



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata
Bioanalisi

**Isolamento e identificazione di *Escherichia coli* in acque
destinate al consumo umano**

Relatore:

Prof.ssa Silvia Buroni

Correlatore:

Dott.ssa Stefania Guizzetti

Tesi Sperimentale di

Alice Rodio

Anno Accademico 2024/2025

*A tutti coloro che lottano
costantemente con sé stessi,
in balia delle proprie emozioni,
in una guerra invisibile.*

*A chi viene divorato dall'ansia,
quando sembra non esista
una luce in fondo al tunnel.*

*Alle mie insicurezze,
diventate vittorie.*

Oggi mi sono presa la mia rivincita.

Riassunto

Assicurare la disponibilità di risorse idriche salubri costituisce, da sempre, uno dei principali obiettivi prioritari nell'ambito della tutela della salute pubblica. Le acque destinate al consumo umano possono, infatti, fungere da veicoli per numerosi agenti patogeni, rendendo necessario un sistema di monitoraggio rigoroso e costante.

All'interno di questo scenario, *Escherichia coli* è considerato a livello internazionale il parametro microbiologico di riferimento più affidabile per la valutazione della qualità delle acque. Infatti assume un ruolo di primaria importanza in quanto la sua presenza è associata in modo univoco ad una contaminazione fecale recente.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di condurre uno studio sull'isolamento e l'identificazione di *E. coli* in una serie di campioni idrici distribuiti sul terreno nazionale. Lo studio si è focalizzato sull'applicazione delle metodiche analitiche standardizzate per verificare la conformità dei campioni rispetto ai limiti di legge imposti dal D.Lgs.18/2023, che recepisce la Direttiva (UE) 2020/2184, volta a proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque.

E. coli è un batterio Gram-negativo, asporigeno, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. La sua presenza nell'acqua è un indicatore specifico di contaminazione fecale recente, poiché il suo habitat naturale è l'intestino dell'uomo e degli animali a sangue caldo. A differenza di altri coliformi, *E. coli* non è in grado di moltiplicarsi nell'ambiente se non in condizioni eccezionali; pertanto, il suo rilevamento indica un fallimento nei processi di potabilizzazione o una contaminazione post-trattamento nella rete di distribuzione.

L'indagine sperimentale descritta nella presente tesi è svolta presso l'azienda TeaLab di Rho ha riguardato l'analisi di 180 campioni di acqua, raccolti in un arco temporale definito e provenienti da diverse province del territorio nazionale. Sebbene il campionamento abbia coinvolto realtà eterogenee a livello nazionale, la distribuzione geografica mostra una netta prevalenza della provincia di Milano, seguita da Brescia e Monza, garantendo comunque una significativa rappresentatività delle diverse realtà idriche locali.

Per l'isolamento è stata adottata la tecnica della filtrazione su membrana, metodo d'elezione per volumi d'acqua con bassa carica batterica. Il protocollo sperimentale ha previsto

inizialmente la filtrazione di un volume di 100 ml per ciascun campione, utilizzando membrane in esteri di cellulosa con una porosità di 0.45 μm . Successivamente, tali membrane sono state trasferite su un terreno di coltura selettivo e cromogeno, il Chromogenic Coliform Agar; grazie alla presenza di specifici substrati per l'enzima β -D-glucuronidasi, è stato possibile procedere a un'identificazione biochimica immediata dei microrganismi. Una volta conclusi i tempi di incubazione previsti, la lettura delle piastre ha permesso di individuare le colonie sospette: la conferma della presenza di *Escherichia coli* è avvenuta attraverso l'osservazione del viraggio cromatico verso il blu. Tale evidenza visiva, derivante dall'attività enzimatica specifica del batterio sul terreno, ha consentito di distinguere i ceppi target dalle altre specie microbiche coliformi, permettendo così di completare con precisione il processo di identificazione e isolamento per i campioni analizzati.

Dall'analisi dei 180 campioni è emerso un quadro complessivamente rassicurante per quanto riguarda la sicurezza idrica. La maggior parte dei siti di prelievo ha mostrato una totale assenza di *E. coli*, rispettando il requisito di legge di 0 Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 ml. Tuttavia, in una piccola frazione di campioni (4,44%), sono state riscontrate positività.

L'efficacia del metodo cromogeno è stata confermata: la rapidità di lettura (24 ore) e l'elevata specificità hanno permesso di ridurre i tempi di risposta, aspetto fondamentale in caso di segnalazioni di rischio per la popolazione. Lo studio condotto evidenzia come il sistema di monitoraggio delle acque destinate al consumo umano nel territorio nazionale sia solido ed efficiente. L'isolamento di *E. coli* si conferma uno strumento insostituibile per la sorveglianza igienico-sanitaria. Sebbene i dati mostrino un'elevata qualità dell'acqua distribuita non bisogna abbassare la guardia. La continua attività di campionamento e l'adozione di tecniche di isolamento sempre più sensibili e rapide restano fondamentali per prevenire potenziali epidemie di origine idrica e per garantire la tutela della salute del cittadino nel lungo periodo.

In conclusione, la tutela della risorsa idrica rimane una delle sfide più complesse della nostra epoca, dove la competenza tecnica del microbiologo si fonde con la responsabilità etica verso la salute della comunità.

Indice

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 7 |
| 1.1 | Importanza della qualità microbiologica delle acque destinate al consumo umano | 7 |
| 1.2 | Il quadro normativo sulla qualità delle acque | 8 |
| 1.2.1 | Decreto Legislativo n°18 del 23 febbraio 2023 | 8 |
| 1.3 | <i>Escherichia coli</i> come indicatore di contaminazione fecale | 13 |
| 1.3.1 | Inquadramento tassonomico e caratteristiche biologiche | 13 |
| 1.3.2 | Patogenicità e dinamiche di trasmissione idrica | 14 |
| 1.3.3 | Habitat naturale | 15 |
| 1.3.4 | Ruolo come indicatore igienico-sanitario | 16 |
| 1.3.5 | Differenze tra <i>Escherichia coli</i> e gli altri coliformi | 17 |
| 1.4 | Metodi microbiologici per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| 1.4.1 | Metodo ISO 9308-1:2017 | 21 |
| 1.5 | Rilevanza del monitoraggio ambientale | 23 |
| 2 | SCOPO DEL LAVORO | 24 |
| 3 | MATERIALI E METODI | 25 |
| 3.1 | Sito di studio e provenienza dei campioni | 26 |
| 3.1.1 | Frequenza e modalità di campionamento | 33 |
| 3.1.2 | Trasporto e conservazione dei campioni | 34 |
| 3.2 | Metodo di filtrazione su membrana | 35 |
| 3.2.1 | Procedura operativa | 35 |
| 3.2.2 | Incubazione e lettura | 36 |
| 3.2.3 | Materiali e strumentazione | 36 |
| 3.2.4 | Terreni cromogenici | 38 |
| 3.2.5 | Controllo della qualità delle membrane filtranti | 45 |
| 3.2.6 | Vantaggi e limiti della tecnica di filtrazione | 47 |
| 3.3 | Identificazione e isolamento di <i>Escherichia coli</i> | 49 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.3.1 | Criteri di discriminazione cromatica | 49 |
| 3.3.2 | Protocollo di conteggio e tracciabilità | 50 |
| 3.4 | Elaborazione e analisi dei dati | 50 |
| 3.5 | Gestione dei dati ed emissione dei Rapporti di Prova | 51 |
| 4 | RISULTATI E DISCUSSIONI | 52 |
| 4.1 | Significato sanitario dell'isolamento di <i>Escherichia coli</i> | 62 |
| 4.2 | Ipotesi sulle cause della non conformità | 62 |
| 4.3 | Discussione delle metodiche di isolamento ed identificazione | 63 |
| 5 | CONCLUSIONI | 64 |
| 5.1 | Il ruolo di <i>Escherichia coli</i> nella tutela della salute pubblica | 65 |
| 5.2 | Analisi critica della metodologia: punti di forza e limiti | 65 |
| 5.3 | Prospettive future e gestione del rischio | 66 |
| 5.4 | Considerazioni finali | 66 |
| 6 | RINGRAZIAMENTI | 67 |
| | Bibliografia | 70 |

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Importanza della qualità microbiologica delle acque destinate al consumo umano

L'acqua rappresenta una risorsa vitale per la sopravvivenza e lo sviluppo delle società umane; tuttavia, essa può al contempo configurarsi come un rilevante fattore di rischio sanitario, in quanto potenziale veicolo di trasmissione di microrganismi patogeni.

Nonostante i considerevoli progressi conseguiti nell'ambito dell'ingegneria sanitaria e delle tecnologie di trattamento, la salvaguardia della qualità microbiologica delle risorse idriche continua a costituire una priorità imprescindibile per la tutela della salute pubblica a livello globale.

In questo contesto, assume particolare rilevanza la definizione di "acque destinate al consumo umano", così come stabilita dal Ministero della Salute, che ne delimita l'ambito di applicazione e i requisiti di qualità, al fine di garantire la sicurezza e la salubrità delle acque destinate al consumo umano.

«Secondo la definizione del Ministero della Salute, le acque destinate al consumo umano includono tutte le acque (trattate e non) impiegate per scopi potabili, alimentari o domestici, indipendentemente dalla modalità di fornitura (rete, cisterne o bottiglie). La definizione comprende, inoltre, le acque utilizzate nelle imprese alimentari per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano, escludendo quelle acque la cui qualità non ha conseguenze sulla salubrità del prodotto alimentare finale»(Ministero della Salute, 2016).

La qualità dell'acqua è un concetto multidimensionale che comprende parametri chimici, fisici e, in particolare, microbiologici. Mentre la contaminazione chimica agisce generalmente per esposizione cronica nel lungo periodo, il rischio microbiologico è caratterizzato da un'immediata pericolosità.

Batteri, virus e protozoi, spesso di origine fecale, possono scatenare epidemie a rapida incubazione, con effetti potenzialmente letali per i soggetti vulnerabili come bambini, anziani e immunodepressi. Pertanto, la rimozione dei patogeni rappresenta un elemento cardine della moderna tutela della salute pubblica.

Garantire l'assenza di patogeni non è dunque solo una necessità tecnica, ma il pilastro fondamentale su cui poggia la sanità pubblica moderna.

1.2 Il quadro normativo sulla qualità delle acque

Al fine di tutelare la salute pubblica, la legislazione ha introdotto standard rigorosi, periodicamente aggiornati in base al progresso delle conoscenze scientifiche.

In ambito europeo, il principale riferimento normativo è la Direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2020, recepita in Italia con il Decreto Legislativo n°18 del 23 febbraio 2023 (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020).

Questa normativa supera l'approccio tradizionale basato sul controllo "a fine linea", limitato alla verifica della qualità dell'acqua al punto di utilizzo, e introduce un modello integrato di gestione del rischio che considera l'intera filiera idropotabile, dalla captazione della risorsa fino alla distribuzione, all'erogazione al consumatore finale (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023).

1.2.1 Decreto Legislativo n°18 del 23 febbraio 2023

Il Decreto Legislativo 18/2023 ha come finalità principale la tutela della qualità delle acque destinate al consumo umano e la salvaguardia della salute pubblica rispetto ai possibili effetti nocivi derivanti dalla loro contaminazione.

La norma mira a garantire che l'acqua distribuita sia sicura e igienicamente idonea, promuovendo al contempo un progressivo miglioramento dell'accesso alla risorsa idropotabile.

Come già detto precedentemente, ai sensi del decreto 18/2023, per "acque destinate al consumo umano" si intendono (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023):

- «tutte le acque, trattate o non trattate, destinate a uso potabile, per la preparazione di cibi, bevande o per 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»;
- «tutte le acque utilizzate nell'ambito delle imprese alimentari e incorporate negli alimenti o nei prodotti destinati al consumo umano durante le fasi di produzione,

trasformazione, preparazione, conservazione o commercializzazione».

Per essere definite conformi, «le acque destinate al consumo umano devono essere salubri e pulite». Per essere tali le acque devono soddisfare le seguenti condizioni (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023):

- «non devono contenere microorganismi, virus e parassiti, nè altre sostanze, in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana»;
- «devono soddisfare e rispettare tutti i valori limite fissati per i parametri microbiologici, chimici e gli indicatori stabiliti nell'allegato I, parti A, B e D»(D.Lgs. 18/2023 - Allegato I, 2023);
- devono rispettare i parametri nei punti di conformità e, in caso di accertata irregolarità, attuare tempestivamente interventi correttivi o, qualora necessario, limitazioni all'uso della risorsa idrica.

La verifica della conformità delle acque non è affidata a un unico ente, ma si articola in un sistema di responsabilità condivise. Per garantire il costante mantenimento degli standard di salubrità, il legislatore ha previsto due livelli di monitoraggio distinti e integrati tra loro: i controlli interni e i controlli esterni (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023).

- **Controlli interni:** ricadono sotto la diretta responsabilità del Gestore idrico. Essi rappresentano lo strumento operativo e preventivo fondamentale per la gestione della sicurezza idrica. La finalità di tali verifiche non è puramente analitica, ma mira a monitorare l'efficacia dei processi di trattamento e della rete di distribuzione, consentendo di individuare precocemente eventuali situazioni fuori norma o scenari ad alto rischio. Attraverso questi controlli, il gestore è in grado di determinare tempestivamente le cause di una potenziale contaminazione e di attuare le necessarie misure di intervento per ripristinare la qualità della risorsa prima che questa raggiunga l'utenza finale.
- **Controlli esterni:** costituiscono l'attività di vigilanza ufficiale e indipendente prevista dalla norma. La responsabilità di tali compiti è affidata alle Aziende Sanitarie Locali (ASL) territorialmente competenti, che operano a tutela della salute pubblica. L'obiettivo di tali controlli è verificare che le acque distribuite siano effettivamente conformi agli standard di legge, operando sulla base di specifici programmi di monitoraggio elaborati dalle Regioni e dalle Province Autonome. Tale attività di supervisione garantisce un ulteriore livello di protezione per il consumatore, assicurando che l'operato dei gestori idrici sia costantemente validato dall'autorità

sanitaria pubblica. I controlli esterni, quindi, non sono casuali ma seguono i programmi di controllo regionali, i quali stabiliscono frequenze e punti di prelievo strategici per mappare l'intero territorio.

Sotto il profilo tecnico-scientifico, il controllo della contaminazione microbiologica trova il suo fondamento negli Allegati I, II e III del Decreto.

- **ALLEGATO I:** rappresenta il riferimento tecnico fondamentale del decreto, in quanto stabilisce i valori di parametro e i requisiti di qualità necessari a garantire la salubrità e la pulizia delle acque destinate al consumo umano. Tale allegato è suddiviso in parte A, parte B, parte C e parte D. (D.Lgs. 18/2023 - Allegato I, 2023)
 - Parte A (parametri microbiologici): è la sezione più critica per la sicurezza immediata, in quanto stabilisce i requisiti di assenza assoluta per i principali indicatori di contaminazione (Tab. 1.1). L'obiettivo è prevenire epidemie di origine idrica causate da batteri, virus o parassiti.

| Parametro | Valore di parametro | Unità di misura |
|--------------------------|----------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | numero/100 ml (acque confezionate numero/250ml) |
| Enterococchi intestinali | 0 | numero/100 ml (acque confezionate numero/250ml) |

Tabella 1.1: Parametri microbiologici dell'Allegato I, parte A, del Decreto Legislativo 18/2023

- Parte B (parametri chimici): include le sostanze chimiche che hanno generalmente un impatto sulla salute a lungo termine, con i rispettivi valori di parametro e l'unità di misura.
- Parte C (Parametri indicatori): questi parametri non sono necessariamente indicativi di un rischio diretto per la salute, ma servono a monitorare l'efficacia dei trattamenti, lo stato delle condotte e l'accettabilità dell'acqua da parte del consumatore (caratteristiche organolettiche, parametri chimico-fisici, indicatori di processo). Tale parte descrive i parametri indicatori raccomandati per le acque sottoposte a trattamento di desalinizzazione.
- Parte D: tratta di parametri per la valutazione e gestione del rischio dei sistemi di distribuzione interni. E' la sezione innovativa introdotta per supportare la gestione degli edifici. Si concentra su due minacce specifiche che possono originarsi o peggiorare all'interno delle tubature domestiche: *Legionella* e Piombo.

- **ALLEGATO II:** disciplina le attività di controllo ordinario e di verifica, finalizzate a garantire un monitoraggio costante, sistematico e preventivo della risorsa idrica. Tali verifiche non si esauriscono in un controllo analitico finale, ma implicano un approccio più articolato: esse non si limitano a validare la conformità dell'acqua ai requisiti microbiologici e organolettici, ma fungono da indicatore critico sull'efficienza dei processi di potabilizzazione e disinfezione.

L'obiettivo primario è assicurare che i trattamenti applicati siano costantemente idonei al mantenimento dei valori di parametro prescritti, agendo come un sistema di allerta precoce contro potenziali contaminazioni.

I programmi di controllo devono riguardare l'intera filiera idropotabile (D.Lgs. 18/2023 - Allegato II, 2023):

- «i punti di prelievo delle acque superficiali e/o sotterranee da destinare al consumo umano»;
- «gli impianti di adduzione, di accumulo e di trattamento»;
- «le reti di distribuzione del gestore idro-potabile»;
- «le reti di distribuzione interna»;
- le cosiddette "case dell'acqua";
- «gli impianti di confezionamento, le acque confezionate e quelle utilizzate nelle imprese alimentari»;
- «le acque fornite mediante cisterna (fissa e mobile) e, ove necessario, l'idoneità delle strutture e dei mezzi di trasporto impiegati»;
- «ogni altra circostanza rilevante per la qualità delle acque destinate al consumo umano»;
- «l'efficacia della disinfezione, ove applicata, accertando che la contaminazione da presenza di sottoprodotti di disinfezione sia mantenuta al livello più basso possibile senza compromettere la disinfezione stessa».

