



di Giorgio Temporelli

## Gli indicatori microbiologici nel D.lgs.18/2023

In generale i parametri indicatori sono utilizzati per valutare la qualità dell'acqua, fissati per finalità di monitoraggio e per l'applicazione di eventuali correzioni. Questi parametri non sono considerati pericolosi per la salute, ma rappresentano degli utili indizi per rilevare un cambiamento nella qualità dell'acqua potabile e rappresentano quindi un importante indicatore di prevenzione del rischio potenziale.

Un superamento temporaneo del valore di un parametro indicatore non costituisce un'inosservanza, non comporta la perdita dell'idoneità all'uso potabile e non è punibile con sanzioni, tale non conformità segnala esclusivamente la necessità di un'indagine approfondita per capirne la causa e, conseguentemente, adottare le idonee misure per ripristinare il valore entro il limite prestabilito.

Esistono però anche altri indicatori microbiologici, fondamentali, il cui superamento del valore di parametro comporta la non conformità ai requisiti stabiliti dal decreto.

Abbiamo approfondito il ruolo dei parametri indicatori microbiologici previsti dal D.Lgs 18/2023 intervistando Rossella BRIANCESCO – *Primo ricercatore nell'Area funzionale Rischio Microbiologico e Virologico, Centro Nazionale per la Sicurezza della Acque (CeNSiA), Istituto Superiore di Sanità* – che ringraziamo per la disponibilità.



### In ambito microbiologico, che cosa si intende per parametri indicatori?

Alcuni microrganismi, o gruppi di microrganismi, non patogeni per l'uomo, sono denominati "indicatori" poiché svolgono il ruolo di segnalatori della qualità microbiologica dell'acqua e, in tal senso, costituiscono i principali componenti della sorveglianza analitica svolta sulla matrice idrica.

Tra i criteri che definiscono gli indicatori microbiologici sono da annoverare: i) la co-presenza con i microrganismi patogeni; ii) la concentrazione relazionabile a quella dei patogeni, tale da riflettere il livello di contaminazione microbiologica dell'acqua; iii) l'analoga capacità di sopravvivenza e resistenza rispetto ai patogeni; iv) l'incapacità di moltiplicarsi nell'ambiente ai fini di garantire che la loro presenza individui e rispecchi gli eventi di contaminazione.

La scelta degli indicatori microbiologici tiene conto anche di aspetti pratici, come la facilità di rilevamento analitico che ne agevola l'impiego nella routine di monitoraggio della qualità dell'acqua.

Nell'ambito del controllo della qualità delle acque destinate al consumo umano, i parametri indicatori sono utilizzati per una serie di scopi, quali:

- indicatori di contaminazione fecale nel monitoraggio di verifica: tali sono *Escherichia coli* e gli enterococchi intestinali, utilizzati nelle analisi delle acque potabili come spia della possibile presenza di enterobatteri patogeni e, più in generale, di agenti patogeni a trasmissione fecale-orale;
- indicatori dell'efficacia di processi di trattamento delle acque quali la filtrazione e la disinfezione

finalizzati a garantire la rimozione/inattivazione dei microrganismi patogeni;

- indicatori di integrità e pulizia dei sistemi di distribuzione nel monitoraggio operativo.

Già a partire dagli anni 2000, la comunità scientifica e l'Organizzazione Mondiale della Sanità avevano attribuito un rilievo differente ai vari parametri indicatori di qualità microbiologica dell'acqua destinata al consumo umano. Tale distinzione è stata enfatizzata nella Direttiva (UE) 2020/2184 e nel D.lgs. 18/2023, che la recepisce, fornendo una migliore definizione degli indicatori microbiologici. In particolare è stata introdotta una netta distinzione tra:

- gli indicatori primari di contaminazione fecale, ossia *E. coli* ed enterococchi intestinali - riportati nella parte A dell'Allegato I del D.lgs. 18/2023 - segnalatori di un potenziale pericolo per la salute e soggetti a frequenze di monitoraggio non riducibili in base alla valutazione del rischio della fornitura idrica;
- i parametri indicatori - riportati nella parte C dell'Allegato I del D.lgs. 18/2023 - utilizzati per valutare l'efficacia dei trattamenti applicati all'acqua nonché l'integrità del sistema idrico.

