 (0.62 – 719.73) 0.148	13.43 (1.79 – 1717.21) 0.005 *	9.44 (1.19 – 1218.04) 0.029 *
Enterococchi	1.89 (0.53 – 9.94) 0.343	2.30 (0.68 – 11.79) 0.192	2.27 (0.67 – 11.75) 0.203
Coliformi	2.24 (0.95 – 6.35) 0.07	4.64 (2.09 – 12.71) 0.0006 *	3.56 (1.57 – 9.85) 0.001 *

* valore statisticamente significativo

Per *Escherichia coli* il modello ha evidenziato un aumento statisticamente significativo della probabilità di rilevare un campione positivo durante l'estate (OR = 13.43, 95%CI [1.79, 1717.21]) e l'autunno (OR = 9.44, 95%CI [1.19, 1218.04]) rispetto all'inverno. Il confronto tra primavera e inverno non ha invece raggiunto la significatività statistica, indicando l'assenza di un aumento significativo di campioni non conformi durante la stagione primaverile. L'assenza di campioni non conformi nella stagione utilizzata come riferimento determina una maggiore incertezza nella stima dell'OR, come evidenziato dagli ampi intervalli di confidenza.

Per quanto riguarda i Batteri coliformi, il modello ha confermato la forte associazione tra l'aumento delle non conformità e la stagione. Infatti, la probabilità di osservare un campione

positivo aumenta in maniera significativa durante la stagione estiva, arrivando a valori di quasi 5 volte superiori rispetto all'inverno (OR = 4.64, 95%CI [2.09, 12.71]). Tale rischio si mantiene elevato anche in autunno, registrando valori di quasi 4 volte superiori in confronto al periodo invernale. (OR = 3.56, 95%CI [1.57, 9.85]). Al contrario, il confronto tra primavera e inverno non ha evidenziato differenze statisticamente significative.

Per gli Enterococchi, il modello conferma l'assenza di un'associazione statisticamente significativa tra l'andamento delle non conformità e la stagionalità, già evidenziato dal test esatto di Fisher. Sebbene gli OR mostrino un lieve incremento rispetto alla stagione invernale, nessun confronto a coppie tra le stagioni raggiunge la significatività statistica (p-value > 0.05) ed inoltre gli intervalli di confidenza al 95% includono al loro interno il valore 1, indice di un'assenza di significatività. La frequenza delle positività per gli Enterococchi rimane quindi stabile durante tutto l'anno.

Successivamente è stata eseguita un'analisi descrittiva delle cariche microbiche esclusivamente nei campioni risultati positivi. Su tali campioni è stato applicato il test non parametrico di Kruskal-Wallis al fine di valutare eventuali differenze nella distribuzione delle cariche microbiologiche tra le stagioni. I risultati sono riportati nella Tabella 21.

Tabella 21: Analisi descrittiva stagionale delle cariche microbiologiche nei campioni positivi e risultati del test di Kruskal-Wallis

	Stagione	N° positivi	IQR (Q1-Q3)	Mediana	Min - Max
<i>E. COLI</i>	Primavera	5	1.0 – 10.0	4.0	1 – 12
	Estate	14	1.0 – 3.8	1.0	1 – 14
	Autunno	9	2.0 – 4.0	3.0	1 – 55
p-value	0.321				
ENTEROCOCCHI	Inverno	2	4.8 – 12.3	8.5	1 – 16
	Primavera	9	1.0 – 4.0	2.0	1 – 8
	Estate	12	1.0 – 4.3	2.5	1 – 6
	Autunno	11	1.0 – 6.0	3.0	1 – 101
p-value	0.882				

COLIFORMI	Inverno	5	8.0 – 32.0	10.0	5 – 101
	Primavera	24	4.8 – 36.5	12.0	2 – 101
	Estate	53	6.0 – 27.0	12.0	2 – 101
	Autunno	38	7.0 – 41.5	19.0	4 – 101
p-value	0.554				

Si osservano alcune differenze nei valori mediani delle cariche microbiologiche tra le stagioni, tuttavia il test di Kruskal-Wallis non ha evidenziato differenze significative nella distribuzione delle cariche microbiologiche per nessuno dei tre parametri analizzati ($p\text{-value} > 0.05$). L'assenza di differenze significative può suggerire che, in presenza di una contaminazione, il valore di UFC non varia in modo evidente tra le stagioni. Tale risultato può essere influenzato anche dalla ridotta numerosità dei campioni positivi in alcune stagioni e dall'elevata variabilità delle concentrazioni osservate.

L'andamento osservato può quindi essere determinato dall'innalzamento della temperatura ambientale che, tra l'altro, può causare un maggiore sviluppo di biofilm all'interno dei sistemi di distribuzione. (Fira-Mladinescu et al., 2026)

Inoltre, il calore accelera la degradazione del cloro residuo, uno dei principali mezzi utilizzati per il controllo microbico all'interno della rete idrica, riducendone l'efficacia disinfettante. (Limaheluw & van der Aa, 2025)

Di conseguenza, nei mesi più caldi si rende necessario un monitoraggio più approfondito al fine di prevenire i superamenti dei limiti di legge e garantire la sicurezza per la salute umana: ciò ovviamente anche da riferire al consumo di acqua notevolmente accentuato per le condizioni climatiche.

4.3 Valutazione dell'andamento stagionale delle segnalazioni per la conta delle colonie a 22°C

Per il parametro della conta delle colonie a 22°C è stata eseguita una valutazione dell'andamento stagionale separata dagli altri parametri, in quanto si tratta di un indicatore e non costituisce una non conformità ai sensi del D. Lgs. 18/2023.

Per ogni stagione è stato calcolato il numero di campioni positivi (per cui è stata emessa una segnalazione) e il relativo tasso di positività come mostrato nella Tabella 22.

Tabella 22: Andamento stagionale delle segnalazioni della conta delle colonie a 22°C dei campioni analizzati nell'anno 2025

	INVERNO	PRIMAVERA	ESTATE	AUTUNNO
N° positivi	1	8	9	13
N° negativi	397	790	864	816
% positività	0.25 %	1.00 %	1.03 %	1.57 %

I dati mostrano un leggero e progressivo incremento della frequenza delle segnalazioni della conta delle colonie a 22°C nel corso dell'anno. In particolare, la percentuale di campioni segnalati risulta pari allo 0.25% in inverno, aumenta all'1.00% in primavera e raggiunge l'1.03% durante l'estate. Il valore massimo si raggiunge in autunno, con una percentuale di segnalazioni pari al 1.57%.