Oltre ai controlli ordinari, il quadro normativo impone specifici controlli di verifica finalizzati all'accertamento integrale di ogni parametro di qualità previsto dal D. Lgs. 18/2023. Questa fase di monitoraggio, pilastro della tutela della salute pubblica, è essenziale per certificare la salubrità della risorsa idrica lungo tutto il suo percorso.

L'attuazione operativa è affidata alle Regioni e alle Province Autonome che, integrando le competenze di autorità sanitarie, ambientali e dei gestori idropotabili, elaborano programmi di controllo rigorosi basati sulla valutazione del rischio.

Tali programmi stabiliscono le modalità di analisi e campionamento necessarie alla verifica della conformità, articolandole in fasi d'intervento predefinite per garantire una risposta tempestiva in caso di non conformità (D.Lgs. 18/2023 - Allegato II, 2023).

- **ALLEGATO III:** definisce le specifiche tecniche per l'analisi dei parametri, con l'obiettivo di garantire che i risultati analitici ottenuti dai laboratori, sia pubblici che privati, siano affidabili, conformi, confrontabili e dotati di una precisione tale da tutelare efficacemente la salute pubblica (D.Lgs. 18/2023 - Allegato III, 2023)

L'allegato III si articola in due sezioni principali:

- Parte A (Metodi di analisi per i parametri microbiologici): indica i metodi di riferimento che devono essere obbligatoriamente utilizzati per rilevare la presenza di batteri e microrganismi. Vengono quindi definiti i Metodi ISO/EN per *Escherichia coli*, Enterococchi intestinali e conteggio delle colonie a 22°C e 36°C. L'adozione di metodi standardizzati è condizione necessaria per la validità legale e sanitaria del dato microbiologico.
- Parte B (Metodi di analisi per i parametri chimici e indicatori): non impone un metodo univoco, ma stabilisce i requisiti minimi di prestazione che ogni metodo scelto dal laboratorio deve soddisfare. I parametri principali sono l'incertezza di misura e il limite di quantificazione (LOQ). L'allegato riporta tabelle dettagliate che fissano le percentuali massime di incertezza consentite per ogni sostanza, garantendo che anche a concentrazioni infinitesimali il dato prodotto sia solido e rappresentativo del reale stato della risorsa.

In sintesi, l'Allegato III rappresenta la garanzia di qualità del dato: esso trasforma la rilevazione analitica in uno strumento di prova certo, minimizzando il rischio di falsi negativi o di errori di quantificazione che potrebbero compromettere la corretta valutazione del rischio sanitario.

1.3 *Escherichia coli* come indicatore di contaminazione fecale

1.3.1 Inquadramento tassonomico e caratteristiche biologiche

Escherichia coli (Fig. 1.1) è un batterio Gram-negativo appartenente al dominio *Bacteria*, phylum *Proteobacteria*, ordine *Enterobacterales*, famiglia delle *Enterobacteriaceae*, genere *Escherichia* (Basavaraju and Gunashree, 2022).

Dal punto di vista morfologico, *E. coli* si presenta come un bacillo di dimensioni comprese tra da 1 μm a 3 μm di lunghezza e circa da 0.4 μm a 0.7 μm di diametro.

E' un microrganismo (Basavaraju and Gunashree, 2022):

- Gram-negativo, con una parete cellulare caratterizzata da un sottile strato di peptidoglicano e una membrana esterna contenente il lipopolisaccaride (molecola responsabile di importanti proprietà antigeniche e di attività endotossica);
- asporigeno;
- generalmente mobile grazie alla presenza di flagelli peritrichi;
- aerobio-anaerobio facoltativo, in grado di crescere sia in presenza sia in assenza di ossigeno;
- in grado di fermentare il lattosio con produzione di acido e gas (caratteristica fondamentale per la sua identificazione nei terreni colturali selettivi e differenziali).

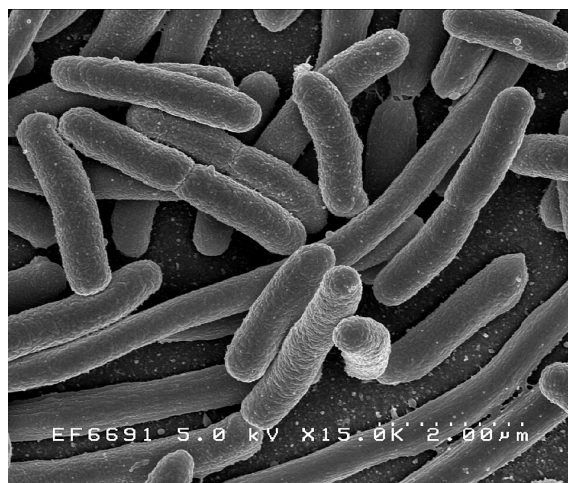


Figura 1.1: *Escherichia coli*. Fonte: NIAID (2002)

Il genoma di *E. coli* è costituito da un singolo cromosoma circolare; sono inoltre frequentemente presenti plasmidi, elementi genetici extracromosomici in grado di veicolare geni

di virulenza o di resistenza agli antibiotici.

La notevole plasticità genomica della specie contribuisce a un'ampia variabilità fenotipica tra i diversi ceppi, i quali possono comportarsi come commensali innocui o come patogeni opportunisti e obbligati (Rasko et al.).

Infatti, sebbene la maggior parte dei ceppi di *E. coli* costituisca parte integrante della normale microflora commensale dell'uomo, alcuni di essi hanno acquisito fattori di virulenza specifici che li rendono patogeni intracellulari o extracellulari.

Tali ceppi, definiti *E. coli diarrogenici (DEC)*, vengono classificati in patotipi distinti in base alla loro modalità di interazione con la mucosa intestinale e alla specifica produzione di tossine (Gomes et al., 2016).

- **Enterotossigeni, ETEC:** producono enterotossine termolabili (LT) e/o termostabili (ST) che alterano l'omeostasi idrosalina degli enterociti, determinando un'ipersecrezione dei liquidi. Sono i principali responsabili di diarrea acquosa nei bambini sotto i cinque anni nei Paesi in via di sviluppo e della cosiddetta "diarrea del viaggiatore".
- **Enteroemoraggici, EHEC:** a questo gruppo appartiene il noto sierotipo *E. coli* O157:H7. Questi ceppi producono tossine Shiga (Stx1, Stx2), capaci di inibire la sintesi proteica cellulare. Il quadro clinico può includere colite emorragica con possibile evoluzione in Sindrome Emolitico-Uremica, caratterizzata da anemia emolitica, trombocitopenia e insufficienza renale acuta.
- **Enteroinvasivi, EIEC:** invadono attivamente le cellule epiteliali del colon causando una sintomatologia simile alla dissenteria, con diarrea muco-ematica, febbre e forti dolori addominali. Questo patotipo è geneticamente e biochimicamente correlato al genere *Shigella*.
- **Enteropatogeni, EPEC:** provocano lesioni con distruzione dei microvilli intestinali e conseguente malassorbimento. Sono una causa rilevante di diarrea acquosa in età pediatrica.
- **Enteroaggreganti, EAEC:** si caratterizzano per una modalità di adesione aggregativa alla mucosa intestinale (spesso descritta come a "mattoni sovrapposti") e sono associati a forme di diarrea persistente sia nei bambini che negli adulti.

1.3.2 Patogenicità e dinamiche di trasmissione idrica

La rilevanza clinica ed epidemiologica di *E. coli*, nel contesto delle acque destinate al consumo umano, è strettamente legata alla diversità dei suoi meccanismi di virulenza e alla capacità di interagire con l'ospite attraverso il veicolo idrico.

Sebbene la specie sia prevalentemente un commensale innocuo, l'acquisizione di elementi genetici mobili, quali plasmidi e isole di patogenicità, conferisce ai ceppi diarrogenici (DEC) proprietà invasive e tossigeniche di notevole impatto alla salute pubblica.

Un parametro critico in tal senso è rappresentato dalla dose infettiva: mentre per molti patogeni enterici sono necessarie cariche batteriche elevate, alcuni ceppi come gli Enteromorragici (EHEC) presentano una dose infettiva estremamente ridotta, stimata tra le 10 e 100 unità cellulari (Basavaraju and Gunashree, 2022). Tale caratteristica giustifica il rigore della normativa vigente (D.Lgs. 18/2023), che impone l'assenza totale del microrganismo in 100 mL di campione, poiché anche una contaminazione minima può scatenare quadri clinici severi, come la Sindrome Emolitico-Uremica (SEU), una condizione sistemica grave caratterizzata da insufficienza renale acuta, anemia emolitica e trombocitopenia.

La diffusione di questi patogeni nell'ambiente segue un modello di trasmissione oro-fecale in cui l'acqua agisce come vettore primario. Il ciclo inizia con l'immissione di reflui zootecnici, essendo i ruminanti (in particolare i bovini) il principale serbatoio naturale asintomatico, o scarichi fognari civili nei corpi idrici superficiali e sotterranei, spesso a causa di fenomeni di run-off agricolo o inefficienze nei sistemi di depurazione. Una volta nell'ambiente idrico, i ceppi patogeni possono persistere a lungo, talvolta entrando in uno stato metabolico di quiescenza noto come VBNC (Viable But Non-Culturable); in questa condizione, pur non essendo rilevabili con le tecniche colturali standard, i batteri mantengono inalterato il proprio potenziale infettivo. La capacità di *E. coli* di organizzarsi in biofilm all'interno delle reti di distribuzione idrica ne aumenta ulteriormente la resistenza ai comuni trattamenti di disinfezione e ai fattori di stress ambientali (Basavaraju and Gunashree, 2022).

L'esposizione umana avviene, quindi, per ingestione diretta di acqua non adeguatamente trattata, per via ricreativa o attraverso la contaminazione crociata di alimenti irrigati o lavati con acque contaminate, rendendo il monitoraggio microbiologico un presidio fondamentale per la prevenzione di focolai epidemici di origine idrica.

1.3.3 Habitat naturale

L'habitat primario di *E. coli* è il tratto intestinale degli animali a sangue caldo, inclusi mammiferi e uccelli, dove rappresenta uno dei componenti più comuni della flora batterica intestinale (Jang et al., 2017).

Nell'intestino umano svolge generalmente un ruolo commensale, contribuendo attivamente a:

- la competizione biologica con microrganismi patogeni per i siti di adesione e i

nutrienti;

- la sintesi di vitamine essenziali (in particolare la vitamina K e alcune vitamine del gruppo B);
- il mantenimento dell'equilibrio dell'ecosistema microbico intestinale.

Al di fuori dell'organismo ospite, *E. coli* può essere rinvenuto in diverse matrici ambientali, tra cui:

- acque superficiali e sotterranee contaminate da materiale fecale;
- suolo (spesso a seguito di concimazioni con reflui zootecnici);
- alimenti di origine animale o vegetale soggetti a contaminazione crociata;
- reflui civili e zootecnici.

Tuttavia, la sua capacità di sopravvivenza nell'ambiente esterno è limitata nel tempo rispetto a quella nel tratto intestinale, poiché risente negativamente di fattori quali i raggi UV, le variazioni di temperatura e la carenza di nutrienti. Per questa ragione, il ritrovamento di *E. coli* nelle matrici ambientali, e in particolare nelle acque destinate al consumo umano, è considerato un indicatore elettivo e specifico di contaminazione fecale recente, segnalando un rischio potenziale per la salute pubblica (Jang et al., 2017).

1.3.4 Ruolo come indicatore igienico-sanitario

E. coli è considerato il principale indicatore di contaminazione fecale in ambito igienico-sanitario e ambientale. Il suo impiego come microrganismo indicatore si basa su precisi presupposti biologici ed ecologici:

- è regolarmente presente in concentrazioni elevate nel tratto intestinale degli animali a sangue caldo (incluso l'uomo);
- è normalmente assente in ambienti non contaminati da materiale fecale;
- è facilmente coltivabile, isolabile e identificabile attraverso protocolli di laboratorio standardizzati;
- la sua persistenza nelle matrici ambientali è paragonabile o leggermente inferiore a quella dei principali patogeni enterici di origine batterica, rendendolo un indicatore affidabile della loro potenziale presenza.

Per tali motivi, la ricerca di *E. coli* rappresenta un passaggio critico e obbligatorio nell'analisi delle acque destinate al consumo umano. La sua rilevazione segnala un rischio concreto di contaminazione da patogeni enterici trasmessi per via oro-fecale.

Come stabilito dai regolamenti sanitari nazionali (D.Lgs.18/2023) e internazionali (Linee guida OMS), *E. coli* costituisce il parametro microbiologico di riferimento per valutare la qualità igienica e la sicurezza delle acque potabili, fungendo da indicatore di efficacia dei processi di trattamento e disinfezione (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020).

1.3.5 Differenze tra *Escherichia coli* e gli altri coliformi

Il termine Coliformi indica un gruppo eterogeneo di batteri Gram-negativi, aerobio-anaerobi facoltativi, asporigeni, capaci di fermentare il lattosio con produzione di acido e gas a 35-37°C. Questo gruppo comprende, oltre a *E. coli*, generi come:

- *Enterobacter*
- *Klebsiella*
- *Citrobacter*

I Coliformi totali includono sia specie ambientali sia specie fecali; la loro rilevazione serve a valutare la qualità microbiologica generale ma non sempre indica contaminazione fecale recente.

Le principali differenze tra *E. coli* e gli altri Coliformi sono:

- Specificità fecale:
 - *E. coli* è considerato un coliforme fecale specifico, strettamente associato all'intestino degli animali a sangue caldo.
 - Altri coliformi possono essere presenti anche in ambiente (suolo, vegetazione, acque non contaminate), senza necessariamente indicare contaminazione fecale diretta.
- Temperatura di crescita (APAT - IRSA-CNR, 2003):
 - *E. coli* è in grado di crescere e fermentare il lattosio anche a temperature più elevate (44-45°C), caratteristica termotollerante utilizzata in laboratorio per distinguerlo dai coliformi ambientali più sensibili al calore.
- Significato sanitario (World Health Organization, 2017):

- La presenza di *E. coli* è un indicatore specifico di contaminazione fecale recente.
 - La presenza di coliformi totali fornisce informazioni sullo stato igienico generale di acque e alimenti e può evidenziare problemi di trattamento o disinfezione, senza implicare necessariamente contaminazione fecale diretta.
- Ruolo patogeno:
 - Alcuni ceppi di *E. coli* possono essere patogeni per l'uomo.
 - Gli altri coliformi sono generalmente opportunisti, più raramente associati a infezioni enteriche primarie.

Infine *E. coli* rappresenta un microrganismo di fondamentale importanza in microbiologia clinica, ambientale e alimentare.

La sua duplice natura, commensale intestinale e potenziale patogeno, unita alla stretta associazione con la contaminazione fecale, ne giustifica il ruolo centrale come indicatore igienico-sanitario.

La distinzione tra *E. coli* e gli altri coliformi è essenziale per una corretta interpretazione dei dati microbiologici nei controlli di qualità delle acque e degli alimenti (World Health Organization, 2017).

1.4 Metodi microbiologici per la ricerca di *Escherichia coli*

La determinazione di *E. coli* rappresenta un parametro fondamentale nella valutazione della qualità microbiologica di acque, alimenti e matrici ambientali, in quanto tale microrganismo è riconosciuto come il principale indicatore di contaminazione fecale (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020).

I metodi disponibili per l'identificazione e quantificazione di *E. coli* possono essere suddivisi in metodi colturali tradizionali, metodi enzimatici rapidi e metodi molecolari.

- **Metodi colturali:** si basano sulla capacità di *E. coli* di crescere su terreni selettivi e differenziali e di fermentare il lattosio con produzione di acido e gas, caratteristica condivisa con il gruppo dei coliformi. Tra i principali metodi colturali si distinguono:
 - **Metodo del Numero Più Probabile (MPN):** è una tecnica statistica basata su inoculi seriali in terreni liquidi lattosati e sulla valutazione della produzione di gas. E' ancora utilizzata per matrici complesse o torbide, dove la filtrazione può risultare difficoltosa (APHA, AWWA, WEF, 2017).
 - **Semina su terreni selettivi e differenziali:** utilizzo di terreni come MacConkey o Eosin Methylene Blue (EMB) Agar, che permettono differenziazione dei batteri lattosio-fermentanti attraverso variazioni cromatiche delle colonie (APHA, AWWA, WEF, 2017).
 - **Filtrazione su membrana:** è un metodo quantitativo ampiamente adottato nel controllo delle acque, basato sulla ritenzione dei microrganismi su una membrana filtrante, seguita dall'incubazione della membrana su un terreno selettivo, generalmente il Chromogenic Coliform Agar (CCA) (ISO 9308-1, 2017) (APHA, AWWA, WEF, 2017).

I metodi colturali rappresentano tuttora il riferimento normativo in ambito igienico-sanitario, in quanto consentono l'enumerazione delle Unità Formanti Colonia (UFC), parametro richiesto dalle normative europee sulle acque destinate al consumo umano (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020), (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023).

- **Metodi enzimatici rapidi:** si basano sulla rilevazione di attività biochimiche specifiche e caratteristiche di *E. coli*. Il sistema si basa sull'utilizzo di due enzimi chiave (Sarhan and Foster, 1991):
 - **Beta-D-galattosidasi:** è l'enzima caratteristico del gruppo dei Coliformi. La sua presenza viene rilevata attraverso l'idrolisi di un substrato cromogeni-

co (solitamente l'ONPG), che provoca un viraggio di colore del campione (generalmente verso il giallo);

- **Beta-D-glucuronidasi:** è l'enzima generalmente specifico per *E. coli* (presente in circa il 97% dei ceppi). La sua attività viene evidenziata utilizzando substrati fluorogenici (come il MUG): l'idrolisi di tale molecola sprigiona un prodotto fluorescente visibile se esposto a luce ultravioletta.