Ne consegue un differente approccio nella gestione degli eventuali superamenti dei rispettivi valori di parametro, come riportato nell'articolo 15 del D.lgs. 18/2023. La gravità associata alla presenza dei parametri indicatori differisce rispetto a quella associata alla presenza di *E. coli* e degli enterococchi che rappresentano parametri microbiologici fondamentali. Per questi ultimi, il superamento del valore di parametro comporta la non conformità ai requisiti stabiliti dal decreto.

## Quali sono i parametri indicatori riportati nell'allegato I parte C del D.lgs. 18/2023?

Per la valutazione della qualità microbiologica dell'acqua, si tratta dei seguenti parametri: Batteri coliformi, Conteggio delle colonie a 22°C e *Clostridium perfringens* spore comprese.

I Batteri coliformi, inclusi nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, comprendono un'ampia gamma di batteri aerobi e anaerobi facoltativi, Gram-negativi, non sporigeni. Essi sono capaci di crescere in presenza di concentrazioni relativamente elevate di sali biliari e di fermentare il lattosio grazie alla presenza dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi, con produzione di acido e gas entro 24 ore a 35-37°C. *E. coli* e i coliformi termotolleranti rappresentano un sottoinsieme di questo più ampio gruppo, in grado di fermentare il lattosio a temperature più elevate. Tradizionalmente, nel gruppo dei coliformi totali erano inclusi i batteri dei generi *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* ed *Enterobacter*; le evidenze scientifiche, tuttavia, hanno dimostrato una maggiore eterogeneità del gruppo, che comprende una gamma più ampia di generi, quali *Serratia* e *Hafnia*, e include sia specie fecali che ambientali.

Il parametro Conteggio delle colonie a 22°C rileva un ampio spettro di microrganismi eterotrofi, tra cui batteri e funghi, sulla base della loro capacità di crescere su terreni di coltura privi di agenti inibitori o selettivi, per un determinato periodo di incubazione e a una determinata temperatura di crescita. Tuttavia l'analisi consente di rilevare solo una parte dei microrganismi realmente presenti nell'acqua - ovvero quelli in grado di crescere su un substrato di coltura e dare luogo alla formazione di colonie visibili - che può includere sia organismi sensibili alla disinfezione che proliferano rapidamente nell'acqua trattata in assenza di disinfettante residuo, che organismi sporigeni resistenti ai processi di disinfezione.

I microrganismi eterotrofi includono sia i membri della flora microbica naturale presente nell'acqua,

tipicamente non pericolosa, sia organismi derivanti da fonti di contaminazione. I batteri eterotrofi comunemente rilevati nelle acque destinate al consumo umano includono generi che possono agire come patogeni opportunisti, quali: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*. Nella popolazione generale, tuttavia, non ci sono evidenze di un'associazione tra la presenza di questi organismi nell'acqua potabile e il verificarsi di infezioni gastrointestinali a trasmissione idrica. La loro concentrazione può variare notevolmente da punto a punto della stessa rete, come anche in campioni prelevati consecutivamente nello stesso punto.

I processi di trattamento dell'acqua destinata al consumo umano, in particolare la disinfezione, riducono il numero di microrganismi eterotrofi, tuttavia, nessun processo rende l'acqua sterile; in condizioni idonee, come in assenza di disinfettante residuo, a temperature favorevoli, in presenza di sostanze nutritive e in condizioni di ristagno, i microrganismi possono rapidamente moltiplicarsi nell'acqua e nel biofilm che si forma all'interno delle tubature.