L'andamento stagionale delle segnalazioni è stato rappresentato graficamente mediante un grafico a barre che riporta la percentuale di campioni segnalati nelle diverse stagioni (Figura 24).

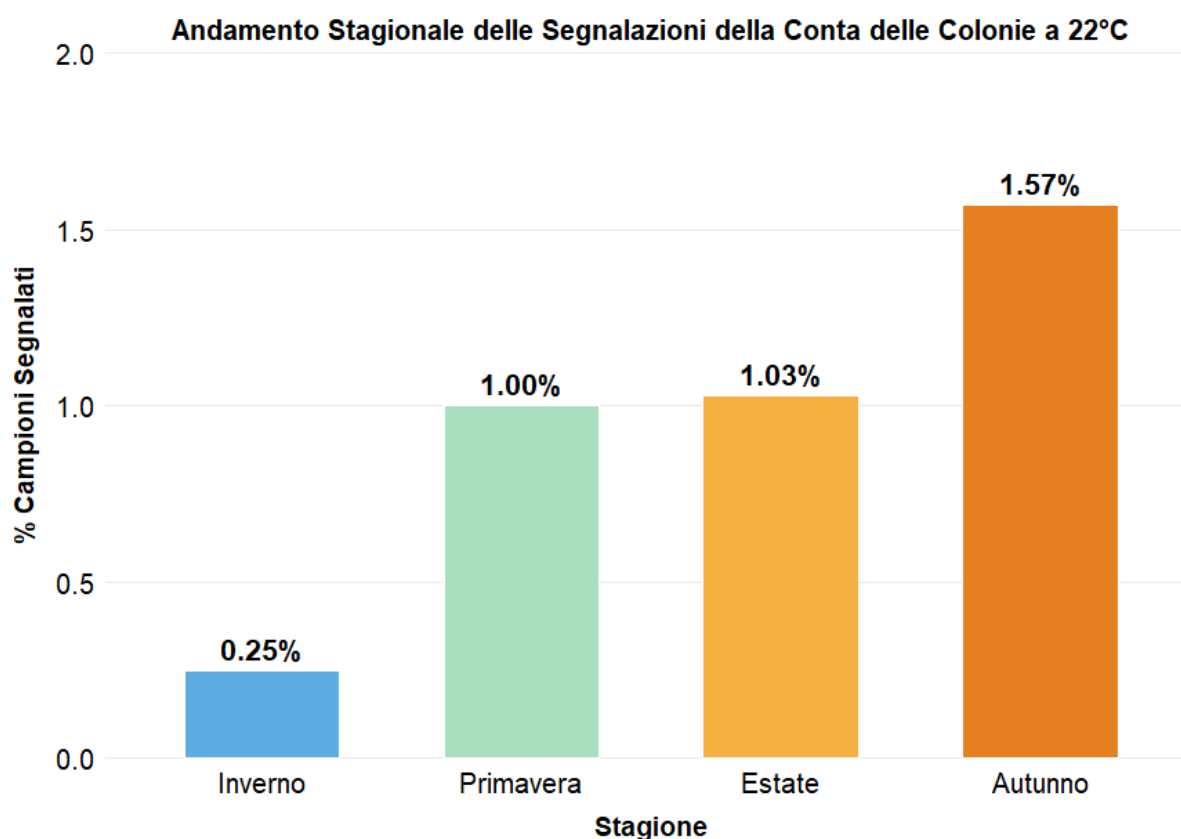


Figura 24: Andamento stagionale delle segnalazioni della conta delle colonie a 22°C

Per verificare se le differenze osservate siano statisticamente significative, è stato successivamente eseguito il test esatto di Fisher, al fine di valutare l'eventuale associazione tra la presenza di segnalazioni nei campioni e la stagione. Il test non ha evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra le due variabili ($p\text{-value} > 0.05$), suggerendo che il lieve incremento osservato nella frequenza delle segnalazioni tra le stagioni potrebbe essere attribuibile a fattori diversi (tra i quali, ad esempio, la stessa variabilità campionaria).

È stata inoltre eseguita la regressione logistica penalizzata di Firth per stimare gli OR associati alle diverse stagioni rispetto all'inverno. I risultati sono riportati nella Tabella 23.

Tabella 23: Odds Ratio (OR), intervallo di confidenza al 95% (95% CI) e $p\text{-value}$ dei campioni con segnalazioni nelle diverse stagioni rispetto all'inverno (baseline) stimati mediante regressione logistica penalizzata di Firth

	Primavera	Estate	Autunno
OR (95% CI)	2.85 (0.64 – 26.83)	2.91 (0.67 – 27.21)	4.38 (1.07 – 40.17)
p-value	0.187	0.171	0.039 *

* valore statisticamente significativo

Si osserva un aumento progressivo degli OR nelle stagioni, tuttavia i confronti relativi alla primavera e all'estate non sono risultati statisticamente significativi ($p\text{-value} > 0.05$). Per l'autunno invece si osserva un incremento statisticamente significativo della probabilità di segnalazioni rispetto all'inverno ($OR = 4.38$, $95\%CI [1.07, 40.17]$). Tale valore presenta però un intervallo di confidenza al 95% molto ampio, che può indicare una bassa precisione del valore dell'OR stimato a causa della ridotta numerosità di segnalazioni registrate per la stagione di riferimento (1 segnalazione).

Successivamente è stata eseguita un'analisi descrittiva dei valori della conta delle colonie a $22^{\circ}C$ nei soli campioni aventi una segnalazione. Su tali campioni è stato applicato il test non parametrico di Kruskal-Wallis al fine di valutare l'eventuale presenza di differenze nei valori di conta a $22^{\circ}C$ tra le stagioni. I risultati sono riportati nella Tabella 24.