L'impiego di questi substrati definiti consente un'identificazione simultanea e specifica: la comparsa del colore indica la presenza di Coliformi, mentre la contestuale fluorescenza conferma la presenza di *E. coli*. Grazie alla loro elevata sensibilità e alla facilità di lettura, tali metodi sono ampiamente utilizzati come test di screening preliminare (Sarhan and Foster, 1991).

- **Metodi molecolari:** rappresentano uno strumento estremamente sensibile e specifico per l'identificazione di *E. coli*, basandosi sull'analisi diretta degli acidi nucleici (DNA) del microrganismo. A differenza dei metodi colturali, queste tecniche non richiedono la vitalità della cellula e offrono risultati in tempi molto rapidi. La tecnica di elezione è la PCR (Polymerase Chain Reaction), che permette l'identificazione specifica mediante l'amplificazione di geni target altamente conservati (Silva and Domingues, 2015).

I più utilizzati in ambito diagnostico e di ricerca sono (Silva and Domingues, 2015):

- Gene *uidA*: codifica l'enzima β -D-glucuronidasi. È il bersaglio principale per la conferma molecolare della specie *E. coli*.
- Gene *lacZ*: codifica la β -D-galattosidasi, utilizzato per il rilevamento del gruppo dei coliformi.
- Geni di virulenza (es. *stx1*, *stx2*, *eaeA*): essenziali per distinguere i ceppi commensali da quelli patogeni (come gli EHEC o gli EPEC) identificandone il potenziale tossigenico.

L'evoluzione di questa tecnica, la Real-Time PCR (qPCR), consente inoltre la quantificazione della carica microbica in tempo reale, aumentando ulteriormente la precisione dell'analisi. Nonostante l'elevato costo delle apparecchiature, i metodi molecolari sono oggi indispensabili per studi epidemiologici e per la gestione rapida di eventuali emergenze di contaminazione delle reti idriche (Silva and Domingues, 2015).

I metodi enzimatici rapidi e i metodi molecolari presentano un'elevata sensibilità e specificità, ma non consentono di distinguere cellule vitali da cellule non vitali e non sono

generalmente adottati come metodi ufficiali di riferimento nel controllo normativo delle acque potabili.

Infatti, nonostante la disponibilità di questi metodi, la filtrazione su membrana, secondo la norma ISO 9308-1, rappresenta ancora il metodo gold standard per la determinazione di *E. coli* nelle acque potabili, grazie alla sua affidabilità, riproducibilità e riconoscimento normativo (ISO 9308-1, 2017).

La scelta del metodo più appropriato dipende dalla matrice utilizzata, dall'obiettivo dell'indagine e dal contesto normativo di riferimento.

1.4.1 Metodo ISO 9308-1:2017

Nel controllo microbiologico delle acque destinate al consumo umano, il metodo di riferimento per la determinazione e l'enumerazione di *E. coli* è descritto nella norma ISO 9308-1:2017. Tale metodica prevede la filtrazione su membrana seguita da incubazione su un terreno cromogenico selettivo (ISO 9308-1, 2017).

Il metodo si articola nelle seguenti fasi operative (ISO 9308-1, 2017):

- Filtrazione: un volume noto di campione (solitamente 100 mL per le acque potabili) viene filtrato attraverso una membrana sterile con porosità di 0.45 micrometri. Questa fase permette di trattenere i microrganismi sulla superficie della membrana.
- Semina: la membrana viene trasferita sulla superficie del terreno cromogenico selettivo (Chromogenic Coliform Agar - CCA). Il CCA è un terreno selettivo che inibisce la crescita dei batteri Gram-positivi e di molti microrganismi non target.
- Incubazione: le piastre vengono incubate ad una temperatura controllata;
- Enumerazione e Differenziazione: al termina dell'incubazione, si procede al conteggio delle colonie; differenziate in base alla loro attività enzimatica e al conseguente viraggio di colore (Fig. 1.2) :
 - β -D-galattosidasi: rileva i Coliformi totali, i quali producono colonie di colore rosa/rosso.
 - β -D-glucuronidasi: rileva *E. coli*. Le colonie di *E. coli* assumono tipicamente una colorazione blu-viola.

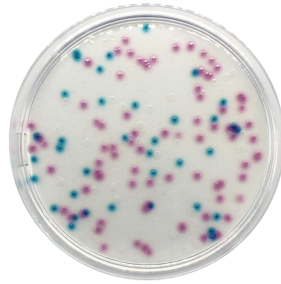


Figura 1.2: Differenziazione di *E. coli* (colonie blu) dai Coliformi totali (colonie rosse).
Fonte: Generon S.r.l. (2024)

Il metodo ISO 9308-1 trova ampia applicazione in diversi ambiti della sanità pubblica e della tutela ambientale, tra cui (ISO 9308-1, 2017):

- il controllo periodico delle acque destinate al consumo umano (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020);
- il monitoraggio della qualità delle acque superficiali e sotterranee;
- la verifica dell'efficacia dei trattamenti di potabilizzazione e disinfezione;
- l'esecuzione di controlli ufficiali da parte delle autorità ambientali come ARPA o ASL.

Questo metodo presenta diversi vantaggi:

- Elevata sensibilità e accuratezza: permette la quantificazione precisa anche di poche Unità Formanti Colonie (UFC) in volumi di acqua significativi;
- Analisi di grandi volumi: la tecnica della filtrazione consente di processare volumi elevati di campioni aumentando la probabilità di rilevare contaminazioni sporadiche;
- Differenziazione simultanea tra *E. coli* e Coliformi totali;
- Conformità ai requisiti imposti dalle normative europee (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020) e dal D.Lgs. 18/2023 (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023).

Tuttavia questo metodo presenta anche dei limiti:

- Tempo di risposta non immediato (18-24 ore di incubazione);
- Possibile interferenza in campioni con elevata torbidità;

- Il metodo identifica la specie *E. coli* come indicatore di contaminazione, ma non permette di distinguere tra ceppi commensali e ceppi patogeni (es. EHEC), per i quali sarebbero necessari ulteriori test molecolari;
- Necessita di ambienti di laboratorio controllati, strumentazione specifica e personale tecnico qualificato.

1.5 Rilevanza del monitoraggio ambientale

Il monitoraggio ambientale rappresenta uno strumento fondamentale per la tutela della salute pubblica, in quanto consente di individuare precocemente la presenza di contaminazioni microbiche e di valutare l'efficacia dei sistemi di trattamento e di prevenzione. Nel caso di *E. coli*, la sua rilevazione in acque superficiali, potabili fornisce un indicatore affidabile della presenza di materiale fecale proveniente da esseri umani o animali a sangue caldo (World Health Organization, 2017).

Il monitoraggio ambientale ha diversi obiettivi principali:

1. **Valutazione della qualità delle acque:** la determinazione di *E. coli* e Coliformi totali permette di classificare le acque in base al rischio microbiologico, garantendo il rispetto dei limiti normativi nazionali ed europei (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020);
2. **Prevenzione di focolai sanitari:** l'identificazione tempestiva di contaminazioni riduce il rischio di malattie di origine fecale, come gastroenteriti e infezioni da ceppi patogeni di *E. coli* (World Health Organization, 2017);
3. **Verifica dell'efficacia dei trattamenti:** le operazioni di potabilizzazione, depurazione o gestione delle acque possono essere valutate confrontando i dati di *E. coli* prima e dopo il trattamento (ISO 9308-1, 2017);
4. **Supporto alla gestione ambientale e decisioni regolatorie:** i dati ottenuti attraverso il monitoraggio permettono alle autorità competenti di adottare misure di emergenza, migliorare le infrastrutture idriche e definire strategie di gestione sostenibile delle risorse idriche (World Health Organization, 2017).

Il monitoraggio ambientale assume, quindi, un ruolo strategico non solo per la protezione della salute pubblica, ma anche per la tutela ecologica, poichè evidenzia la contaminazione fecale che può influenzare gli ecosistemi acquatici e la biodiversità.

In questo contesto l'uso di metodi standardizzati, come la filtrazione su membrana con incubazione su Chromogenic Coliform Agar, secondo ISO 9308-1, permette di ottenere dati affidabili, confrontabili e riproducibili a livello nazionale ed internazionale.

Capitolo 2

SCOPO DEL LAVORO

Durante il mio internato di tesi, svolto tra settembre 2025 e marzo 2026 presso il laboratorio di microbiologia dell'azienda TeaLab, situata a Rho, ho avuto l'opportunità di approfondire le metodologie utilizzate per le analisi microbiologiche su campioni di acqua destinata al consumo umano.

Nel laboratorio sono state eseguite analisi, seguendo le norme dell'Allegato I del Decreto Legislativo 18/2023, per la rilevazione di Enterococchi intestinali ed *E. coli*. Nello specifico, però, il mio lavoro si è focalizzato sulla ricerca e quantificazione di *Escherichia coli* come indicatore elettivo e specifico di contaminazione fecale, seguendo le procedure standardizzate della normativa vigente.

L'obiettivo è stato verificare la conformità dei campioni di acqua destinata al consumo umano rispetto ai limiti di legge imposti dal Decreto Legislativo 18/2023, garantendo così che l'acqua analizzata fosse priva di microrganismi pericolosi.

Questo tipo di sorveglianza regolare è fondamentale per prevenire la diffusione di malattie idro-trasmesse e per permette interventi correttivi immediati in caso di non conformità, salvaguardando il benessere della comunità.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

Le analisi microbiologiche, condotte sui campioni di acque destinate al consumo umano, hanno lo scopo di verificare la conformità ai requisiti di potabilità stabiliti dalla Direttiva (UE) 2020/2184 e dal relativo recepimento nazionale, il D.Lgs 18/2023. Tali disposizioni fissano per *Escherichia coli* un valore parametrico rigoroso, pari a 0 Unità Formanti Colonia (UFC) in 100 mL di campione (Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea, 2020), (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023).

Le fasi di prelievo, trasporto e conservazione dei campioni devono essere eseguite in stretto accordo con le norme tecniche internazionali per garantire l'imparzialità e la ripetibilità del dato. Nello specifico, la norma UNI EN ISO 19458 definisce le linee guida per la pianificazione delle attività e le modalità operative di prelievo, finalizzate a preservare l'integrità microbiologica del campione fino al momento dell'analisi in laboratorio (ISO 19458, 2006).

Al fine di assicurare l'affidabilità del dato analitico, i criteri di selezione dei punti di campionamento rispondono ai requisiti di rappresentatività del sistema idrico, stabiliti dalla serie ISO 5667 (parte 1 e 2) e dalle specifiche indicazioni della ISO 5667-5 relative alle acque destinate al consumo umano (ISO 5667-1, 2020), (ISO 5667-2, 1991), (ISO 5667-5, 2017).

Tali standard impongono che le operazioni siano condotte da personale qualificato e in condizioni di stabilità ambientale, riducendo al minimo le variabili che potrebbero alterare i risultati. Per la raccolta dei campioni devono essere utilizzati contenitori sterili in polipropilene (o materiale plastico equivalente) dotati di chiusura ermetica.

Il protocollo standard prevede il prelievo di un volume standard di 1L per ogni punto di campionamento. Tale quantità è definita dalle linee guida come idonea a garantire la copertura dei parametri analitici previsti, in conformità con le procedure di routine che prescrivono la filtrazione di aliquote da 100 mL per la ricerca e il conteggio di microrganismi indicatori, quali *E. coli* (ISO 9308-1, 2017).

3.1 Sito di studio e provenienza dei campioni

Nel presente lavoro è stata effettuata la ricerca e l'enumerazione di *E. coli* in campioni di acqua destinata al consumo umano attraverso il metodo della filtrazione su membrana, in conformità a quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 9308-1:2017 (ISO 9308-1, 2017). Lo studio ha carattere sperimentale e si basa sulle attività di monitoraggio e analisi microbiologica condotte in prima persona durante un periodo di internato di sei mesi. L'indagine è stata focalizzata sul controllo ordinario delle acque destinate al consumo umano, seguendo l'intero iter analitico, dall'acquisizione del campione alla processazione dei dati. L'attività ha interessato un arco temporale di sei mesi, durante i quali sono stati esaminati complessivamente 180 campioni prelevati da diverse aree del territorio nazionale.

In particolare i campioni provengono da:

- impianti di trattamento e potabilizzazione;
- punti terminali della rete di distribuzione (utenze pubbliche e private).

I dettagli relativi all'identificazione del campione, al punto di prelievo, alla data e al volume analizzato sono riportati nella seguente tabella (Tab. tables 3.1 to 3.6):

| N° campione | Punto di prelievo | Data | Volume |
|--------------------|--|-------------|---------------|
| 090203 | RSA Sacra Monte uffici, Varese (VA) | 02/09/2025 | 100 mL |
| 090206 | Scuola dell'infanzia Monti e Roveda, Legnano (MI) | 02/09/2025 | 100 mL |
| 090208 | Residenza Sentiero d'Argento, Sozzago (NO) | 02/09/2025 | 100 mL |
| 090209 | Ospedale Sant'Anna mensa, Como (CO) | 02/09/2025 | 100 mL |
| 090210 | Comando Provinciale Carabinieri, Como (CO) | 02/09/2025 | 100 mL |
| 090323 | Università di Pisa mensa centrale, Pisa (PI) | 03/09/2025 | 100 mL |
| 090426 | Residenza Sacro Cuore cucina, Vernante (CN) | 04/09/2025 | 100 mL |
| 090510 | RSA La Casa del Sorriso cucina, Mombasiglio (CN) | 05/09/2025 | 100 mL |
| 090512 | RSA Don Matteo Zanetto cucina, Ponderano (BI) | 05/09/2025 | 100 mL |
| 090514 | Scuola dell'infanzia S. Pertini cucina, Ponderano (BI) | 05/09/2025 | 100 mL |
| 090918 | Scuola primaria Giovanni XXIII cucina, Luisago (CO) | 09/09/2025 | 100 mL |
| 091117 | Asilo Lavena Ponte Tresa cucina, Lavena Ponte Tresa (VA) | 11/09/2025 | 100 mL |
| 091121 | Casa di riposo Sandro Pertini cucina, Garbagnate Milanese (MI) | 11/09/2025 | 100 mL |
| 091636 | Scuola Secondaria Ungaretti cucina, Pedemonte (GE) | 16/09/2025 | 100 mL |
| 091640 | Scuola Primaria De Amicis cucina, Ospedaletti (IM) | 16/09/2025 | 100 mL |
| 091757 | Casa di riposo Fondazione Filippo Mantovani, Mirabello (FE) | 17/09/2025 | 100 mL |
| 091761 | Scuola primaria Parini cucina, Cassano Magnago (VA) | 17/09/2025 | 100 mL |
| 091812 | Trench Italia (ex Magrini) mensa, Cairo Montenotte (SV) | 18/09/2025 | 100 mL |
| 091815 | Scuola primaria Cesolo cucina, San Severino Marche (MC) | 18/09/2025 | 100 mL |
| 091836 | Scuola primaria Sperandei cucina, Camerano (AN) | 18/09/2025 | 100 mL |
| 091837 | Scuola dell'infanzia Il Gabbiano cucina, Sirolo (AN) | 18/09/2025 | 100 mL |
| 092219 | Istituto zooprofilattico sperimentale mensa, Brescia (BS) | 22/09/2025 | 100 mL |
| 092323 | Ospedale nuovo di Legnano mensa, Legnano (MI) | 23/09/2025 | 100 mL |
| 092418 | Scuola primaria Madre Teresa di Calcutta, Senago (MI) | 24/09/2025 | 100 mL |
| 092420 | Scuola dell'infanzia G. Rodari cucina, Senago (MI) | 24/09/2025 | 100 mL |
| 092424 | Scuola dell'infanzia M. Montessori cucina, Senago (MI) | 24/09/2025 | 100 mL |
| 092429 | Scuola primaria Casalmaggiore cucina, Casalmaggiore (CR) | 24/09/2025 | 100 mL |
| 092430 | Scuola primaria Vicomosciano cucina, Casalmaggiore (CR) | 24/09/2025 | 100 mL |
| 092514 | Scuola primaria Villastrada mensa, Cingoli (MC) | 25/09/2025 | 100 mL |
| 093005 | RSA Zirotti mensa, Sale Marasino (BS) | 30/09/2025 | 100 mL |

Tabella 3.1: Tabella completa dei campioni analizzati a Settembre.

| N° campione | Punto di prelievo | Data | Volume |
|--------------------|---|-------------|---------------|
| 100114 | Scuola Elementare San Nicolò mensa, Piacenza (PC) | 01/10/2025 | 100 mL |
| 100119 | Centro polifunzionale Corsini mensa, Pellegrino Parmense (PR) | 01/10/2025 | 100 mL |
| 100315 | Sarpom Raffinerie Trecate, San Martino Novara (NO) | 03/10/2025 | 100 mL |
| 100328 | Istituto M. Immacolata mensa, Gorgonzola (MI) | 03/10/2025 | 100 mL |
| 100330 | Fondazione Porta Spinola cucina, Mariano Comense (CO) | 03/10/2025 | 100 mL |
| 100332 | Adare Pharmaceutical mensa, Pessano con Bornago (MI) | 03/10/2025 | 100 mL |
| 100602 | Ospedale e Fondazione Macchi mensa, Varese (VA) | 06/10/2025 | 100 mL |
| 100707 | Scuola dell'Infanzia Francesconi mensa, Gazola (PC) | 07/10/2025 | 100 mL |
| 100708 | Scuola elementare e dell'Infanzia, Sarmato (PC) | 07/10/2025 | 100 mL |
| 100710 | Istituto Gaudenzio di Pagave mensa, Novara (NO) | 07/10/2025 | 100 mL |
| 100805 | X-factor forum, Assago (MI) | 08/10/2025 | 100 mL |
| 100903 | Terna rete S.P.A. camin mensa, Padova (PD) | 09/10/2025 | 100 mL |
| 101005 | Rsa San Villa Fortunato mensa, Casal Carmelli (AL) | 10/10/2025 | 100 mL |
| 101019 | Comando Carabinieri mensa, Rieti (RI) | 10/10/2025 | 100 mL |
| 101309 | Fondazione Porta Spinola cucina, Mariano Comense (CO) | 13/10/2025 | 100mL |
| 101312 | Centro Radiologico Monzino mensa, Milano (MI) | 13/10/2025 | 100 mL |
| 101512 | Scuola Primaria Gargallo mensa, Gargallo (NO) | 15/10/2025 | 100 mL |
| 101613 | Comando Carabinieri mensa, Sesto San Giovanni (MI) | 16/10/2025 | 100 mL |
| 101728 | Asilo nido arcobaleno cucina, Cantù (CO) | 17/10/2025 | 100 mL |
| 102005 | Rsa Andreoli cucina, Borgonovo Val Tidone (PC) | 20/10/2025 | 100 mL |
| 102106 | Rsa Villa San Fortunato cucina, Casal Carmelli (AL) | 21/10/2025 | 100 mL |
| 102110 | Trench Italia (ex Magrini) mensa, Cairo Montenotte (SV) | 21/10/2025 | 100mL |
| 102219 | Terna rete S.P.A. camin mensa, Padova (PD) | 22/10/2025 | 100 mL |
| 102304 | Presidio Ospedaliero Rho mensa, Rho (MI) | 23/10/2025 | 100 mL |
| 102408 | Ospedale Rsa Don Garneri cucina, Carrù (CN) | 24/10/2025 | 100 mL |
| 102429 | Ospedale Maggore Policlinico Mangiagalli, Milano (MI) | 24/10/2025 | 100 mL |
| 102727 | Clinica Humanitas mensa, Rozzano (MI) | 27/10/2025 | 100 mL |
| 102808 | Multimedica S.S.Giovanni mensa, S.S. Giovanni (MI) | 28/10/2025 | 100 mL |
| 102919 | Rsa La Residenza cucina, Brescia (BS) | 29/10/2025 | 100 mL |
| 103113 | Fondazione Don Gnocchi cucina, Legnano (MI) | 31/10/2025 | 100 mL |

Tabella 3.2: Tabella completa dei campioni analizzati a Ottobre.

| N° campione | Punto di prelievo | Data | Volume |
|--------------------|--|-------------|---------------|
| 110302 | Terna Rete S.P.A. uffici, Pero (MI) | 03/11/2025 | 100 mL |
| 110303 | Terna Rete S.P.A. uffici, Pero (MI) | 03/11/2025 | 100 mL |
| 110538 | Terna Rete S.P.A. mensa, Brugherio (MB) | 05/11/2025 | 100 mL |
| 110539 | Cm1054 Centro diagnostico mensa, Milano (MI) | 05/11/2025 | 100 mL |
| 110543 | Comando Carabinieri mensa, Brescia (BS) | 05/11/2025 | 100 mL |
| 110547 | Terna Rete S.P.A. Genova mensa, Genova (GE) | 05/11/2025 | 100mL |
| 110615 | Scuola dell'Infanzia cucina, Diano Marina (IM) | 06/11/2025 | 100 mL |
| 110620 | Piaggio mensa, Villanova D'Albenga (SV) | 06/11/2025 | 100mL |
| 110704 | Azienda Ospedaliera San Carlo Borromeo, Milano (MI) | 07/11/2025 | 100 mL |
| 111011 | Fondazione Domus E.d.e.r.a. cucina, Fontanella (BG) | 10/11/2025 | 100 mL |
| 111113 | Collegio Paolo VI, Milano (MI) | 11/11/2025 | 100 mL |
| 111327 | Ospedale di Bollate mensa, Bollate (MI) | 13/11/2025 | 100 mL |
| 111481 | Vigili del fuoco Comando Provinciale mensa, Como (CO) | 14/11/2025 | 100 mL |
| 111409 | Rsa La Residenza cucina, Brescia (BS) | 14/11/2025 | 100 mL |
| 111703 | Scuola Elementare Ferrazzi Cova cucina, Busto Garolfo (MI) | 17/11/2025 | 100 mL |
| 111828 | Terna Rete S.P.A. Campochiesa mensa, Albenga (SV) | 18/11/2025 | 100 mL |
| 111829 | Terna Rete S.P.A. Campochiesa mensa, Albenga (SV) | 18/11/2025 | 100 mL |
| 111944 | Ospedale di Abbiategrasso cucina, Abbiategrasso (MI) | 19//2025 | 100 mL |
| 111947 | Fondazione Casa di Riposo, Abbiategrasso (MI) | 19/11/2025 | 100 mL |
| 112061 | Humanitas San Pio X mensa, Milano (MI) | 20/11/2025 | 100 mL |
| 112137 | Ospedale Tradate mensa, Tradate (VA) | 21/11/2025 | 100 mL |
| 112421 | Rsa Leopardi cucina, Parabiago (MI) | 24/11/2025 | 100 mL |
| 112624 | Rsa Camelot cucina, Borgonovo Val Tidone (PC) | 26/11/2025 | 100 mL |
| 112626 | Rsa Andreoli cucina, Borgonovo Val Tidone (PC) | 26/11/2025 | 100 mL |
| 112716 | Comando Carabinieri mensa, Sarzana (SP) | 27/11/2025 | 100 mL |
| 112719 | Azienda Ospedaliera Desio mensa, Desio (MB) | 27/11/2025 | 100 mL |
| 112725 | Futurho mensa, Nerviano (MI) | 27/11/2025 | 100 mL |
| 112803 | Yves Saint Laurent mensa, Vigonza (PD) | 28/11/2025 | 100 mL |
| 112826 | Scuola Primaria Vanzago mensa, Vanzago (MI) | 28/11/2025 | 100 mL |
| 112834 | Scuola dell'Infanzia mensa, Vanzago (MI) | 28/11/2025 | 100 mL |

Tabella 3.3: Tabella completa dei campioni analizzati a Novembre.

| N° campione | Punto di prelievo | Data | Volume |
|--------------------|---|-------------|---------------|
| 120257 | Centro polivalente Anziani, Cusano Milanino (MI) | 02/12/2025 | 100 mL |
| 120372 | Scuola Materna mensa, Monteu Roero (CN) | 03/12/2025 | 100mL |
| 120375 | Humanitas Centro Catanese mensa, Misterbianco Catania (CT) | 03/12/2025 | 100mL |
| 120377 | Scuola Elementare Villanova mensa, Villanova (MB) | 03/12/2025 | 100 mL |
| 120386 | Yves Saint Laurent mensa, Vigonza (PD) | 03/12/2025 | 100 ml |
| 120529 | Casa di Riposo Rsa Giovanni Paolo Melzo, Melzo (MI) | 05/12/2025 | 100 mL |
| 120536 | Fondazione Madonna del Corlo Onlus, Lonato del Garda (BS) | 05/12/2025 | 100mL |
| 121165 | Centro Cottura Villa Letizia cucina, Civitanova Marche (MC) | 11/12/2025 | 100 mL |
| 121171 | Casa di Riposo Arona cucina, Arona (NO) | 11/12/2025 | 100 mL |
| 121175 | Ospedale Cannizzaro mensa, Catania (CT) | 11/12/2025 | 100 mL |
| 121176 | Ospedale di Cittadella cucina, Cittadella (PD) | 11/12/2025 | 100mL |
| 121215 | Rsa Sant'Andrea cucina, Monza (MB) | 12/12/2025 | 100 mL |
| 121228 | Fondazione Istituto Ospedaliero, Sospiro (CR) | 12/12/2025 | 100 mL |
| 121249 | Asilo Nido Comunale cucina, Desio (MB) | 12/12/2025 | 100 mL |
| 121263 | Casa per Anziani Mons. Craveri cucina, Fossano (CN) | 12/12/2025 | 100mL |
| 121517 | Rsa Sant'Andrea cucina, Monza (MB) | 15/12/2025 | 100mL |
| 121525 | Ist. Delle Figlie Di Santa Maria della Divina Provvidenza, Saronno (VA) | 15/12/2025 | 100mL |
| 121601 | Fondazione Istituto Ospedaliera Sospiro, Sospiro (CR) | 16/12/2025 | 100 mL |
| 121648 | Riello S.P.A. mensa, Volpago Del Montello (TV) | 16/12/2025 | 100 mL |
| 121702 | Bottega Veneta mensa, Milano (MI) | 17/12/2025 | 100 mL |
| 121709 | Rsa Casa Cambiaghi cucina, Monza (MB) | 17/12/2025 | 100mL |
| 121822 | Comando Provinciale dei Carabinieri, Milano (MI) | 18/12/2025 | 100 mL |
| 121831 | Casa Riposo Opera Pia S. Anna Sordella, Fasano (CN) | 18/12/2025 | 100mL |
| 121948 | Centro Firmian cucina, Bolzano (BZ) | 19/12/2025 | 100 mL |
| 121949 | Cm1711-Sun Chemical Group S.p.a. mensa, Caleppio (MI) | 19/12/2025 | 100 mL |
| 121956 | Ospedale Valduce cucina, Como (CO) | 19/12/2025 | 100 mL |
| 122314 | Comunità Alloggio Villa Santa Maria cucina, Brescia (BS) | 23/12/2025 | 100mL |
| 122932 | Fondazione "G.Scola", Besana Brianza (MB) | 29/12/2025 | 100 mL |
| 122937 | Rsa La Rosa D'Argento cucina, Ronco Briantino (MB) | 29/12/2025 | 100 mL |
| 122940 | Casa di Cura Igea, Milano (MI) | 29/12/2025 | 100 mL |

Tabella 3.4: Tabella completa dei campioni analizzati a Dicembre.

| N° campione | Punto di prelievo | Data | Volume |
|--------------------|---|-------------|---------------|
| 010201 | Rsa San Eusebio cucina, Camburzano (BI) | 02/01/2026 | 100 mL |
| 010207 | Fondazione Istituto Ospedaliero Sospiro, Sospiro (CR) | 02/01/2026 | 100 mL |
| 010705 | Università di Pisa mensa centrale, Pisa (PI) | 07/01/2026 | 100 mL |
| 010919 | Terna Rete S.P.A. dist. Camporosso mensa, Camporosso (IM) | 09/01/2026 | 100 mL |
| 010926 | Scuola Ufficiale Carabinieri mensa, Roma (RM) | 09/01/2026 | 100 mL |
| 010930 | Bistrò Educatt, Piacenza (PC) | 09/01/2026 | 100 mL |
| 010943 | Ospedale Santa Chiara cucina, Trento (TN) | 09/01/2026 | 100 mL |
| 011406 | Bosch Robert mensa, Milano (MI) | 14/01/2026 | 100 mL |
| 011419 | Casa di Cura Il Policlinico cucina, Milano (MI) | 14/01/2026 | 100 mL |
| 011527 | Casa di Riposo, Noventa Padovana (PD) | 15/01/2026 | 100 mL |
| 011547 | Comando Carabinieri mensa, Desio (MB) | 15/01/2026 | 100 mL |
| 011554 | Rsa Manzoni cucina, Roncadelle (BS) | 15/01/2026 | 100 mL |
| 011614 | Università di Pisa mensa centrale, Pisa (PI) | 16/01/2026 | 100 mL |
| 011623 | Itama S.P.A. mensa, Colzate (BG) | 16/01/2026 | 100 mL |
| 011673 | Vigili del Fuoco distaccamento aeroporto, Somma Lombardo (VA) | 16/01/2026 | 100 mL |
| 012032 | Istituto Auxologico San Luca mensa, Milano (MI) | 20/01/2026 | 100 mL |
| 012034 | Casa di Riposo, Noventa Padovana (PD) | 20/01/2026 | 100 mL |
| 012037 | Rsa Villa San Fortunato cucina, Genova (GE) | 20/01/2026 | 100 mL |
| 012118 | Casa di Riposo Don Cuni cucina, Magenta (MI) | 21/01/2026 | 100 mL |
| 012119 | Hotel Desenzano, Desenzano del Garda (BS) | 21/01/2026 | 100 mL |
| 012120 | Fondazione Vada Sabatia, Vado Ligure (SV) | 21/01/2026 | 100 mL |
| 012219 | Fondazione Ospedaliera Istituto Sospiro, Sospiro (CR) | 22/01/2026 | 100 mL |
| 012222 | Casa Anziani cucina, Varzo (VB) | 22/01/2026 | 100 mL |
| 012313 | Compagnia Carabinieri eur mensa, Roma (RM) | 23/01/2026 | 100 mL |
| 012316 | Centro di Riabilitazione, Genova (GE) | 23/01/2026 | 100 mL |
| 012338 | Residenza San Riccardo Pampuri cucina, Trivolzio (PV) | 23/01/2026 | 100mL |
| 012616 | Istituto Comprensivo Aldo Moro cucina, Corbetta (MI) | 26/01/2026 | 100 mL |
| 012627 | Fondazione Sospiro centro diurno, Sospiro (CR) | 26/01/2026 | 100 mL |
| 012725 | Rsa Sorbolo cucina, Sorbolo (PR) | 27/01/2026 | 100 mL |
| 013028 | Casa di Riposo I Glicini cucina, Bra (CN) | 30/01/2026 | 100 mL |

Tabella 3.5: Tabella completa dei campioni analizzati a Gennaio.

| N° campione | Punto di prelievo | Data | Volume |
|--------------------|---|-------------|---------------|
| 020216 | Rsa San Mauro cucina, Colorno (FR) | 02/02/2026 | 100 mL |
| 020223 | Vigili del Fuoco Lodi mensa, Lodi (LO) | 02/02/2026 | 100 mL |
| 020306 | Casa Protetta per Anziani Gaetano Luce, Genova (GE) | 03/02/2026 | 100 mL |
| 020307 | Comando Carabinieri Gardone mensa, Gardone Val Trompia (BS) | 03/02/2026 | 100 mL |
| 020434 | Villa Antea cucina, Vidigulfo (PV) | 02/04/2026 | 100mL |
| 020435 | Villa Antea cucina, Vidigulfo (PV) | 04/02/2026 | 100 mL |
| 020437 | Campus Mensa Università Parma, Parma (PR) | 04/02/2026 | 100 mL |
| 020539 | Rsa Lainate cucina, Lainate (MI) | 05/02/2026 | 100 mL |
| 020544 | Fondazione Angelo Magnani mensa, Veduggio (VA) | 05/02/2026 | 100 mL |
| 020603 | Caserma Falcinelli mensa, Ancona (AN) | 06/02/2026 | 100 mL |
| 020608 | Rsa ZIrotti cucina, Sale Marasino (BS) | 06/02/2026 | 100 mL |
| 020609 | Casa Balestrieri cucina, Brescia (BS) | 06/02/2026 | 100 mL |
| 020929 | Università degli Studi Genova cucina, Genova (GE) | 09/02/2026 | 100 mL |
| 020945 | Scuola Primaria Terruggia, Terruggia (AL) | 09/02/2026 | 100 mL |
| 021102 | Centro Anziani Anna Moretti Bonora, Camposampiero (PD) | 11/02/2026 | 100 mL |
| 021110 | Casa Protetta Campo Ligure, Campo Ligure (GE) | 11/02/2026 | 100 mL |
| 021254 | Rsa San Giulio cucina, Beregazzo con Figliaro (CO) | 12/02/2026 | 100 mL |
| 021257 | Scuola Primaria Mascherpa mensa, Solaro (MI) | 12/02/2026 | 100 mL |
| 021322 | Villa Norge cucina, Roccabianca (PR) | 13/02/2026 | 100 mL |
| 021330 | Comando Compagnia Clusone mensa, Clusone (BG) | 13/02/2026 | 100 mL |
| 021617 | Scuola Infanzia Lodi cucina, Mazzano (BS) | 16/02/2026 | 100 mL |
| 021851 | Comune di Passirano, Passirano (BS) | 18/02/2026 | 100 mL |
| 022026 | Istituto Zooprofilattico Lazio/Tosc, Roma (RM) | 20/02/2026 | 100 mL |
| 022041 | Henkel Spa mensa, Milano (MI) | 20/02/2026 | 100 mL |
| 022348 | Carabinieri Ventimiglia cucina, Ventimiglia (IM) | 23/02/2026 | 100 mL |
| 022427 | Casa di Riposo Marani cucina, Villorba (TV) | 24/02/2026 | 100 mL |
| 022739 | Rsa San Paolo cucina, Azzano San Paolo (BG) | 27/02/2026 | 100 mL |
| 022753 | Fondazione Don Gnocchi Palazzolo, Milano (MI) | 27/02/2026 | 100 mL |
| 022755 | Università Bocconi mensa, Milano (MI) | 27/02/2026 | 100 mL |
| 022774 | Rsa Centro Polifunzionale per Terza Età, Busto Arsizio (VA) | 27/02/2026 | 100 mL |

Tabella 3.6: Tabella completa dei campioni analizzati a Febbraio.

Tutte le acque analizzate dal laboratorio rientrano nella definizione di "acque destinate al consumo umano" ai sensi del Decreto Legislativo 18/2023, che stabilisce i requisiti di qualità e le modalità di monitoraggio delle acque potabili (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023).