Tabella 24: Analisi descrittiva stagionale della conta delle colonie a $22^{\circ}C$ nei campioni con segnalazioni e risultati del test di Kruskal-Wallis

	Stagione	N° positivi	IQR (Q1-Q3)	Mediana	Min - Max
CBT $22^{\circ}C$	Inverno	1	-	301	301 – 301
	Primavera	8	193.8 – 301	301	160 – 301
	Estate	9	212 – 301	276	150 – 301
	Autunno	13	155 – 301	230	124 – 301
p-value	0.559				

Si osservano alcune differenze nei valori mediani della conta tra le stagioni, tuttavia il test di Kruskal-Wallis non ha evidenziato differenze significative ($p\text{-value} > 0.05$). L'assenza di differenze significative può suggerire che, nei campioni per cui è stata emessa una segnalazione di superamento limite, il valore di UFC/mL non varia in modo evidente tra le stagioni. Tale risultato può essere influenzato dalla ridotta numerosità dei campioni per cui è stata emessa una segnalazione e dalla presenza di numerosi valori pari al limite superiore di quantificazione (301 UFC/ml corrispondenti al valore originale >300 UFC/ml).

I risultati ottenuti sono pertanto coerenti con il ruolo attribuito dal D. Lgs 18/2023 al parametro della conta delle colonie a 22°C, per il quale non è indicato un valore numerico come per gli indicatori microbiologici dell’Allegato I, ma richiede l’assenza di variazioni anomale. Infatti, l’assenza di differenze stagionali statisticamente significative può suggerire che, considerando come limite per la segnalazione il valore indicato nelle Linee Guida della Regione Piemonte, non si osserva un’influenza della stagionalità sulla frequenza e sulla carica dei superamenti.

4.4 Confronto primo semestre 2025 e primo semestre 2026

Al fine di verificare se il quadro osservato nel 2025 risultasse confermato anche nei dati raccolti durante l’internato di tesi, è stato effettuato un confronto tra il primo semestre del 2025 e il corrispondente periodo del 2026.

I dati relativi ai campioni non conformi ai requisiti microbiologici previsti dall’Allegato I parte A del Decreto Legislativo 18/2023 sono riportati nella Tabella 25.

Tabella 25: Valutazione campioni conformi e non conformi con classificazione delle non conformità in contaminazione fecale e contaminazione ambientale

Periodo	Campioni analizzati	Conformi	Non conformità totali	Contaminazione presumibilmente Ambientale	Contaminazione Fecale
Gen-Giu 2025	1542	1495	47	28	19
		(96.95%)	(3.05%)	(1.82%)	(1.23%)
Gen-Giu 2026	1582	1539	43	30	13
		(97.28%)	(2.72%)	(1.90%)	(0.82%)

Come evidenziato nella Tabella 25, il numero di campioni analizzati nei due periodi risulta sostanzialmente sovrapponibile, con 1542 campioni nel primo semestre del 2025 e 1582 campioni nel primo semestre del 2026.

Nel primo semestre del 2025 sono stati riscontrati 47 campioni non conformi (3.05%), mentre 1495 (96.95%) sono risultati conformi ai requisiti di legge. Tra le non conformità, 28 (1.82%) sono riconducibili a contaminazione presumibilmente di origine ambientale, caratterizzata dalla

sola presenza di batteri coliformi, mentre 19 (1.23%) sono attribuibili a contaminazione fecale data dalla presenza di *E. coli* e/o Enterococchi.

Nel primo semestre del 2026, invece, sono stati rilevati 43 campioni non conformi (2.72%) e 1539 campioni conformi (97.28%). Tra le non conformità, 30 campioni presentano una contaminazione presumibilmente di origine ambientale (1.90%) mentre 13 campioni presentano una contaminazione fecale (0.82%).

Nel complesso, i due periodi mostrano un andamento molto simile, con una lieve riduzione delle non conformità totali e, in particolare, di quelle riconducibili a contaminazioni fecali nel primo semestre 2026, come mostrato nella Figura 25.

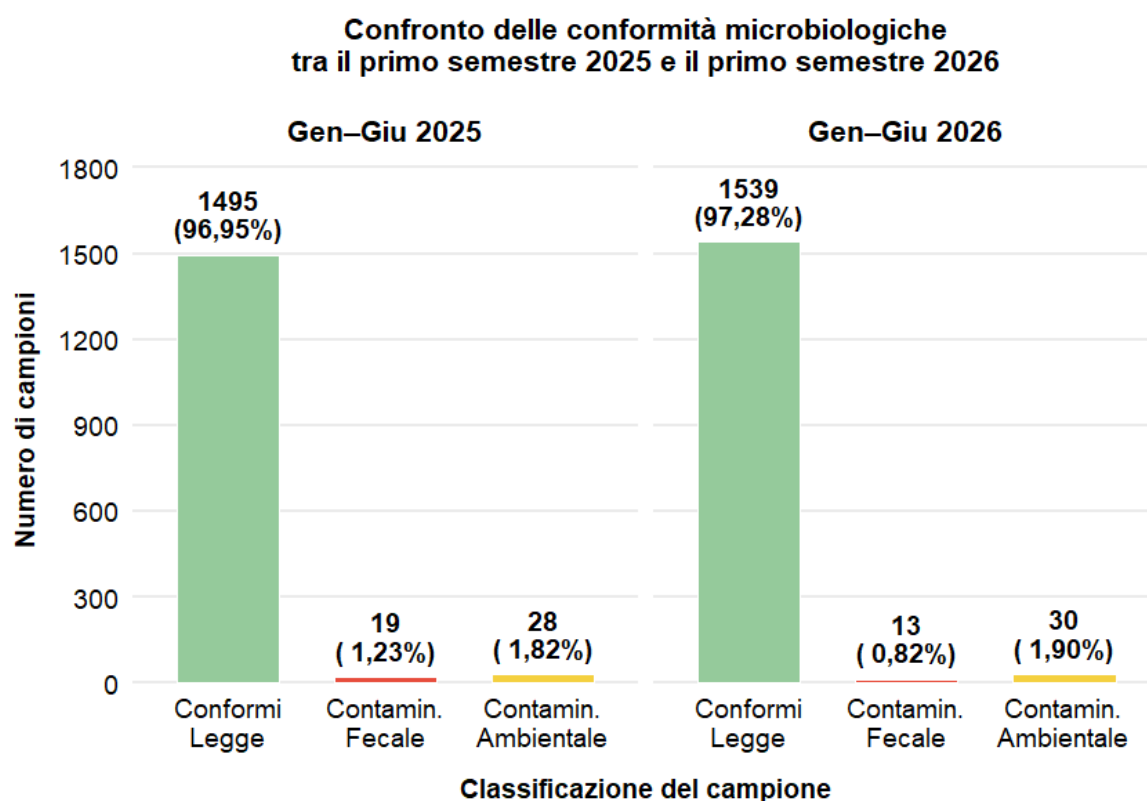


Figura 25: Distribuzione dei campioni conformi e non conformi con classificazione delle non conformità in relazione alla rispettiva origine nel primo semestre del 2025 e nel primo semestre del 2026

In entrambi gli anni, l'elevata percentuale di campioni conformi evidenzia un buon livello di qualità microbiologica dell'acqua destinata al consumo umano nella provincia di Torino, in accordo con i requisiti previsti dal D. Lgs. 18/2023, determinando una riduzione del rischio espositivo e una miglior tutela della salute pubblica.

Il confronto tra i campioni per i quali sono stati richiesti parametri microbiologici aggiuntivi previsti nell’Allegato I parte C del Decreto Legislativo 18/2023 e per i quali possono essere emesse segnalazioni, è riportato nella Tabella 26.

Tabella 26: Valutazione campioni senza segnalazioni e con segnalazioni, suddivisi in segnalazione o segnalazione unita a non conformità di legge

Periodo	Campioni analizzati	Nessuna segnalazione	Segnalazione	Segnalazione + Non conformità
Gen-Giu 2025	1401	1388 (99.07%)	10 (0.71%)	3 (0.21%)
Gen-Giu 2026	1465	1450 (98.98%)	10 (0.68%)	5 (0.34%)

Anche per tali parametri non sono emerse differenze rilevanti tra i due periodi considerati.

In entrambi i semestri, oltre il 98% dei campioni non ha riportato alcuna segnalazione (99.07% nel primo semestre del 2025 e 98.98% nel primo semestre del 2026), confermando un andamento sostanzialmente stabile nel tempo.

Le segnalazioni prive di non conformità per i parametri microbiologici dell’Allegato I parte A, sono rimaste invariate (10 casi in entrambi i periodi), mentre le segnalazioni associate ad una non conformità sono state 5 nel primo semestre del 2026 rispetto alle 3 dello stesso periodo del 2025, come mostrato nella Figura 26.

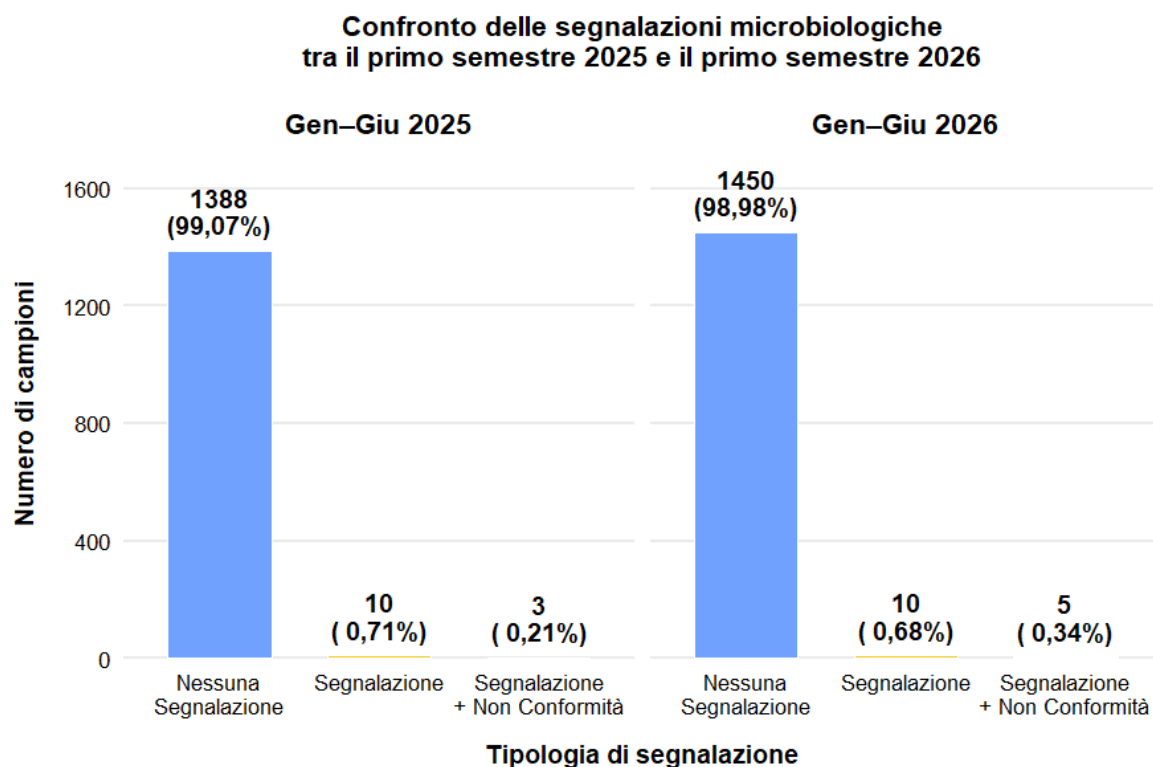


Figura 26: Distribuzione dei campioni senza segnalazioni e con segnalazioni, suddivisi in segnalazione o segnalazione unita a non conformità di legge per i campioni del primo semestre 2025 e del primo semestre 2026

È stata successivamente confrontata la frequenza di positività dei singoli parametri nei due periodi in esame, al fine di individuare eventuali variazioni nella distribuzione delle non conformità e delle segnalazioni osservate (Tabella 27).

Tabella 27: Frequenza percentuale delle positività dei singoli parametri in relazione al numero di richieste nel primo semestre 2025 e nel primo semestre 2026

	GEN-GIU 2025			GEN-GIU 2026		
Parametro	Positivi	Richiesta	% positività	Positivi	Richiesta	% positività
<i>E. coli</i>	10	1542	0.65%	10	1582	0.63%
Enterococchi	14	1537	0.91%	6	1579	0.38%
Coliformi	44	1542	2.85%	41	1582	2.59%
CBT 22°C	13	1401	0.93%	15	1463	1.03%

<i>P. aeruginosa</i>	0	35	0.00%	0	52	0.00%
<i>C. perfringens</i>	0	48	0.00%	0	42	0.00%
<i>Salmonella spp.</i>	0	1	0.00%	-	-	-
Stafilococchi patogeni	0	1	0.00%	-	-	-

Dalla Tabella 27 si osserva che i tassi di positività risultano sostanzialmente sovrapponibili nei due periodi.