3.1.1 Frequenza e modalità di campionamento

Le attività di campionamento non sono state eseguite direttamente dal laboratorio di analisi, bensì da personale tecnico qualificato appartenente ad una società esterna, formalmente incaricata dai gestori del servizio idrico.

La frequenza dei controlli microbiologici è stata definita in conformità al Decreto Legislativo 18/2023 risultando variabile in funzione di fattori quali:

- l'entità della popolazione servita;
- il volume di acqua erogato;
- le caratteristiche strutturali e gestionali della rete idrica e dei punti di prelievo;
- le eventuali specifiche prescrizioni delle autorità competenti.

Le operazioni di prelievo seguono le procedure operative standardizzate e le linee guida previste per le matrici destinate ad analisi microbiologiche, nel pieno rispetto delle prescrizioni normative e delle buone pratiche di campionamento. In conformità con quanto indicato dalla normativa tecnica (ISO 19458, 2006), i prelievi sono effettuati mediante campionamento puntuale (istantaneo), raccogliendo un volume di campione idoneo a garantire la rappresentatività e l'esecuzione di tutte le determinazioni analitiche previste.

Al fine di prevenire contaminazioni secondarie e preservare l'integrità del campione, le linee guida prevedono l'adozione delle seguenti precauzioni asettiche:

- Flussaggio: l'acqua deve essere lasciata scorrere per alcuni minuti per eliminare i ristagni nel tratto terminale della tubazione.
- Disinfezione: i protocolli prevedono la sanificazione del punto di erogazione prima del prelievo, operazione necessaria per abbattere la carica microbica ambientale superficiale.

Ogni contenitore è stato identificato in modo univoco tramite etichettatura e corredato da un verbale di prelievo dettagliato, documento indispensabile per la catena di custodia. Il verbale contiene:

- i dati anagrafici del committente e l'ubicazione esatta del punto di prelievo;

- cronologia delle operazioni (data e ora esatta) e nominativo dell'operatore;
- la tipologia della matrice d'acqua;
- le finalità dell'indagine.

3.1.2 Trasporto e conservazione dei campioni

Una volta prelevati, i campioni sono stati trasportati in laboratorio in condizioni controllate, mantenendo una temperatura compresa tra $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, al fine di limitare eventuali variazioni della carica microbica durante il trasporto (World Health Organization, 2024), (ISO 19458, 2006).

All'arrivo in laboratorio, i campioni sono stati accettati, registrati e conservati in frigorifero a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'analisi, protetti dalla luce e da fonti di calore, come raccomandato dalle linee guida operative per le acque potabili (GAI Ambiente, 2023).

Il tempo intercorso tra il campionamento e l'inizio delle analisi è stato mantenuto entro i limiti raccomandati dalle linee guida tecniche: preferibilmente entro le 12 ore e comunque non oltre il limite massimo di 18 ore (accettabile) (ISO 19458, 2006), (World Health Organization, 2024), (D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18, 2023).

La tempestività delle analisi è stata garantita per assicurare l'affidabilità e la rappresentatività dei risultati relativi a *E. coli*, utilizzato come parametro indicatore di contaminazione fecale.

3.2 Metodo di filtrazione su membrana

La determinazione qualitativa e quantitativa di *E. coli* è stata eseguita mediante la tecnica della filtrazione su membrana. Tale metodica rappresenta lo standard analitico d'elezione per il monitoraggio di acque a bassa carica microbica (come le acque destinate al consumo umano), in quanto permette di concentrare i microrganismi presenti in grandi volumi di campione su una superficie limitata, garantendo elevata sensibilità e precisione (ISO 9308-1, 2017), (Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR, 2022).

Il principio si basa sulla separazione fisica dei microrganismi attraverso una membrana filtrante in esteri di cellulosa con porosità standard di 0,45 µm. Tale diametro dei pori è idoneo a trattenere sulla superficie della membrana la quasi totalità dei batteri di interesse ambientale e sanitario (ISO 7704, 2023).

3.2.1 Procedura operativa

Un volume noto di campione (100 mL) è stato versato nell'imbutto del sistema di filtrazione, preventivamente sterilizzato per evitare contaminazioni crociate.

Tramite l'applicazione di un vuoto parziale controllato, il liquido attraversa la membrana, la quale funge da barriera meccanica trattenendo gli eventuali microrganismi sulla propria superficie.

Al termine della filtrazione, la membrana è stata prelevata aseptivamente con pinzette sterili e deposta delicatamente sulla superficie di un apposito terreno di coltura selettivo e differenziale (descritto nel paragrafo 3.2.4) in piastre Petri.

In questa fase, è stata posta particolare attenzione nell'evitare la formazione di bolle d'aria tra il filtro e l'agar, per garantire il contatto continuo tra i batteri e le fonti nutritive del terreno.

Il terreno di coltura solido consente:

- lo sviluppo di colonie isolate a partire dalle singole unità formanti colonia (UFC) trattenute;
- la differenziazione dei microrganismi in base alle loro caratteristiche biochimiche specifiche.

Questo metodo è raccomandato dagli standard ISO e dai manuali microbiologici per la conta di *E. coli* e coliformi in acque a bassa carica batterica, risultando affidabile, riproducibile e adatto ai monitoraggi periodici (ISO 9308-1, 2017), (ISO 7704, 2023), (Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR, 2022).

3.2.2 Incubazione e lettura

Le piastre sono state incubate in posizione capovolta, per prevenire la caduta di condensa sulla superficie del filtro, all'interno di un incubatore termostato (ISO 9308-1, 2017).

Durante l'incubazione, i nutrienti del terreno attraversano la membrana per capillarità, permettendo alle singole cellule vitali intrappolate di moltiplicarsi fino a formare Unità Formanti Colonie (UFC), macroscopicamente visibili (ISO 7704, 2023), (Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR, 2022).

Al termine del periodo di incubazione (le cui specifiche di tempo e temperatura dipendono dal terreno utilizzato), si è proceduto:

- all'osservazione e conteggio delle colonie basandosi sulla morfologia e sul colore;
- all'identificazione biochimica mediante substrati cromogenici specifici per determinati microrganismi target;

Questo metodo consente una quantificazione precisa dei microrganismi presenti nei campioni liquidi, come acque potabili o reflue, ed è raccomandato dagli standard internazionali ISO per l'analisi microbiologica delle acque (ISO 9308-1, 2017), (ISO 7704, 2023).

3.2.3 Materiali e strumentazione

L'esecuzione della metodica richiede l'impiego di una strumentazione specifica, mantenuta in condizioni di rigorosa asepsi per prevenire contaminazioni accidentali.

La strumentazione utilizzata per l'analisi è composta da:

- **Sistema di filtrazione** (Fig. 3.1) composto da:
 - un supporto per il filtro in acciaio o materiale autoclavabile;
 - un imbuto graduato sterile;
 - un sistema a depressione collegato ad una pompa da vuoto.



Figura 3.1: Sistema di filtrazione delle acque.

- **Membrane filtranti:** membrane sterili, solitamente in esteri misti di cellulosa, con diametro di 47 mm (Fig. 3.2). La superficie delle membrane è caratterizzata da una griglia di contrasto per agevolare l'enumerazione delle colonie e da una porosità standard di 0.45 μm , idonea alla ritenzione batterica.



Figura 3.2: Membrane filtranti.

- **Ambiente di lavoro:** le operazioni sono state condotte sotto cappa a flusso laminare (o in prossimità della fiamma di un becco Bunsen, Fig. 3.3) per garantire un ambiente microbiologicamente protetto.



Figura 3.3: Becco Bunsen.

- **Strumentazione ausiliaria:**
 - pinzette sterili (flambate, Fig. 3.4): utilizzate per la manipolazione delle membrane;



Figura 3.4: Pinzette sterili.

- incubatore termostato (Fig. 3.5): impostato alla temperatura specifica richiesta dal protocollo sperimentale;



Figura 3.5: Incubatore.

- Capsule Petri (Fig. 3.6): sterili, del diametro di 55 mm, pre-riempite con il terreno di coltura selettivo e cromogenico necessario per l'identificazione di *E. coli*.



Figura 3.6: Capsule Petri pre-riempite con terreno.

3.2.4 Terreni cromogenici

L'efficacia del metodo di filtrazione risiede nella specificità dei terreni cromogenici utilizzati, che consentono la differenziazione dei microrganismi target in base alla loro attività enzimatica.

Il terreno di elezione utilizzato in questo studio è il Chromogenic Coliform Agar (CCA), formulato in conformità alla norma ISO 9308-1 (ISO 9308-1, 2017).

Chromogenic Coliform Agar (CCA)

Il Chromogenic Coliform Agar è un terreno di coltura selettivo e differenziale, progettato per la ricerca e la conta simultanea di Coliformi totali ed *E. coli*.

Il terreno, formulato ai sensi della norma ISO 9308-1:2017, risulta particolarmente idoneo per l'analisi di matrici a bassa carica batterica, come le acque destinate al consumo umano, le acque di piscina e le acque minerali, dove è richiesta un'elevata sensibilità e specificità analitica.

La sua composizione è studiata per favorire il recupero di cellule microbiche stressate e

inibire lo sviluppo della flora batterica non target (ISO 9308-1, 2017).

Il terreno **Chromogenic Coliform Agar** contiene (Scharlab S.L., 2023), Tab. 3.7:

| Componente | Quantità(g/L) | Funzione |
|--------------------------|---------------|--|
| Peptone enzimatico | 1,0 | Fonte di azoto, aminoacidi e fattori di crescita |
| Estratto di lievito | 2,0 | Vitamine del gruppo B e fattori di crescita |
| Sodio cloruro | 5,0 | Mantenimento dell'equilibrio osmotico |
| Disodio idrogeno fosfato | 2,7 | Sistema tampone |
| Sodio diidrogeno fosfato | 2,2 | Sistema tampone |
| Sorbitolo | 1,0 | Fonte energetica fermentabile |
| Sodio piruvato | 1,0 | Recupero cellule stressate |
| Tergitol 7 | 0,15 | Agente selettivo |
| Salmon-GAL | 0,2 | Substrato cromogeno per β -D-galattosidasi |
| X-Glucuronide | 0,1 | Substrato cromogeno per β -D-glucuronidasi |
| Triptofano | 1,0 | Substrato per test dell'indolo |
| Agar | 13 | Agente solidificante |

Tabella 3.7: Composizione del Chromogenic Coliform Agar.

Tra i componenti nutritivi si ritrovano peptoni selezionati, sorbitolo e piruvato di sodio, che favoriscono un rapido sviluppo delle colonie e il recupero di cellule stressate o danneggiate (ad esempio da trattamenti termici o disinfezione). La presenza del piruvato, in particolare, contribuisce alla neutralizzazione di eventuali specie reattive dell'ossigeno, migliorando la resa di recupero batterico. Il cloruro di sodio fornisce il corretto ambiente osmotico necessario alla crescita.

Il terreno contiene inoltre il tergitolo (Tergitol 7), un tensioattivo anionico che esercita un'azione selettiva inibendo la crescita dei batteri Gram-positivi e di numerosi batteri Gram-negativi non target, consentendo così lo sviluppo preferenziale dei Coliformi e di *E. coli*. (Scharlab S.L., 2023)

La differenziazione è dovuta alla miscela cromogenica, composta da due substrati enzimatici:

- Salmon-GAL: viene scisso dall'enzima caratteristico presente nei coliformi, la β -D-galattosidasi, e conferisce una colorazione rosso salmone alle colonie di Coliformi.
- X-Glucuronide: viene scisso dall'enzima β -D-glucuronidasi, caratteristico di *E. coli*, e conferisce alle colonie una colorazione blu.

E. coli possiede entrambi gli enzimi che metabolizzano le sostanze cromogene, dando origine a colonie di colore blu scuro o violaceo Fig. 3.7 (Scharlab S.L., 2023).

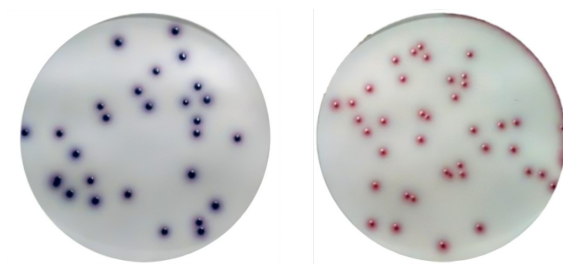


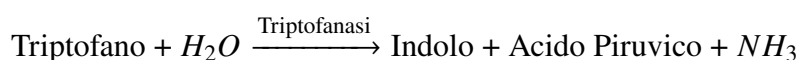
Figura 3.7: *E. coli* (in blu) e coliformi (in rosso).

Sebbene la rilevazione dell'attività dell'enzima β -D-glucuronidasi sia il gold standard per l'identificazione cromogenica di *E. coli*, è necessario considerare alcune eccezioni fenotipiche.

E' importante sottolineare che una piccola percentuale di ceppi di *E. coli* (ad esempio alcuni ceppi enteroemorragici) può risultare β -glucuronidasi negativa, producendo pertanto colonie atipiche (non cromogeniche), rendendo indispensabili ulteriori protocolli di conferma biochimica.

In questi casi si ricorre al test dell'indolo per confermare l'identità del ceppo, sfruttando la capacità del batterio di produrre l'enzima triptofanasi (Aryal, 2022).

Il processo metabolico può essere riassunto nella seguente reazione:



L'integrazione di triptofano nel terreno di coltura permette di eseguire il test direttamente sulla colonia sospetta. La rilevazione avviene tramite l'aggiunta del reagente di Kovac:

- l'indolo reagisce con l'aldeide del reagente formando un complesso chinonico di colore rosso rubino/fucsia che si stratifica in superficie (Fig. 3.8).

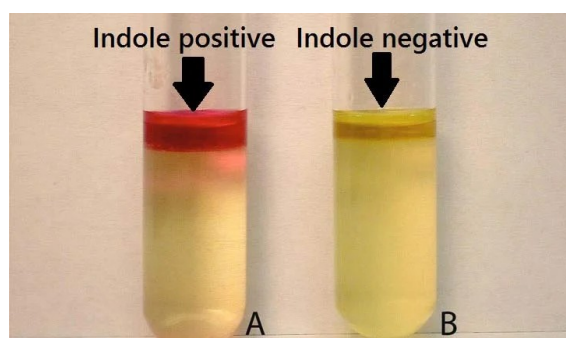


Figura 3.8: Risultato del test dell'indolo.

Poichè circa il 99% dei ceppi di *E. coli* è indolo-positivo, questo test rappresenta un metodo rapido ed efficace per discriminare *E. coli* dalla maggior parte degli altri membri delle

Enterobacteriaceae che risultano generalmente indolo-negativi (Aryal, 2022).

Protocollo di preparazione del terreno Nel laboratorio dove ho svolto l'internato di tesi, il terreno di coltura Chromogenic Coliform Agar viene utilizzato in forma disidratata (Fig. 3.9) e le piastre vengono preparate direttamente dal personale del laboratorio secondo i seguenti passaggi:



Figura 3.9: Terreno disidratato Chromogenic Coliform Agar.

1. **Pesatura del terreno:** la quantità di Chromogenic Coliform Agar disidratato necessaria viene pesata accuratamente in base alle indicazioni del produttore (29,45 g per 1L di acqua);
2. **Sospensione in acqua purificata:** il terreno pesato viene disciolto in acqua purificata demineralizzata per ottenere la concentrazione corretta;
3. **Agitazione e riscaldamento:** il terreno disciolto in acqua deionizzata viene riscaldato in agitazione costante fino alla completa solubilizzazione. A differenza di altri terreni, il CCA non richiede l'autoclavaggio, ma deve essere portato ad ebollizione;
4. **Raffreddamento:** il terreno, una volta pronto, viene raffreddato a circa 45-50°C, temperatura adatta a evitare la condensazione e a preservare le proprietà del terreno. Per effettuare il raffreddamento viene utilizzato un bagnetto termostato.



Figura 3.10: Preparazione terreno Chromogenic Coliform Agar.

5. **Versamento nelle piastre:** il terreno, una volta raffreddato, viene versato nelle piastre Petri sterili di diametro 55 mm, in modo uniforme, evitando la formazione di bolle d'aria. Questo passaggio deve essere effettuato in condizioni sterili sotto la cappa a flusso laminare (Fig. 3.11);



Figura 3.11: Versamento del terreno nelle piastre Petri

6. **Solidificazione:** le piastre vengono lasciate solidificare a temperatura ambiente;
7. **Conservazione:** una volta solidificate, le piastre vengono mantenute in frigorifero fino al loro utilizzo, garantendo la stabilità del terreno e la riproducibilità dei risultati. In conformità alla norma UNI EN ISO 9308-1 (ISO 9308-1, 2017), le piastre non utilizzate possono essere conservate in frigorifero per un massimo di 4 settimane a 2–8°C.

Questo procedimento garantisce l'uniformità del terreno, il corretto sviluppo delle colonie e la conformità ai requisiti della norma ISO 9308-1 assicurando risultati affidabili nelle analisi microbiologiche (ISO 9308-1, 2017).

In conclusione, il terreno Chromogenic Coliform Agar (CCA) si caratterizza per un'elevata selettività e specificità biochimica. Grazie alla combinazione di rapidità analitica, chiarezza interpretativa e pieno allineamento ai requisiti normativi, esso si conferma uno standard d'eccellenza nel monitoraggio microbiologico delle acque destinate al consumo umano.

Controllo di Qualità del terreno Chromogenic Coliform Agar

Al fine di garantire l'accuratezza, la riferibilità e la riproducibilità dei dati analitici, ogni lotto di terreno Chromogenic Coliform Agar (CCA) è sottoposto a rigorose procedure di controllo qualità prima dell'impiego routinario (Fig. 3.12).

In conformità alla norma UNI EN ISO 11133, il laboratorio esegue verifiche prestazionali mirate a valutare i seguenti parametri (ISO 11133, 2014):

- Sterilità: l'assenza di crescita microbica in piastre incubate senza inoculo;
- Produttività: la capacità del terreno di sostenere la crescita del microrganismo target, *E. coli*, garantendo un recupero quantitativo adeguato;
- Selettività: la capacità di inibire lo sviluppo della flora microbica non target, come i batteri Gram-positivi;
- Specificità: la verifica delle proprietà cromogeniche del terreno, accertando che le colonie dei microrganismi bersaglio manifestino le caratteristiche morfologiche e colorimetriche attese (es. viraggio al blu-viola per *E. coli* grazie all'attività della β -glucuronidasi).

Data l'elevata stabilità e lo storico prestazionale dei lotti utilizzati, il laboratorio adotta una strategia di controllo basata sulla valutazione del rischio. Pertanto, la verifica non viene effettuata su ogni singola preparazione, bensì programmata secondo le seguenti scadenze critiche:

- ad ogni cambio di lotto del fornitore;
- all'apertura di ogni confezione di terreno disidratato;
- alla fine di ogni confezione di terreno e comunque in prossimità della data di scadenza (nel caso in cui la confezione scada prima di essere esaurita);
- inoltre, si prevede un controllo a metà utilizzo di ogni confezione di terreno disidratato, se la confezione non viene esaurita entro i 12 mesi dall'apertura.

La procedura pratica di verifica inizia con la preparazione degli inoculi di riferimento (drogaggio). A tale scopo, si utilizzano microrganismi certificati in forma di pellet liofilizzati, ricostituiti in un brodo nutritivo specifico (es. MRD-Maximun Recovery Diluent).

Una volta ottenuta la sospensione madre, si procede all'esecuzione di diluizioni decimali seriali (fino a 10^{-6}), al fine di ottenere una soluzione con carica microbica idonea alla conta in piastra.

La verifica delle prestazioni del terreno CCA viene articolata nelle seguenti fasi:

- Controllo di sterilità: una piastra di terreno non seminata viene incubata a 36 ± 2 °C. Il requisito di conformità prevede l'assenza totale di crescita microbica.
- Valutazione di Selettività e Specificità: il terreno viene seminato per inclusione, striscio o mediante l'utilizzo di membrane filtranti con ceppi non target. Nello specifico, si utilizza *Pseudomonas aeruginosa* per verificare la specificità (deve mostrare crescita di colonie acromatiche o comunque non conformi ai target) ed *Enterococcus faecalis* per testare la selettività (il quale deve risultare completamente inibito). Questa fase assicura la capacità del terreno di discriminare correttamente i diversi generi batterici.
- Prova di Produttività: si valuta l'efficienza di recupero dei microrganismi bersaglio (*E. coli* e *Citrobacter freundii*). Utilizzando le soluzioni di microrganismi target precedentemente preparate tramite drogaggio (vedi capitolo 3.4.3) si preleva un'aliquota (tipicamente 1-2 mL) della soluzione a concentrazione idonea (generalmente 10^{-3} o 10^{-4}), che viene inoculata in un volume di acqua sterile e su un terreno non selettivo di riferimento come il TSA (Tryptic Soy Agar). L'acqua sterile così "drogata" viene analizzata mediante la tecnica della filtrazione su membrana; il filtro ottenuto viene depositato sulla superficie del terreno CCA (terreno in esame).

Al termine del periodo di incubazione, si procede al conteggio delle colonie sviluppatesi su entrambi i terreni. Il Rapporto di Produttività (Pr) viene calcolato mediante la seguente formula:

$$P_R = \frac{N_{CCA}}{N_{TSA}}$$

Dove N_{CCA} = rappresenta il numero di colonie contate sul terreno Chromogenic Coliform Agar e N_{TSA} = il numero di colonie contate sul terreno di confronto. Perché il lotto sia considerato idoneo, devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- Criterio quantitativo: il valore del rapporto di produttività deve essere $\geq 0,50$. Tale soglia, inferiore all'unità, è giustificata dalla natura selettiva del CCA, che può esercitare una minima pressione inibitoria anche sui ceppi target rispetto a un terreno arricchito come il TSA.
- Criterio qualitativo: le colonie devono manifestare il viraggio cromatico atteso: blu-viola per *E. coli* e rosa-salmone/rosso per i coliformi come *C. freundii*.

Solo in caso di pieno soddisfacimento di tutti i requisiti biochimici e quantitativi, il lotto di terreno viene validato e autorizzato per l'attività diagnostica.

| METODO | TERRENO | PRODUTTIVITÀ | SELETTIVITÀ | SPECIFICITÀ |
|--|---------|---|---|---|
| COLIFORMI ed ESCHERICHIA COLI UNI EN ISO 9308-2:2017 | CCA | Escherichia coli (Colonie tipiche blu-viola) e Citrobacter freundii (Colonie tipiche rosa) QUANTITATIVO 21±3h a 36±2°C CCA/TSA PR≥0,5 | Enterococcus faecalis QUALITATIVO Inibizione totale | Pseudomonas aeruginosa QUALITATIVO Colonie incolore |

Figura 3.12: Controllo terreno Chromogenic Coliform Agar.

Un altro terreno cromogenico utilizzato per la rilevazione di *E. coli* è il **Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX)**, basato sulla rilevazione dell'attività dell'enzima β -glucuronidasi; tuttavia, il suo impiego è più diffuso nell'analisi microbiologica degli alimenti, secondo la norma ISO 16649-2 (ISO 16649-2, 2001).

3.2.5 Controllo della qualità delle membrane filtranti

Nell'ambito delle analisi microbiologiche, spesso l'attenzione è rivolta principalmente al terreno di coltura, trascurando però l'importanza fondamentale delle membrane filtranti. In ambienti accreditati, il laboratorio esegue controlli periodici per verificare la costanza delle prestazioni, garantendo la tracciabilità del materiale e la ripetibilità delle analisi microbiologiche.

L'affidabilità dei risultati dipende in larga misura dalle caratteristiche chimico-fisiche della membrana stessa. Pertanto, ogni lotto deve essere rigorosamente validato secondo criteri ben definiti dalla norma UNI EN ISO 7704, per prevenire sottostime della carica microbica e garantire la sicurezza e la conformità dei dati analitici (ISO 7704, 2023).

Le prove, di seguito descritte, hanno lo scopo di dimostrare l'idoneità dell'intero sistema (membrana, terreno, filtrazione) e devono essere eseguite ogni qualvolta si inizia ad utilizzare un nuovo lotto di membrane (TeA Lab srl, 2026).

Per fare questo, si vanno a valutare le capacità della membrana di trattenere e di far crescere senza interferenze i vari microrganismi:

- Verifica del recupero dei microrganismi inoculati dalla sospensione iniziale (solitamente tra 80 e 120);
- Verifica prestazionale del terreno: produttività/selettività/specificità;
- Verifica della sterilità del terreno (tramite bianco) e delle membrane (la sterilità delle membrane può non essere valutata nel momento in cui sia dichiarata nel loro certificato);
- Valutazione delle caratteristiche visive che possono influenzare la morfologia e/o la crescita delle colonie:
 - Idrofobicità delle membrane (parti della membrana non aderiscono al terreno in piastra);
 - Inibizione della crescita da parte dell'inchiostro della griglia delle membrane;
 - Formazione di canali preferenziali in cui l'acqua si concentra;
 - Caratteristiche tipiche delle colonie che possono essere variate: colore, forma, convessità e dimensione.

Quindi, ad ogni cambio lotto di membrana si procede con:

- La determinazione del conteggio di riferimento attraverso spatolamento, e adeguata incubazione di un'aliquota tra 0,1 mL e 0,5 mL di sospensione iniziale (contenente un numero noto di colonie compreso tra 80 e 120) su una petri da 90 mm di diametro del terreno di riferimento come il Tryptone Soy Agar (TSA).
- La determinazione di produttività del sistema (vedi produttività del terreno, 3.2.4)
- La determinazione di selettività e specificità del sistema attraverso la filtrazione e la successiva incubazione di sospensioni non quantitative dei ceppi indicati dalla ISO 11133 (vedi specificità e selettività del terreno, 3.2.4).

Il conteggio di colonie su membrana deve essere fatto dividendo il campione drogato in aliquote in modo tale da raggiungere il numero di colonie necessarie per la prova senza però eccedere il limite di lettura di 80 UFC delle piastre con diametro tra 47 e 50 mm. Quindi, il conteggio totale viene fatto su più membrane.

Inoltre, per la decisione del numero di aliquote del campione e quindi di membrane da utilizzare è importante tenere conto della morfologia dei microrganismi target.

L' idoneità viene confermata calcolando il Rapporto di Produttività, il quale si calcola con la seguente formula:

$$P_R = \frac{N_{target}}{N_{ref}}$$

Dove:

- N_{target} è il conteggio totale delle UFC ottenute sulle membrane filtrate sul terreno target;
- N_{ref} è il conteggio delle UFC ottenuto sul terreno di riferimento dopo semina per spatolamento.

L' idoneità del sistema risulta verificata nel momento in cui il valore del Rapporto di Produttività è compreso tra $\geq 0,70$ e $< 1,40$. Nel caso in cui si presentino problemi con le prove di verifica del sistema, bisogna procedere con ulteriori verifiche supplementari:

- La determinazione di una possibile inibizione del microrganismo target da parte della membrana, attraverso la filtrazione del medesimo campione drogato utilizzato per la prova di produttività (o di un campione drogato con la stessa aliquota di sospensione iniziale) ed il trasferimento della membrana (o delle membrane) sul terreno di riferimento (TSA) specificato dalla ISO 11133 che viene poi adeguatamente incubato.
- La determinazione di una possibile inibizione del microrganismo target da parte del terreno, attraverso lo spatolamento di un' aliquota di sospensione iniziale compresa tra 0,1 mL e 0,5 mL, la stessa utilizzata per le altre prove, su una petri da 90mm di diametro del terreno target.

I conteggi delle varie prove vengono poi confrontati e interpretati anche attraverso l' osservazione della modalità di crescita delle colonie. Fino a quando i risultati delle prove obbligatorie sono soddisfacenti, una bassa produttività delle prove supplementari non squalifica la validità del sistema.

Nel caso in cui le prove rilevino irregolarità del sistema, tutte le analisi svolte precedentemente utilizzando le membrane sotto esame sono invalidate (TeA Lab srl, 2026).

La cura di questi aspetti non solo garantisce il rispetto delle normative, ma tutela la sicurezza dei consumatori e la credibilità del laboratorio.

3.2.6 Vantaggi e limiti della tecnica di filtrazione

La filtrazione su membrana rappresenta una procedura cardine nella microbiologia delle acque. Tuttavia, come ogni metodica analitica, presenta punti di forza e vincoli operativi

che devono essere considerati per una corretta interpretazione del dato (ISO 7704, 2023).

I vantaggi principali sono:

- Elevata sensibilità: il metodo permette di processare grandi volumi di campione rendendo possibile la rilevazione di microrganismi anche in matrici con carica batterica estremamente bassa, dove i metodi di semina diretta risulterebbero inefficaci.
- Enumerazione diretta: consente l'ottenimento di colonie isolate sulla superficie della membrana, facilitando il conteggio diretto (UFC) e l'eventuale isolamento per test di conferma.
- Rimozione di sostanze inibenti: la filtrazione permette di "lavare" via eventuali sostanze antibatteriche o residui presenti nel campione, che attraversano il filtro mentre i batteri rimangono trattenuti e pronti per lo sviluppo su un terreno fresco.

I limiti e le criticità, invece, sono:

- Torbidità e intasamento: la presenza di solidi sospesi o materiale colloidale può causare l'ostruzione dei pori della membrana. Questo non solo rallenta i tempi operativi, ma può determinare un "effetto schermante", dove le particelle solide coprono i microrganismi impedendo loro di entrare in contatto con il terreno di coltura.
- Stress cellulare: le forze di aspirazione del vuoto e il passaggio attraverso i pori possono causare stress meccanico o disidratazione dei microrganismi, portando ad una sottostima della carica vitale se non si utilizzano terreni idonei al recupero (come il CCA con il piruvato).
- Sovrapposizione delle colonie: in campioni con elevata carica microbica, la crescita ravvicinata sulla membrana può portare alla confluenza delle colonie, rendendo impossibile una conta accurata e richiedendo la diluizione preventiva del campione.
- Sensibilità alla manipolazione: il trasferimento della membrana con pinzette richiede un'elevata asepticità e manualità; la formazione di bolle tra il filtro e agar può isolare i batteri dai nutrienti, generando falsi negativi.

In conclusione, la filtrazione su membrana rimane il metodo di riferimento per le acque potabili, a condizione che vengano rispettate rigorosamente le procedure operative standard e che la matrice presenti una torbidità contenuta (ISO 7704, 2023).

3.3 Identificazione e isolamento di *Escherichia coli*

L'attività di identificazione e conteggio è stata condotta su campioni raccolti e processati durante l'intero periodo di internato.

Questa fase, cruciale per la determinazione della qualità microbiologica delle matrici, ha avuto inizio sistematicamente al termine del periodo di incubazione previsto dal protocollo. L'identificazione di *E. coli* si è basata esclusivamente sulla valutazione macroscopica e cromogena direttamente sulle membrane filtranti, sfruttando l'elevata selettività del terreno Chromogenic Coliform Agar (CCA).

In accordo con la norma ISO9308-1, questo approccio permette di considerare come "confermate" le colonie che presentano la specifica colorazione, ottimizzando i tempi di risposta del laboratorio senza necessità di ulteriori passaggi biochimici, salvo casi di dubbia interpretazione (ISO 9308-1, 2017).

3.3.1 Criteri di discriminazione cromatica

La discriminazione delle colonie è avvenuta mediante l'osservazione del viraggio cromatico indotto dal metabolismo batterico. Come dettagliato precedentemente, l'espressione simultanea degli enzimi β -D-galattosidasi e β -D-glucuronidasi porta alla formazione di colonie con una pigmentazione caratteristica che spazia dal blu intenso al viola (Fig. 3.13). Solo le colonie presentanti tale colorazione sono state censite come appartenenti alla specie *E. coli*.

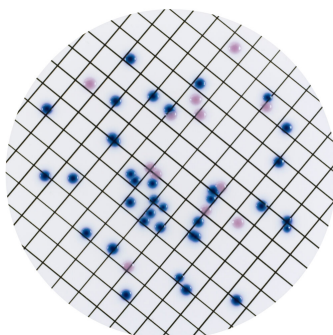


Figura 3.13: Colonie con pigmentazione dal blu intenso al viola.

3.3.2 Protocollo di conteggio e tracciabilità

Il conteggio è stato eseguito manualmente operando in condizioni di illuminazione ottimale e diffusa, fattore determinante per la corretta distinzione tra le tonalità blu/viola di *E. coli* e quelle rosso/salmone dei Coliformi totali (positivi alla sola β -D-galattosidasi).

Al fine di massimizzare l'accuratezza del conteggio, è stata adottata una tecnica di osservazione con asse visivo perpendicolare alla superficie della piastra. Tale accorgimento ha permesso di annullare l'errore di parallasse e prevenire eventuali distorsioni ottiche causate dallo spessore della membrana o del terreno, assicurando che ogni singola Unità Formante Colonia (UFC) venisse censita in modo univoco, evitando duplicazioni.

I dati ottenuti sono stati immediatamente trascritti sui fogli di lavoro di laboratorio. Questo protocollo ha garantito la totale tracciabilità del dato, associando univocamente ogni risultato al codice identificativo del campione e al relativo punto di prelievo, come previsto dalle procedure di gestione della qualità del laboratorio.

3.4 Elaborazione e analisi dei dati

Dopo aver concluso le analisi e registrato i risultati sui fogli di lavoro, i dati sono stati organizzati digitalmente per essere analizzati nel loro insieme. Dato che l'attività ha riguardato il monitoraggio di acque destinate al consumo umano, l'obiettivo principale è stato verificare la stabilità della qualità microbiologica nel tempo.

L'analisi dei dati è stata svolta seguendo questi passaggi:

- Espressione dei risultati e limiti di rilevabilità: il conteggio delle colonie target sulle membrane filtranti è stato convertito nel valore finale di UFC/100 mL, seguendo la seguente formula:

$$UFC/volume = \frac{\text{Numero di colonie contate}}{\text{Volume filtrato (mL)}} \times \text{Fattore di diluizione}$$

In conformità alle procedure gestionali del laboratorio, i campioni privi di crescita microbica sono stati refertati come "Assente in 100 mL", valore espresso analiticamente come < 1 UFC/100 mL.

- Valutazione della conformità normativa: ogni dato sperimentale è stato confrontato con i valori di parametro definiti dal D.Lgs. 18/2023, che stabilisce il limite di 0 UFC/100mL per *E. coli*. I campioni sono stati classificati come "Conformi" o "Non Conformi". Questa distinzione ha permesso di calcolare la percentuale di conformità totale, un indicatore fondamentale per descrivere la sicurezza del servizio idrico studiato.

- Analisi delle occorrenze di positività: nonostante l'elevata frequenza di campioni conformi, gli isolati casi di positività a *E. coli* sono stati trattati come "eventi sentinella". Tali dati sono stati analizzati in relazione alla localizzazione geografica dei punti di prelievo e alla stagionalità, al fine di individuare eventuali correlazioni con criticità locali o fenomeni ambientali specifici.

3.5 Gestione dei dati ed emissione dei Rapporti di Prova

I dati ottenuti dalla lettura delle piastre di coltura, una volta verificati e correttamente trascritti nei fogli di laboratorio, costituiscono la base per la successiva elaborazione e per l'emissione dei Rapporti di Prova (RdP) da parte del Responsabile di Laboratorio.