In entrambi, il parametro con la maggiore frequenza di positività è rappresentato dai batteri coliformi, con il 2.85% nel primo semestre del 2025 e il 2.59% nel primo semestre del 2026. Anche *E. coli* mantiene una percentuale di positività invariata, mentre gli Enterococchi hanno subito una lieve riduzione del tasso di positività passando dallo 0.91% nel 2025 allo 0.38% nel 2026. Per la conta delle colonie a 22°C, il tasso di positività rimane stabile nei due periodi, con lo 0.93% nel 2025 e l'1.03% nel 2026. In entrambi i periodi non sono invece state riscontrate positività per *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*.

Tale confronto, quindi, evidenzia una stabilità della contaminazione microbiologica dell'acqua destinata al consumo umano tra i due periodi analizzati, senza variazioni rilevanti nella frequenza di positività dei singoli parametri.

Al fine di verificare tale stabilità, è stato effettuato un confronto statistico tra i due periodi mediante il test del Chi-quadro. I risultati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative ($p\text{-value} > 0.05$), confermando una stabilità della frequenza delle non conformità, delle segnalazioni e delle positività dei singoli parametri microbiologici nei due periodi.

Il confronto relativo al parametro degli Enterococchi ha mostrato la differenza più marcata ($p\text{-value} = 0.06$), come si era precedentemente notato dalle frequenze percentuali, pur non raggiungendo la significatività statistica.

Nel complesso, tali risultati confermano il buon livello di qualità microbiologica dell'acqua destinata al consumo umano nella provincia di Torino anche nel primo semestre del 2026.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha orientato l'attenzione sulla qualità microbiologica dei campioni di acqua destinata al consumo umano prelevati nell'intera provincia di Torino, al fine di valutare il rischio associato alla eventuale presenza di compromissioni microbiologiche e, di conseguenza, al consumo stesso dell'acqua.

In particolare, ci si è concentrati sulla valutazione dei risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche svolte sui campioni prelevati nell'anno 2025 e nel primo semestre del 2026, per verificarne la conformità in relazione al Decreto Legislativo n. 18 del 23 febbraio 2023 aggiornato e modificato dal successivo Decreto Legislativo n. 102 del 19 giugno 2025.

I provvedimenti richiamati hanno introdotto in modo esplicito il principio epidemiologico del rischio associato al consumo dell'acqua in realtà già presente nelle disposizioni precedenti, anche se in modo sottinteso e non conclamato.

Si tratta di una concezione di significato fondamentale, considerato l'utilizzo capillare dell'acqua, e, come riportano i decreti in questione *“L'approccio basato sul rischio è finalizzato a garantire la sicurezza delle acque destinate al consumo umano e l'accesso universale ed equo all'acqua in conformità al presente decreto, implementando un controllo olistico di eventi pericolosi e pericoli di diversa origine e natura”*.

È stato infatti descritto un concetto non considerato nel D. Lgs. n. 31 del 2 febbraio 2001 e nel D. M. 14 giugno 2017, vale a dire quello di *“sistema idro-potabile di distribuzione interno ai locali pubblici e privati, collocato tra il punto di consegna ed il punto d'uso dell'acqua”* che configura, oltre a divergenti peculiarità tecnico-organizzative, specifiche responsabilità avulse dai tradizionali controlli interni ed esterni.

Inoltre, il D. Lgs. n. 18/2023 riprende il principio, ormai consolidato dalla legislazione europea, riguardante l'esigenza di una corretta informazione dei consumatori, nella prospettiva di un sempre maggiore coinvolgimento attivo dei medesimi nella propria sicurezza.

Dall'analisi dei risultati relativi ai campioni prelevati nell'anno 2025 è emerso un quadro complessivamente positivo, con una percentuale di campioni conformi ai requisiti di legge pari al 96.06% corrispondenti a 3023 campioni su 3147 analizzati. Tali risultati sembrano confermare l'efficacia dei sistemi di trattamento e delle reti di distribuzione, evidenziando un adeguato livello di qualità microbiologica dell'acqua destinata al consumo umano nel territorio

oggetto di attenzione. Le non conformità riscontrate sono risultate limitate e, nella maggior parte dei casi, riconducibili alla presenza di batteri coliformi.

Nei campioni risultati non conformi, le cariche microbiche relative ai diversi parametri sono state generalmente contenute, suggerendo che gli episodi di potenziale compromissione osservati siano stati sporadici, caratterizzati da una limitata entità e, nel complesso, da un livello di rischio microbiologico presumibilmente basso.

Dalla valutazione dell'andamento stagionale delle non conformità è emersa un'associazione staticamente significativa tra la presenza di campioni non conformi e la stagione di campionamento. In particolare, è stato osservato un aumento generale del numero di campioni non conformi passando dall'inverno alle stagioni successive, come era per altro preventivabile. Nello specifico, le contaminazioni da *Escherichia coli* e batteri coliformi sono risultate più frequenti durante la stagione estiva, con un tasso di positività rispettivamente del 1.27% e 5.57%, e in autunno, con un tasso di positività del 1.25% e 4.30%.

Tale andamento non è stato invece osservato per le unità formanti colonia (UFC/100 mL) rilevate nei campioni positivi, per le quali non è emerso un incremento della carica microbica con il susseguirsi delle stagioni.

Si può quindi ipotizzare che l'aumento delle temperature ambientali durante i mesi più caldi possa favorire un maggiore sviluppo di biofilm, anche come conseguenza di una più rapida degradazione del cloro residuo se utilizzato come disinfettante.

In generale, l'andamento positivo osservato nei dati relativi all'anno 2025 è stato confermato anche dai risultati raccolti durante il periodo di tesi relativo al primo semestre del 2026. Il numero di campioni analizzati e il tasso di conformità osservato si sono mantenuti sostanzialmente equivalenti, confermando l'elevata qualità microbiologica dell'acqua destinata al consumo umano e l'efficacia del sistema di controllo finalizzato alla tutela della salute pubblica.