In conformità ai requisiti di accreditamento previsti dalla norma UNI EN ISO 17025, il Rapporto di Prova rappresenta il documento ufficiale che riporta i risultati delle analisi microbiologiche eseguite e costituisce l'atto formale attraverso il quale viene attestata la conformità o la non conformità del campione analizzato rispetto ai limiti stabiliti dalla normativa vigente.

Nel caso specifico delle analisi microbiologiche sulle acque destinate al consumo umano, i risultati sono stati confrontati con i valori limite previsti dal Decreto Legislativo 18/2023, che stabilisce l'assenza di *E. coli* in 100 mL di campione come requisito fondamentale per la potabilità dell'acqua.

Per ogni isolamento di *E. coli* identificato e successivamente conteggiato sulle piastre di coltura, è stata garantita la piena tracciabilità del dato analitico, assicurando la correlazione tra il risultato microbiologico grezzo (espresso come Unità Formanti Colonia) e il giudizio finale di conformità riportato nel Rapporto di Prova.

Questo sistema di tracciabilità rappresenta un elemento essenziale del sistema di gestione della qualità del laboratorio e consente di garantire l'affidabilità dei risultati analitici nonché la validità tecnico-legale delle indagini microbiologiche eseguite.

Capitolo 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

L'attività sperimentale ha riguardato l'analisi di 180 campioni di acqua destinata al consumo umano, raccolti durante il periodo di internato svolto tra settembre 2025 e febbraio 2026. Le analisi microbiologiche sono state condotte presso il laboratorio di microbiologia ambientale dell'azienda "TeaLab" di Rho (MI).

Il set di dati comprende campioni provenienti da diverse aree del territorio nazionale (Tab. 4.1):

- Lombardia;
- Piemonte;
- Liguria;
- Emilia-Romagna;
- Veneto;
- Marche;
- Lazio;
- Toscana;
- Trentino-Alto Adige;
- Sicilia.

| Regione | Numero di campioni analizzati |
|---------------------|--------------------------------------|
| Lombardia | 101 |
| Liguria | 19 |
| Piemonte | 17 |
| Emilia-Romagna | 13 |
| Veneto | 9 |
| Marche | 9 |
| Lazio | 5 |
| Toscana | 3 |
| Trentino-Alto Adige | 2 |
| Sicilia | 2 |

Tabella 4.1: Distribuzione geografica dei campioni analizzati.

Dall'analisi della Tabella si osserva una netta prevalenza di campioni provenienti dal territorio lombardo, che costituiscono il nucleo principale del set di dati analizzati.

Principalmente il campionamento ha interessato le province di (Fig. 4.1):

- Varese;
- Milano;
- Como;
- Cremona;
- Brescia;
- Monza e Brianza;
- Bergamo;
- Lodi;
- Pavia.

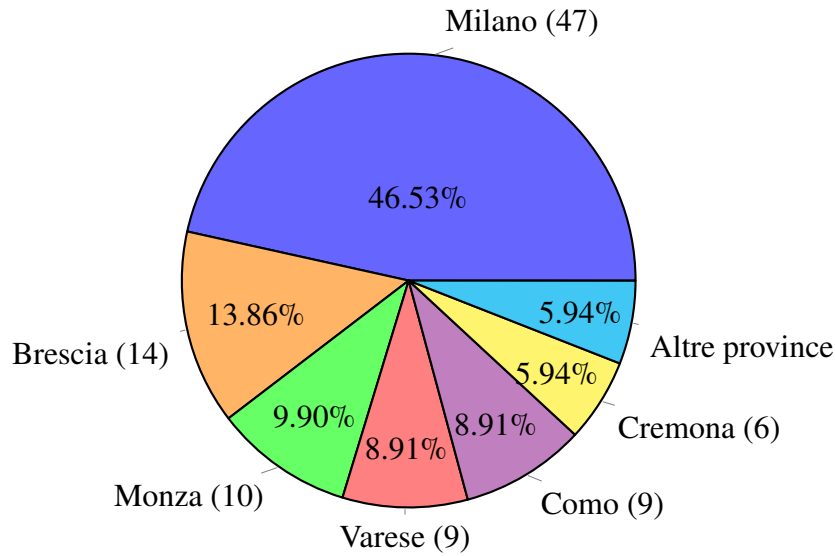


Figura 4.1: Distribuzione territoriale dei 101 campioni analizzati per provincia.

L'obiettivo centrale dell'attività sperimentale è stato la ricerca, l'identificazione e l'isolamento di *Escherichia coli*, microrganismo d'elezione per la valutazione della sicurezza idropotabile. Essendo un abitante abituale dell'intestino umano e degli animali a sangue caldo, la sua presenza nelle acque è considerato un indicatore inequivocabile di contaminazione fecale recente, e di conseguenza, della possibile presenza di patogeni enterici più pericolosi.

In conformità con il quadro normativo vigente introdotto dal D.Lgs. 18/2023 (attuazione della Direttiva UE 2020/2184), il requisito di qualità per le acque destinate al consumo umano è estremamente rigoroso, fissando un valore limite pari a 0 Unità Formanti Colonie (UFC) in 100 mL di campione.

Nelle Tabelle 4.2-7 sono riportati i risultati ottenuti per ogni singolo campione analizzato.

| NUMERO CAMPIONE | RISULTATI PER <i>Escherichia coli</i> |
|------------------------|--|
| 090203 | <1 UFC/100 mL |
| 090206 | <1 UFC/100 mL |
| 090208 | <1 UFC/100 mL |
| 090209 | <1 UFC/100 mL |
| 090210 | <1 UFC/100 mL |
| 090323 | <1 UFC/100 mL |
| 090426 | <1 UFC/100 mL |
| 090510 | <1 UFC/100 mL |
| 090512 | <1 UFC/100 mL |
| 090514 | <1 UFC/100 mL |
| 090918 | <1 UFC/100 mL |
| 091117 | <1 UFC/100 mL |
| 091121 | <1 UFC/100 mL |
| 091636 | <1 UFC/100 mL |
| 091640 | <1 UFC/100 mL |
| 091757 | <1 UFC/100 mL |
| 091761 | <1 UFC/100 mL |
| 091812 | = 4 stimati |
| 091815 | <1 UFC/100 mL |
| 091836 | <1 UFC/100 mL |
| 091837 | <1 UFC/100 mL |
| 092219 | <1 UFC/100 mL |
| 092323 | <1 UFC/100 mL |
| 092418 | <1 UFC/100 mL |
| 092420 | <1 UFC/100 mL |
| 092424 | <1 UFC/100 mL |
| 092429 | <1 UFC/100 mL |
| 092430 | <1 UFC/100 mL |
| 092514 | <1 UFC/100 mL |
| 093005 | =8 stimati |

Tabella 4.2: Risultati dei campioni analizzati a Settembre

| NUMERO CAMPIONE | RISULTATI PER <i>Esherichia coli</i> |
|------------------------|---|
| 100114 | <1 UFC/100 mL |
| 100119 | <1 UFC/100 mL |
| 100315 | <1 UFC/100 mL |
| 100328 | <1 UFC/100 mL |
| 100330 | <1 UFC/100 mL |
| 100332 | <1 UFC/100 mL |
| 100602 | <1 UFC/100 mL |
| 100707 | <1 UFC/100 mL |
| 100708 | <1 UFC/100 mL |
| 100710 | <1 UFC/100 mL |
| 100805 | <1 UFC/100 mL |
| 100903 | <1 UFC/100 mL |
| 101005 | = 11 (incertezza 7-17) |
| 101019 | <1 UFC/100 mL |
| 101309 | <1 UFC/100 mL |
| 101312 | <1 UFC/100 mL |
| 101512 | <1 UFC/100 mL |
| 101613 | <1 UFC/100 mL |
| 101728 | <1 UFC/100 mL |
| 102005 | <1 UFC/100 mL |
| 102106 | <1 UFC/100 mL |
| 102110 | <1 UFC/100 mL |
| 102219 | <1 UFC/100 mL |
| 102304 | <1 UFC/100 mL |
| 102408 | <1 UFC/100 mL |
| 102429 | =78 (incertezza 67-91) |
| 102727 | <1 UFC/100 mL |
| 102808 | <1 UFC/100 mL |
| 102919 | <1 UFC/100 mL |
| 103113 | <1 UFC/100 mL |

Tabella 4.3: Risultati dei campioni analizzati a Ottobre

| NUMERO CAMPIONE | RISULTATI PER <i>Esherichia coli</i> |
|------------------------|---|
| 110302 | <1 UFC/100 mL |
| 110303 | <1 UFC/100 mL |
| 110538 | <1 UFC/100 mL |
| 110539 | <1 UFC/100 mL |
| 110543 | <1 UFC/100 mL |
| 110547 | <1 UFC/100 mL |
| 110615 | <1 UFC/100 mL |
| 110620 | <1 UFC/100 mL |
| 110704 | <1 UFC/100 mL |
| 111011 | <1 UFC/100 mL |
| 111113 | <1 UFC/100 mL |
| 111327 | <1 UFC/100 mL |
| 111409 | <1 UFC/100 mL |
| 111481 | <1 UFC/100 mL |
| 111703 | <1 UFC/100 mL |
| 111828 | <1 UFC/100 mL |
| 111829 | <1 UFC/100 mL |
| 111944 | <1 UFC/100 mL |
| 111947 | <1 UFC/100 mL |
| 112061 | <1 UFC/100 mL |
| 112137 | <1 UFC/100 mL |
| 112421 | <1 UFC/100 mL |
| 112624 | <1 UFC/100 mL |
| 112626 | <1 UFC/100 mL |
| 112716 | <1 UFC/100 mL |
| 112719 | <1 UFC/100 mL |
| 112725 | <1 UFC/100 mL |
| 112803 | <1 UFC/100 mL |
| 112826 | <1 UFC/100 mL |
| 112834 | <1 UFC/100 mL |

Tabella 4.4: Risultati dei campioni analizzati a Novembre

| NUMERO CAMPIONE | RISULTATI PER <i>Esherichia coli</i> |
|------------------------|---|
| 120257 | <1 UFC/100 mL |
| 120372 | <1 UFC/100 mL |
| 120375 | <1 UFC/100 mL |
| 120377 | <1 UFC/100 mL |
| 120386 | =5 stimati |
| 120529 | <1 UFC/100 mL |
| 120536 | <1 UFC/100 mL |
| 121165 | <1 UFC/100 mL |
| 121171 | <1 UFC/100 mL |
| 121175 | <1 UFC/100 mL |
| 121176 | <1 UFC/100 mL |
| 121215 | <1 UFC/100 mL |
| 121228 | <1 UFC/100 mL |
| 121249 | <1 UFC/100 mL |
| 121263 | <1 UFC/100 mL |
| 121517 | =7 stimati |
| 121525 | <1 UFC/100 mL |
| 121601 | <1 UFC/100 mL |
| 121648 | <1 UFC/100 mL |
| 121702 | <1 UFC/100 mL |
| 121709 | =3 stimati |
| 121822 | <1 UFC/100 mL |
| 121831 | <1 UFC/100 mL |
| 121948 | <1 UFC/100 mL |
| 121949 | <1 UFC/100 mL |
| 121956 | <1 UFC/100 mL |
| 122314 | <1 UFC/100 mL |
| 122932 | <1 UFC/100 mL |
| 122937 | <1 UFC/100 mL |
| 122940 | <1 UFC/100 mL |

Tabella 4.5: Risultati dei campioni analizzati a Dicembre

| NUMERO CAMPIONE | RISULTATI PER <i>Esherichia coli</i> |
|------------------------|---|
| 010201 | <1 UFC/100 mL |
| 010207 | <1 UFC/100 mL |
| 010705 | <1 UFC/100 mL |
| 010919 | <1 UFC/100 mL |
| 010926 | <1 UFC/100 mL |
| 010930 | <1 UFC/100 mL |
| 010943 | <1 UFC/100 mL |
| 011406 | <1 UFC/100 mL |
| 011419 | <1 UFC/100 mL |
| 011527 | <1 UFC/100 mL |
| 011547 | <1 UFC/100 mL |
| 011554 | =12 stimati |
| 011614 | <1 UFC/100 mL |
| 011623 | <1 UFC/100 mL |
| 011673 | <1 UFC/100 mL |
| 012032 | <1 UFC/100 mL |
| 012034 | <1 UFC/100 mL |
| 012037 | <1 UFC/100 mL |
| 012118 | <1 UFC/100 mL |
| 012119 | <1 UFC/100 mL |
| 012120 | <1 UFC/100 mL |
| 012219 | <1 UFC/100 mL |
| 012222 | <1 UFC/100 mL |
| 012313 | <1 UFC/100 mL |
| 012316 | <1 UFC/100 mL |
| 012338 | <1 UFC/100 mL |
| 012616 | <1 UFC/100 mL |
| 012627 | <1 UFC/100 mL |
| 012725 | <1 UFC/100 mL |
| 013028 | <1 UFC/100 mL |

Tabella 4.6: Risultati dei campioni analizzati a Gennaio

| NUMERO CAMPIONE | RISULTATI PER <i>Esherichia coli</i> |
|------------------------|---|
| 020216 | <1 UFC/100 mL |
| 020223 | <1 UFC/100 mL |
| 020306 | <1 UFC/100 mL |
| 020307 | <1 UFC/100 mL |
| 020434 | <1 UFC/100 mL |
| 020435 | <1 UFC/100 mL |
| 020437 | <1 UFC/100 mL |
| 020539 | <1 UFC/100 mL |
| 020544 | <1 UFC/100 mL |
| 020603 | <1 UFC/100 mL |
| 020608 | <1 UFC/100 mL |
| 020609 | <1 UFC/100 mL |
| 020929 | <1 UFC/100 mL |
| 020945 | <1 UFC/100 mL |
| 021102 | <1 UFC/100 mL |
| 021110 | <1 UFC/100 mL |
| 021254 | <1 UFC/100 mL |
| 021257 | <1 UFC/100 mL |
| 021322 | <1 UFC/100 mL |
| 021330 | <1 UFC/100 mL |
| 021617 | <1 UFC/100 mL |
| 021851 | <1 UFC/100 mL |
| 022026 | <1 UFC/100 mL |
| 022041 | <1 UFC/100 mL |
| 022348 | <1 UFC/100 mL |
| 022427 | <1 UFC/100 mL |
| 022739 | <1 UFC/100 mL |
| 022753 | <1 UFC/100 mL |
| 022755 | <1 UFC/100 mL |
| 022774 | <1 UFC/100 mL |

Tabella 4.7: Risultati dei campioni analizzati a Febbraio

Dall'elaborazione dei dati ottenuti in laboratorio, e da quanto riportato nelle tabelle precedenti, si osserva che la maggior parte dei campioni analizzati è risultata priva di contaminazione da *E. coli* in 100 mL di acqua. In particolare i dati mostrano:

- **172 campioni (95,56%)** hanno evidenziato una totale assenza di crescita batterica riconducibile a *E. coli*, risultando pienamente conformi ai requisiti di legge.
- **8 campioni (4,44%)** hanno mostrato una crescita di colonie caratteristiche, segnalando una condizione di non conformità microbiologica (Fig. 4.2).

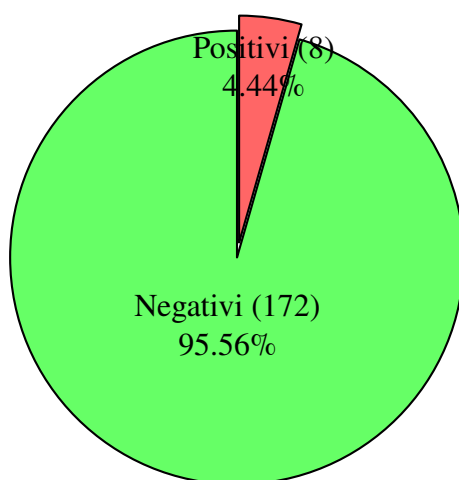


Figura 4.2: Distribuzione percentuale dei risultati microbiologici (n=180).

Questo indica una gestione generalmente efficace della rete idrica e dei processi di potabilizzazione. Tuttavia, la rilevazione del microrganismo in 8 campioni (4,44% del totale) (Tab. 4.8) evidenzia una criticità che non può essere trascurata.

| N. CAMPIONE | PROVENIENZA CAMPIONE | PROVINCIA | POSITIVITÀ |
|-------------|----------------------|---------------|------------|
| 091812 | Azienda, mensa | Savona | 4 stimati |
| 093005 | Rsa, mensa | Brescia | 8 stimati |
| 101005 | Rsa, mensa | Alessandria | 11 |
| 102429 | Ospedale, mensa | Milano | 78 |
| 120386 | Azienda, mensa | Padova | 5 stimati |
| 121517 | Rsa, cucina | Monza Brianza | 7 stimati |
| 121709 | Rsa, cucina | Monza Brianza | 3 stimati |
| 011554 | Rsa, cucina | Monza Brianza | 12 |

Tabella 4.8: Elenco dei campioni risultati positivi alle analisi.

Sebbene una percentuale del 4,44% possa apparire contenuta in un contesto statistico generale, in ambito microbiologico e legislativo essa rappresenta una non conformità assoluta. Il valore di parametro stabilito dal Decreto Legislativo 18/2023 (che recepisce la Direttiva UE 2020/2184) è infatti pari a 0 UFC/mL. Pertanto, anche la presenza di una singola unità formante colonia (UFC) in un campione determina il giudizio di non potabilità dell'acqua, richiedendo interventi immediati di sanificazione e comunicazione alle autorità competenti.