Si sottolinea per correttezza come lo studio in questa sede proposto si estenda unicamente per l'area geografica costituita dalla provincia di Torino e come le valutazioni microbiche non risultino correlabili con altri fattori ambientali potenzialmente in grado di influenzare la qualità dell'acqua, quali le condizioni meteorologiche, le caratteristiche delle fonti di approvvigionamento o altre variabili naturali.

Per studi futuri si potrebbe quindi sviluppare un approccio multidisciplinare, integrando i dati microbiologici con informazioni di carattere ambientale e climatico, al fine di ottenere una

valutazione più completa dei fattori che influenzano la qualità microbiologica delle acque destinate al consumo umano anche in aree più estese.

A conclusione di questa discussione finale non appare inopportuno aggiungere una considerazione, in linea con gli aspetti già proposti ed approfonditi.

L'introduzione nella legislazione europea ed italiana del principio del rischio associato al consumo di acqua, e dei conseguenti, opportuni criteri di valutazione appare configurare una concezione lungimirante relativa ad una matrice ambientale (nonché prodotto destinato alla alimentazione) di rilevanza primaria ed insostituibile, quale è appunto l'acqua.

Non sembra pertanto improprio ricollegare tale sviluppo legislativo ad una evoluzione della normazione tecnica internazionale, in particolare nel settore che delinea i fondamenti della “qualità ambientale” attraverso le norme della serie ISO 14000.

Tale evoluzione si è manifestata attraverso una precisa successione di aggiornamenti, a partire dalla pubblicazione nel 2023 della linea guida UNI EN ISO 14002-2, disponibile in Italia dal luglio 2024, specificamente dedicata alla gestione del rischio idrico, per poi arrivare al più recente e rilevante aggiornamento del quadro relativo alla “qualità ambientale”. Proprio nei primi mesi 2026, per la precisione il 16 aprile, è stata infatti pubblicata la nuova UNI EN ISO 14001 (*“Sistemi di gestione ambientale. Requisiti e guida per l'uso”*). (UNI EN ISO 14002-2, 2023) (UNI EN ISO 14001, 2026)

Si ricorda che per “qualità ambientale” non si intende un concetto “integralista” di intangibilità dell'ambiente, bensì un ben più ragionevole criterio di rispetto degli equilibri e tutela della integrità delle risorse, fondato sull'assioma che sarebbe improponibile, per qualunque organizzazione, azzerare l'interazione con l'ambiente.

Quindi, in definitiva, l'ipotesi di un “allineamento” dei provvedimenti legislativi (Direttiva UE 2020/2184, D. Lgs. n. 18/2023, D. Lgs. n. 102/2025) alla evoluzione in atto in termini di qualità ambientale non appare fuori luogo. L'obiettivo “strategico” di tale evoluzione può essere configurato nell'affinamento della “cultura” di quella risorsa preziosa e insostituibile che è appunto il “bene ambiente”, il cui benessere deve costituire l'impegno di ogni individuo. Restando, tra l'altro, in un contesto di specifica competenza per la figura professionale del biologo.

6. **BIBLIOGRAFIA**

Accordo 17 Giugno 2004 - Intesa Tra Il Ministro Della Salute, Le Regioni e Le Province Autonome Di Trento e Di Bolzano per l'attuazione Della Raccomandazione Della Commissione Europea Del 19 Dicembre 2003, n. 2004/24/CE, Relativa Ad Un Programma Comunitario Coordinato Di Controllo Ufficiale Dei Prodotti Alimentari, per l'anno 2004., GU Serie Generale n.173 del 26-07-2004 Gazzetta Ufficiale (2004).

Accredia. (2023). *RG-02 rev.08—Regolamento per l'accreditamento dei Laboratori di prova e dei Laboratori Medici* (RG-02 rev.08). Accredia.

Accredia. (2026). *RT-23 rev.05 – Prescrizioni per la definizione del campo di accreditamento per i laboratori di prova* (RT-23 rev.05). Accredia.

Allen, M. J., Edberg, S. C., & Reasoner, D. J. (2004). Heterotrophic plate count bacteria—What is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*, 92(3), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.017>

Antonelli, G., Clementi, M., Pozzi, G., & Rossolini, G. M. (2017). *Principi di microbiologia medica* (3^a ed). CEA.

APAT & CNR - IRSA. (2003). *Metodi analitici per le acque: Vol. 3. Metodi microbiologici* (Vol. 3). APAT.

Arpa Piemonte. (2023). *Criteri per la valutazione di conformità e per l'espressione e l'interpretazione dei risultati* (Procedura Tecnica U.RP.T077 Rev 13).

Balestra, V., Valle, M., Bellopede, R., & Fiorucci, A. (2026). Microplastic and microfibre pollution in confined aquifers: Insights from Italy. *Environmental Research*, 300, 124416. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2026.124416>

- Biasibetti, M., Longhi, E., Bozza, S., Zanotti, C., Rotiroti, M., Fumagalli, L., Caschetto, M., Redaelli, A., & Bonomi, T. (2023). Climate-related risk assessment in water safety plans: The case study of Acque Bresciane (Italy). *Journal of Water and Health*, 22(1), 97–122. <https://doi.org/10.2166/wh.2023.103>
- Biolife Italiana S.r.l. (2022a). *Baird Parker RPF Agar* (ST-543101 rev 7).
- Biolife Italiana S.r.l. (2022b). *Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation—Istruzioni per l'uso* (ST-491018 rev 5).
- Biolife Italiana S.r.l. (2022c). *Buffered Peptone Water—Istruzioni per l'uso* (ST-511278 rev 9).
- Biolife Italiana S.r.l. (2023a). *Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation—Istruzioni per l'uso* (ST-491297 rev 4).
- Biolife Italiana S.r.l. (2023b). *Pseudomonas CN Selective Agar—Istruzioni per l'uso* (ST-491960 rev 8).
- Biolife Italiana S.r.l. (2023c). *Rappaport Vassiliadis Broth—Istruzioni per l'uso* (ST-551940 rev 3).
- Biolife Italiana S.r.l. (2023d). *Selenite Cystine Broth—Istruzioni per l'uso* (ST-512026 rev 4).
- Biolife Italiana S.r.l. (2023e). *Slanetz Bartley Agar—Istruzioni per l'uso* (ST-492046 rev 7).
- Biolife Italiana S.r.l. (2023f). *Yeast Extract Agar—Istruzioni per l'uso* (ST-492275 rev 3).
- Biolife Italiana S.r.l. (2024). *TSC Agar Base / D-Cycloserine Antimicrobial Supplement—Istruzioni per l'uso* (ST-492158X rev 9).
- Biolife Italiana S.r.l. (2025a). *Columbia Blood Agar—Istruzioni per l'uso* (ST-541136 rev 7).
- Biolife Italiana S.r.l. (2025b). *Hektoen Enteric Agar—Istruzioni per l'uso* (ST-541541 rev 7).
- Biolife Italiana S.r.l. (2026). *Tryptic Soy Agar—Istruzioni per l'uso* (ST-542150 rev 6).

- BioMérieux. (2019a). *API 20 A* (Ref 20300 / Doc. 07882-I-2019-09).
- BioMérieux. (2019b). *API 20 E* (Ref 20100/20160 / Doc. 07584-L-2019-06).
- BioMérieux. (2019c). *API 20 NE* (Ref 20050 / Doc. 07615-L-2019_09).
- Cabral, J. P. S. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703.
<https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Centorrino, F. (2019, January 25). Staphylococcus aureus. *Microbiologia Italia*.
<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/staphylococcus-aureus/>
- Decreto 14 Giugno 2017 - Recepimento Della Direttiva (UE) 2015/1787 Che Modifica Gli Allegati II e III Della Direttiva 98/83/CE Sulla Qualita' Delle Acque Destinate al Consumo Umano, GU Serie Generale n.192 del 18-08-2017 Gazzetta Ufficiale (2017).
- Decreto Legislativo 2 Febbraio 2001, n. 31 - Attuazione Della Direttiva 98/83/CE Relativa Alla Qualita' Delle Acque Destinate al Consumo Umano, GU Serie Generale n.52 del 03-03-2001-Suppl. Ordinario n. 41 Gazzetta Ufficiale (2001).
- Decreto Legislativo 3 Aprile 2006, n. 152 - Norme in Materia Ambientale, GU n.88 del 14-04-2006-Suppl. Ordinario n. 96 Gazzetta Ufficile (2006).
- Decreto Legislativo 8 Ottobre 2011, n. 176 - Attuazione Della Direttiva 2009/54/CE, Sull'utilizzazione e La Commercializzazione Delle Acque Minerali Naturali, GU Serie Generale n. 258 del 05-11-2011 Gazzetta Ufficiale (2011).
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2011/11/05/011G0218/sg>
- Decreto Legislativo 23 Febbraio 2023, n. 18 - Attuazione Della Direttiva (UE) 2020/2184 Del Parlamento Europeo e Del Consiglio, Del 16 Dicembre 2020, Concernente La Qualita' Delle Acque Destinate al Consumo Umano, GU Serie Generale n.55 del 06-03-2023

<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2023/03/06/23G00025/sg>

Decreto Legislativo 26 Maggio 1997, n. 156 - Attuazione Della Direttiva 93/99/CEE Concernente Misure Supplementari in Merito al Controllo Ufficiale Dei Prodotti Alimentari, GU Serie Generale n.136 del 13-06-1997-Suppl. Ordinario n. 118 Gazzetta Ufficiale (1997).

Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30–33.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>

European Food Safety Authority (EFSA), Barthélémy, E., Cariou, R., Castle, L., Crebelli, R., Di Consiglio, E., Dumas, T. H., Franz, R., Grob, K., Lambré, C., Lampi, E., Milana, M. R., Pronk, I. M. G. M., Rivière, G., da Silva, M., Tietz, T., Tsochatzis, E., & Van Hoeck, E. (2025). Literature review on micro- and nanoplastic release from food contact materials during their use. *EFSA Supporting Publications*, 22(10), 9733E.
<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2025.EN-9733>

Fira-Mladinescu, C., Margan, M.-M., Margan, R., Ardelean, F., Sînmârghișan, A. I., Marincov, D., Tuță-Sas, I., Marin, I., Cîndrea, A.-C., Bodea, D.-A., & Laitin, S. M. D. (2026). Meteorological Influence on Drinking Water Quality: Microbial Variability in Groundwater Wells and Piped Distribution Networks from Western Romania. *Microorganisms*, 14(1), 148. <https://doi.org/10.3390/microorganisms14010148>

Gaur, N., Shankar, S., Chaudhary, R., Akhtar, N., & Vyas, A. (2026). Fecal Contamination in Drinking Water: A review of detection techniques, pathogen dynamics, and sustainable remediation approaches. *Environmental Monitoring and Assessment*, 198(4), 296.
<https://doi.org/10.1007/s10661-026-15135-1>

- Generon. (n.d.). *Hektoen Agar*. Generon - Catalogo Generale. Retrieved 30 July 2026, from <https://www.generon.it/prodotto/hektoen-agar-acc-to-iso-6579/>
- Hunter, P. R. (2003). Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. *Journal of Water and Health*, 1(2), 65–72.
- Istituto Nazionale di Statistica. (2021). *Le statistiche dell'Istat sull'acqua—Anni 2018-2020*. Istat. <https://www.istat.it/it/files/2021/03/Report-Giornata-mondiale-acqua.pdf>
- Istituto Nazionale di Statistica. (2026). *Le statistiche sull'acqua – Anni 2023-2025*. Istat. <https://www.istat.it/comunicato-stampa/le-statistiche-sullacqua-anni-2023-2025/>
- Istituto Superiore di Sanità. (2007). *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici* (Rapporti ISTISAN 07/05).
- Istituto Superiore di Sanità. (2022). *Rapporto ISTISAN 22/33—Linee guida nazionali per l'implementazione dei Piani di Sicurezza dell'Acqua. Gruppo Nazionale di lavoro per la redazione delle Linee guida nazionali per l'implementazione dei PSA* (Rapporti ISTISAN 22/33).
- Istituto Superiore di Sanità. (2024). *Parametri e controlli*. <https://www.iss.it/acqua-la-legge-e-i-controlli>
- Jang, J., Hur, H. -G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: Ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- LeChevallier, M. W., Prosser, T., & Stevens, M. (2024). Opportunistic Pathogens in Drinking Water Distribution Systems—A Review. *Microorganisms*, 12(5), 916. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050916>