4.1 Significato sanitario dell'isolamento di *Escherichia coli*

La scelta di *E. coli* come indicatore principale di contaminazione delle acque non è legata solo alla sua facilità di isolamento in laboratorio, ma al suo altissimo valore predittivo. Essendo un ospite abituale dell'intestino umano e di altri animali a sangue caldo, la sua presenza nell'acqua è la prova inconfutabile di una contaminazione fecale.

A differenza di altri coliformi totali, che possono talvolta sopravvivere o moltiplicarsi in ambienti naturali, come suolo, acque superficiali, *E. coli* ha una capacità di sopravvivenza limitata al di fuori dell'ospite. Di conseguenza, il ritrovamento di questi 8 campioni isolati durante la sperimentazione indica una contaminazione recente. Questo dato suggerisce che le barriere protettive, siano esse naturali (protezione delle falde) o artificiali (processi di disinfezione), hanno subito un cedimento strutturale o funzionale nel momento del campionamento.

4.2 Ipotesi sulle cause della non conformità

Si possono formulare diverse ipotesi tecniche circa l'origine della contaminazione:

- Stato delle infrastrutture e Biofilm: una delle cause più probabili è legata alla vecchiaia delle condotte idriche. All'interno delle tubature possono formarsi depositi e biofilm che proteggono i microrganismi dall'azione dei disinfettanti residui (come il cloro libero). Sebbene *E. coli* non sia un tipico abitante delle tubature, può rimanere intrappolato e venire rilasciato a seguito di sbalzi di pressione o inversioni di flusso.
- Eventi meteorologici estremi: è ampiamente documentato in letteratura che forti precipitazioni possono causare un aumento del "run-off" (ruscellamento) superficiale. Questo fenomeno trasporta deiezioni animali o residui di fertilizzanti organici

dalle aree agricole verso i punti di captazione, superando la capacità filtrante del suolo.

- Rotture accidentali e manutenzioni: la contaminazione potrebbe essere stata causata da interventi di manutenzione sulla rete non seguiti da un'adeguata procedura di spurgo e disinfezione, o da micro-fessurazioni che hanno permesso l'ingresso di acque parassite inquinanti.
- Stato del punto di erogazione: Inquinamento puntuale del punto di erogazione ad esempio retrocontaminazione da contatto o scarsa manutenzione dei filtri dei distributori di acqua.

4.3 Discussione delle metodiche di isolamento ed identificazione

Durante la fase in laboratorio, l'isolamento degli 8 campioni positivi ha richiesto una rigorosa applicazione del metodo della filtrazione su membrana. L'uso di terreni cromogeni come il Chromgenic Coliform Agar (CCA) ha permesso una differenziazione rapida.

Tuttavia, è necessario discutere dei limiti intrinseci dei metodi colturali. In alcuni casi, i batteri possono trovarsi in uno stato definito VBNC (Viable But NonCulturable): sono vivi e potenzialmente patogeni, ma non riescono a duplicarsi sui terreni di coltura a causa di stress ambientali. Questo significa che il nostro dato 4,44% potrebbe rappresentare una stima prudenziale, e che la reale incidenza della contaminazione potrebbe essere lievemente superiore se analizzata con tecniche molecolari come la PCR (al momento non previste dal decreto).

Capitolo 5

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di esaminare in modo analitico e sistematico la qualità microbiologica di un ampio set di campioni idrici, focalizzando l'attenzione sul principale indicatore di contaminazione previsto dalla normativa vigente (D.Lgs.18/2023): *E. coli*. L'indagine sperimentale, condotta su un totale di 180 campioni, ha fornito una fotografia dettagliata della sicurezza igienico-sanitaria delle acque destinate al consumo umano.

Dall'elaborazione dei dati emerge un quadro complessivamente rassicurante: la conformità riscontrata in 172 campioni (95,56% del totale) testimonia l'efficacia generale dei sistemi di trattamento e della tenuta delle reti di distribuzione. Tuttavia, il riscontro di 8 campioni positivi (4,44%) rappresenta un segnale di criticità che merita una discussione approfondita.

L'analisi quantitativa ha rilevato una variabilità significativa tra le non conformità: mentre in alcuni casi la carica batterica è risultata prossima al limite di rilevabilità, in altri si sono riscontrati picchi critici, fino a 78 UFC/100mL. In termini di sicurezza idrica, tali valori non sono trascurabili, poiché il D.Lgs.18/2023 impone un limite invalicabile di 0 UFC/100mL. Ogni singola positività rilevata è stata dunque interpretata come un cedimento delle barriere protettive, riconducibile a cause che spaziano da infiltrazioni localizzate nelle condotte a fenomeni di contaminazione puntuale.

5.1 Il ruolo di *Escherichia coli* nella tutela della salute pubblica

L'importanza del rilevamento di questo specifico batterio risiede nella sua natura biologica: esso fornisce la prova di una contaminazione fecale recente. Mentre altri coliformi possono trovarsi naturalmente nell'ambiente, *E. coli* risiede stabilmente nel tratto intestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo. Il suo isolamento funge da "sentinella": la sua presenza suggerisce che il percorso seguito dall'acqua è entrato in contatto con deiezioni organiche, comportando un rischio sanitario immediato. *E. coli* agisce infatti come "apripista" per patogeni più pericolosi e difficili da isolare, come *Salmonella typhi*, *Shigella* o virus enterici.

L'attività di laboratorio non si è esaurita nella semplice conta microbica; essa è stata concepita come uno strumento operativo di prevenzione, volto a identificare tempestivamente i rischi ambientali per garantire la sicurezza sanitaria della collettività.

5.2 Analisi critica della metodologia: punti di forza e limiti

L'approccio metodologico adottato ha garantito la massima solidità del dato scientifico. Il ricorso al metodo della filtrazione su membrana, abbinato all'impiego del terreno Chromogenic Coliform Agar (CCA), si è confermato una scelta d'elezione per rapidità e precisione. La specificità cromogena del terreno (basata sulla produzione dell'enzima β -D-glucuronidasi) ha permesso di discriminare con certezza le colonie blu-viola di *E. coli* anche nei campioni ad alta carica (78 UFC/100mL), riducendo i tempi di risposta analitica rispetto ai metodi tradizionali.

Tuttavia, è doveroso riconoscere i limiti intrinseci alla ricerca:

- Stato VBNC (Viabile ma non coltivabile): i batteri stressati dai trattamenti potrebbero non formare colonie sui terreni colturali portando a una possibile sottostima delle positività.
- Frequenza temporale: l'analisi rappresenta una "fotografia" istantanea; la qualità dell'acqua può variare drasticamente in poche ore a causa di eventi meteorologici estremi che influenzano la torbidità delle falde.

5.3 Prospettive future e gestione del rischio

Alla luce dei risultati ottenuti, risulta fondamentale adottare un approccio basato sulla prevenzione attiva, garantendo una tutela più efficace e dinamica contro i rischi di natura microbiologica. Tale evoluzione si può articolare su tre pilastri fondamentali:

1. l'integrazione di sistemi di monitoraggio in continuo, come per esempio l'analisi della torbidità (indicatore critico di potenziale contaminazione);
2. l'adozione di tecniche molecolari quali la Real-Time PCR per l'individuazione di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC);
3. l'implementazione dei *Water Safety Plans*, che risultano essere essenziali per garantire la resilienza delle infrastrutture, estendendo la garanzia di conformità dalla fonte fino al punto di erogazione finale.

5.4 Considerazioni finali

In conclusione, sebbene l'indagine abbia confermato un buon livello generale di potabilità per quanto riguarda l'assenza di *E. coli*, il 4,44% di non conformità rilevato funge da monito: la sicurezza dell'acqua non è un traguardo statistico, ma un processo di sorveglianza continua.

La tutela della risorsa idrica rimane una delle sfide più complesse della nostra epoca, dove la competenza tecnica del microbiologo si fonde con la responsabilità etica verso la salute della comunità.

Capitolo 6

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo intenso percorso accademico sento di rivolgere un pensiero a tutte le persone che mi hanno accompagnata.

Desidero, innanzitutto, esprimere la mia più sincera gratitudine alla *Prof.ssa Buroni*, per avermi guidata con estrema professionalità, per aver creduto nel mio progetto. La sua disponibilità e i suoi preziosi consigli sono stati fondamentali per superare i momenti di incertezza e per dare una forma concreta a questo studio.

Un ringraziamento altrettanto sentito va a *Stefania* ed *Elisa*, per il loro supporto tecnico e umano, per le ore trascorse insieme e per aver saputo trasmettermi l'entusiasmo per il lavoro di laboratorio. La vostra guida congiunta è stata per me un esempio di dedizione e competenza che porterò con me nel mio futuro professionale.

Un pensiero speciale va alla mia famiglia. Grazie per essere stati la mia base sicura, per aver rispettato i miei silenzi durante le sessioni d'esame e per aver gioito con me di ogni piccolo successo.

A mia mamma *Mariangela*, la persona più importante della mia vita. Non esistono parole sufficienti per ringraziarti di tutto ciò che hai fatto e continui a fare per me. Sei stata la mia forza nei momenti di stanchezza e la mia motivazione quando la meta sembrava lontana. Grazie per avermi insegnato che con la tenacia e l'amore si può superare ogni ostacolo. Questa tesi, è in gran parte, dedicata a te: alla tua pazienza infinita, ai tuoi sacrifici e alla tua capacità di capirmi con un solo sguardo. Grazie per essere il mio porto sicuro e il mio esempio di vita.

A mio papà *Pier*. Grazie perchè, nonostante tutto e nel tuo piccolo, so che ci tieni profondamente. La tua presenza discreta ma costante è stata un tassello fondamentale. Sapere di poterti rendere orgoglioso è per me un traguardo immenso. Grazie per esserci stato a modo tuo.

Un ringraziamento speciale ai miei fratelli: non siete stati fisicamente al mio fianco, ma la vostra presenza costante nel mio cuore è stata la forza più grande. Grazie per essermi

stati vicini a modo vostro, ogni giorno. Nonostante tutto, siete per me parte fondamentale della mia vita, vi amo.

A *mia nonna Luciana*, la mia seconda mamma. Grazie per avermi fatto capire cosa significa essere una persona preziosa, per essere in ogni mio gesto e renderlo raro. Sei luce e forza in ogni mio buio.

Al mio compagno di vita, *Alessandro*. "L'amore più bello è quello che risveglia l'anima e che ci fa desiderare di arrivare più in alto, quello che incendia il nostro cuore e porta la pace nella nostra mente": questo è ciò che tu mi hai donato. Grazie perchè sei riuscito a riaprire il mio cuore e a donarmi una luce che credevo di aver perso per sempre. Grazie per aver saputo tenermi testa in qualsiasi momento. Sei stato l'unico capace di gestire le mie tempeste emotive, di riportarmi con i piedi per terra e di ricordarmi quanto valgo quando io stessa me ne dimenticavo. Grazie per aver condiviso con me le lunghe giornate di studio, per aver saputo ascoltare i miei sfoghi e per aver reso ogni momento di pausa una boccata d'ossigeno. La tua presenza è stata la mia ancora di salvezza e il mio equilibrio. Sei il mio valore aggiunto. Grazie a te ho avuto il coraggio di sperimentare nuove idee, mettermi in gioco e di capire che gli ostacoli esistono per essere superati. Ti amerò in modo puro e fiero perchè tu, più di chiunque altro, mi hai spinto a credere nell'impossibile.

Alla mia migliore amica, *Sabrina*, che è per me una sorella. Grazie per aver vissuto ogni giorno di questo cammino come se fosse il tuo, per avermi rialzata nei momenti di sconforto e per aver festeggiato ogni mio successo. Questo traguardo appartiene un po' anche a te. Sei la dimostrazione che il sangue non è l'unico legame che rende due persone una famiglia.

A *Romina*, che il caso ha voluto riportare sul mio cammino proprio nel posto in cui ho lavorato. È stato incredibile ritrovarsi dopo essersi appena incrociate ai tempi delle medie e scoprire, con estrema naturalezza, un'amicizia che ha saputo darmi forza e sorrisi in questo periodo così intenso.

Un grazie speciale ai *Comodi*, per avermi aperto le braccia con estrema naturalezza nel momento in cui ho iniziato la mia storia con Alessandro, facendomi sentire parte di voi fin dal primo istante. Vi voglio bene.

E infine voglio ringraziare me stessa per avercela fatta, per essere riuscita a portare a termine ciò che in alcuni momenti mi sembrava impossibile. Mi ricordo ancora il giorno in cui ho scelto questo percorso di studi, con la preoccupazione che non fosse la scelta giusta per me. Guardandomi ora, mi vedo una persona cambiata, cresciuta e maturata, determinata a raggiungere i propri obiettivi. Non sono mai stata un dieci a scuola, non mi sono mai distinta per i miei voti già dalle medie, ed è per questo che ho sempre sottovalutato le mie capacità: questo traguardo rappresenta la mia rivincita. Per questo mi ringrazio per non aver mollato mai, nemmeno quando la stanchezza prendeva il sopravvento sulla voglia

di studiare. Mi ringrazio per la curiosità che mi ha spinto ad approfondire ogni dettaglio di questo progetto e per la determinazione con cui ho affrontato ogni sfida. Questo traguardo è la prova che i sacrifici ripagano e che sono capace di raggiungere grandi obiettivi con le mie sole forze.

A tutti voi, GRAZIE.

Bibliografia

- APAT - IRSA-CNR. *Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee Guida 29/2003*. Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici, Roma, 2003. Metodo 7010: Coliformi totali e Metodo 7020: Escherichia coli.
- APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC, 23rd edition, 2017.
- Aryal, S. Indole test – principle, reagents, procedure, result interpretation and limitations. *Microbiology Info*, 2022.
- Basavaraju, M. and Gunashree, B. S. *Escherichia coli: An overview of main characteristics*. In Samie, Amidou, editor, *Escherichia coli: Old and New Insights*, pages 1–21. IntechOpen, London, 2022.
- D.Lgs. 18/2023 - Allegato I. Parametri microbiologici e chimici. Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, n. 55, 2023.
- D.Lgs. 18/2023 - Allegato II. Monitoraggio delle acque destinate al consumo umano. Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, n. 55, 2023.
- D.Lgs. 18/2023 - Allegato III. Specifiche per l'analisi dei parametri. Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, n. 55, 2023.
- D.Lgs. 23 febbraio 2023, n. 18. Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Serie Generale n. 55 del 06-03-2023, 2023. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2023/03/06/23G00025/sg>.
- GAI Ambiente. *Istruzioni di campionamento e conservazione dei campioni d'acqua potabile*. GAI Ambiente S.r.l., 2023.

- Generon S.r.l. Chromogenic coliform agar (cca) - acc. to iso 9308-3, 2024. URL <https://generon.it>.
- Gomes, Tânia A. T., Elias, Waldir P., Scaletsky, Isabel C. A., Guth, Beatriz E. C., Rodrigues, Juliana F., Piazza, Roxane M. F., Ferreira, Luís C. S., and Martinez, Marina B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47:3–30, 2016.
- ISO 11133. *Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2014.
- ISO 16649-2. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli – Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide*. International Organization for Standardization, 2001.
- ISO 19458. *Water quality – Sampling for microbiological analysis*. International Organization for Standardization, 2006. Adopted in Italy as UNI EN ISO 19458.
- ISO 5667-1. *Water quality – sampling – part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques*, 2020.
- ISO 5667-2. *Water quality – sampling – part 2: Guidance on sampling techniques*, 1991.
- ISO 5667-5. *Water quality – sampling – part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems*, 2017.
- ISO 7704. *Water quality — Performance testing of membrane filters used for direct enumeration of microorganisms*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2023.
- ISO 9308-1. *Water quality – enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – part 1: Membrane filtration method*. Technical report, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2017.
- Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR. *Metodi analitici per le acque: Microbiologia*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma, Italia, aggiornamento 2022 edition, 2022.
- Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, Michael J., Byappanahalli, Muruleedhara N., T., Yan, and Ishii, S. Environmental *Escherichia coli*: Ecology and public health implications. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3):570–581, 2017.

- Ministero della Salute. Le acque destinate al consumo umano. <https://www.salute.gov.it/new/it/tema/qualita-dellacqua/le-acque-destinate-al-consumo-umano/>, 2016. Disponibile online.
- NIAID. E. coli bacteria, 2002. URL [https://it.wikipedia.org/wiki/File:E._coli_Bacteria_\(7316101966\).jpg](https://it.wikipedia.org/wiki/File:E._coli_Bacteria_(7316101966).jpg). Micrografia elettronica a scansione colorata. Dominio pubblico.
- Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. Direttiva (UE) 2020/2184 del 16 dicembre 2020 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 435, 2020.
- Rasko, David A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. A., et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli*.
- Sarhan, H. R. and Foster, H. A. A rapid fluorogenic method for the detection of *Escherichia coli* by the production of beta-glucuronidase. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(5): 394–400, 1991.
- Scharlab S.L. *Scheda Tecnica del Terreno di Coltura Chromogenic Coliform Agar (CCA)*. Scharlab S.L., 2023. Documentazione tecnica interna fornita dal produttore previa registrazione sul portale ufficiale.
- Silva, D. M. and Domingues, L. On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on pcr-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113:400–411, 2015.
- TeA Lab srl. *Istruzione Operativa ISTR. 18-3.1: Modalità di gestione di campioni, materiali di riferimento e di consumo*. Laboratorio di Prova, Italia, rev. 18, aggiornata al 30.01.2026 edition, 2026.
- World Health Organization. *Guidelines for Drinking-water Quality*. World Health Organization, Geneva, 4th edition, 2017.
- World Health Organization. Technical guidance for sample transport and storage prior to microbiological analysis. Technical report, World Health Organization, Geneva, 2024.