- Li, W., Yuan, Q., Li, X., Teng, M., Zhang, Z., Luo, Y., & Wu, F. (2025). *Clostridium perfringens* as an alternative fecal indicator bacteria in surface water quality: A national investigation in Chinese rivers. *Water Research (Oxford)*, 286, 124223-. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2025.124223>
- Limaheluw, J., & van der Aa, M. (2025). Warming drinking water distribution systems in the context of climate change: A scoping review on health-related microbial and chemical water quality effects. *Journal of Water and Health*, 23(8), 952–967. <https://doi.org/10.2166/wh.2025.059>
- Lima-Oliveira, G., Volanski, W., Lippi, G., Picheth, G., & Guidi, G. C. (2017). Pre-analytical phase management: A review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 77(3), 153–163. <https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1295317>
- Magana-Arachchi, D. N., & Wanigatunge, R. P. (2020). Chapter 2—Ubiquitous waterborne pathogens. In M. N. Vara Prasad & A. Grobelak (Eds), *Waterborne Pathogens* (pp. 15–42). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818783-8.00002-5>
- Mercante, J. W., & Winchell, J. M. (2015). Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 95–133. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-14>
- Molina, F., López-Acedo, E., Tabla, R., Roa, I., Gómez, A., & Rebollo, J. E. (2015). Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology*, 15, 48. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0168-2>
- Murray, P. R., Pfaller, M., & Rosenthal, K. (2021). *Microbiologia medica*. Edra.

- NF T90-412. (2016). *Qualité de l'eau—Dénombrement des staphylocoques pathogènes (à coagulase positifs)—Méthode par filtration sur membrane*. Association Française de Normalisation (AFNOR).
- Price, R. G., & Wildeboer, D. (2017). E. coli as an Indicator of Contamination and Health Risk in Environmental Waters. In *Escherichia coli—Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67330>
- Regolamento (CE) n. 178/2002 Del Parlamento Europeo e Del Consiglio, Del 28 Gennaio 2002, GU L 31 del 1.2.2002 (2002).
- Santos, G. A. C., Dropa, M., Rocha, S. M., Peternella, F. A. S., & Razzolini, M. T. P. (2020). Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in drinking water fountains in urban parks. *Journal of Water and Health*, 18(5), 654–664. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.042>
- Saxena, G., Bharagava, R. N., Kaithwas, G., & Raj, A. (2014). Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *Journal of Water and Health*, 13(2), 319–339. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.275>
- SSI Diagnostica. (2021). *Istruzioni per l'uso: Salmonella Antisieri*. <https://ssid.com/wp-content/uploads/2021/12/IFU-Salmonella-antisera-IT-2593-6.pdf>
- Standing Committee of Analysts. (2020). *The Microbiology of Drinking Water—Part 6—Methods for the isolation and enumeration of sulphite-reducing clostridia and Clostridium perfringens by membrane filtration*.
- Sun, Y., Xu, Y., Che, J., Zhang, S., Hou, S., Li, W., Jiao, H., & Hu, D. (2025). Microbiological Quality of Drinking Water From On-Demand Purified Water Dispensers in Residential Communities. *Water Environment Research*, 97(12). <https://doi.org/10.1002/wer.70210>

- Taylor, D. D. J., Khush, R., Peletz, R., & Kumpel, E. (2018). Efficacy of microbial sampling recommendations and practices in sub-Saharan Africa. *Water Research*, 134, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.054>
- Thermo Fisher Scientific. (2023, October). *Microbact™ Strisce per Ossidasi: Istruzioni per l'uso*. <https://www.thermofisher.com/>
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025. (2018). *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*.
- UNI EN ISO 5667-3. (2024). *Water quality—Sampling—Parte 3: Preservation and handling of water samples*.
- UNI EN ISO 6222. (2001). *Water quality—Enumeration of culturable micro-organisms—Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*.
- UNI EN ISO 7704. (2023). *Water quality—Requirements for the evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*.
- UNI EN ISO 7899-2. (2003). *Water quality—Detection and enumeration of intestinal enterococci—Part 2: Membrane filtration method*.
- UNI EN ISO 8199. (2018). *Water quality—General requirements and guidance for microbiological examinations by culture*.
- UNI EN ISO 9001. (2015). *Sistema di gestione per la qualità—Requisiti*.
- UNI EN ISO 9308-1. (2017). *Water quality—Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria—Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*.

- UNI EN ISO 11133. (2020). *Microbiology of food, animal feeding stuffs and water—Preparation, production, storage and performance testing of culture media—Amendment 2*.
- UNI EN ISO 14001. (2026). *Sistema di gestione ambientale—Requisiti e guida per l'uso*.
- UNI EN ISO 14002-2. (2023). *Sistemi di gestione ambientale—Linee guida per l'utilizzo della ISO 14001 per affrontare gli aspetti e le condizioni ambientali all'interno di un'area tematica ambientale—Parte 2: Acqua*.
- UNI EN ISO 16266. (2008). *Water quality—Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa—Method by membrane filtration*.
- UNI EN ISO 19458. (2006). *Water quality—Sampling for microbiological analysis*.
- UNI EN ISO 29201. (2012). *Water quality—The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods*.
- UNI EN ISO 45001. (1990). *Criteri generali per il funzionamento dei laboratori di prova*.
- University of Copenhagen. (2011). *Clostridium perfringens* [Online Photo Atlas in Veterinary Disease Biology].
https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Clostridium_perfringens/
- Wątor, K., & Dobrzyński, D. (2022). Towards a better practice in water sampling: Case studies on used in practice geothermal waters. *Chemosphere*, 303, 134913.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134913>
- World Health Organization. (2009). *Water Safety Plan Manual: Step-by-step Risk Management for Drinking-water Suppliers*. World Health Organization.
- World Health Organization (Ed.). (2022). *Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda*. World Health Organization.

World Health Organization. (2023, September 13). *Drinking-water*.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>

Yang, Q., Chen, J., Dai, J., He, Y., Wei, K., Gong, M., Chen, Q., Sheng, H., Su, L., Liu, L.,
Chen, J., Bai, L., Cui, S., & Yang, B. (2024). Total coliforms, microbial diversity and
multiple characteristics of Salmonella in soil-irrigation water-fresh vegetable system in
Shaanxi, China. *The Science of the Total Environment*, 924, 171657-
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171657>