*Clostridium perfringens*, come la maggior parte dei clostridi, è normalmente saprofito e vive negli strati superficiali poveri di ossigeno del suolo e dei sedimenti, dove generalmente non si moltiplica, e nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo. *C. perfringens* è un bacillo sporigeno, non motile, variabile alla colorazione di Gram, anaerobio obbligato con temperature ottimali di crescita comprese tra 43 e 47°C. Nelle feci umane si stima che sia presente in concentrazioni variabili da  $10^2$  a  $10^7$  unità formanti colonie (UFC)/g; elevate concentrazioni di *C. perfringens* sono riscontrate anche nelle feci suine e canine, mentre negli altri animali a sangue caldo la presenza del batterio è minima o addirittura assente. Si stima che nei reflui le concentrazioni di questo batterio si aggirino intorno a  $10^5$  UFC/100 mL. Nelle acque destinate al consumo umano la presenza di *C. perfringens* è raramente segnalata. I suoi livelli di concentrazione sono molto eterogenei, variando da <1 UFC/100 mL in acque non contaminate, a valori superiori a 3000 UFC/100 mL in acque contaminate da effluenti fognari. Questa specie batterica può essere responsabile di gravi tossinfezioni alimentari, di setticemie e della gangrena gassosa, in quanto capace di produrre potenti tossine proteiche, molte delle quali extracellulari.

Tuttavia, il rischio legato al consumo diretto di acqua potabile contaminata è contenuto, poiché è poco probabile che, in assenza di eventi climatici straordinari, si riscontrino nelle acque potabili concentrazioni sufficientemente elevate da raggiungere la dose infettante.

## Quale è significato dei parametri indicatori riportati nella parte C dell'allegato I del D.lgs. 18/2023?

I batteri coliformi, pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di  $10^9$  UFC/g, sono ubiquitari, sopravvivono e crescono nell'acqua, non risultando perciò di esclusiva origine fecale. Per queste ragioni, e per la loro ridotta capacità di sopravvivenza nell'ambiente rispetto ad alcuni patogeni, non sono considerati utili come indicatori della presenza di agenti patogeni fecali. Il parametro non ha quindi una rilevanza sanitaria diretta, ma rappresenta uno strumento operativo utile per il monitoraggio e la gestione della qualità dell'acqua se utilizzato per:

- valutare l'efficacia dei trattamenti (i batteri coliformi dovrebbero essere assenti immediatamente dopo la disinfezione);
- verificare la pulizia e l'integrità dei sistemi di distribuzione;
- verificare la biostabilità dell'acqua;
- rilevare la presenza di ricrescita microbica e di biofilm nei sistemi idrici interni degli edifici.

Il Conteggio delle colonie a 22°C ha uno scarso valore come indicatore della presenza di patogeni, soprattutto in considerazione dell'esiguo volume di acqua analizzato (1 mL). Pur non avendo rilevanza sanitaria, può essere utile nel monitoraggio operativo come indicatore di efficacia del trattamento e della disinfezione, per valutare la pulizia e l'integrità dei sistemi di distribuzione e la presenza di biofilm.

Dopo la disinfezione, ci si attende, in generale, che

le conte degli organismi eterotrofi siano basse; l'utilità della misura del parametro, tuttavia, più che alla stima dell'effettiva concentrazione di microrganismi presenti, è da riferirsi alla possibilità di cogliere eventuali variazioni anomale dei conteggi in particolari punti. Dato che ogni tipo di acqua è caratterizzato da un proprio microbiota, il rilevamento di incrementi rispetto alle concentrazioni storicamente rilevate, può segnalare, oltre che le naturali variazioni stagionali, fenomeni di ricrescita batterica, stagnazione dell'acqua, distacco di biofilm dalle superfici interne delle tubazioni ed eventuale compromissione di integrità della rete idrica. In conformità con quanto disposto dalla Dir. (UE) 2020/2184 e, conseguentemente, dal D.lgs. 18/2023, a questo indicatore non è stato pertanto assegnato un valore parametrico specifico; le sue concentrazioni devono risultare "senza variazioni anomale" rispetto a quelle previste e storicamente osservate in un'acqua sottoposta periodicamente ad analisi.

Ad oggi, non esistono linee guida ufficiali che fissano criteri di valutazione a supporto dell'interpretazione delle risultanze analitiche ottenute; ciò rende flessibile il concetto di "variazione anomala" e può portare a discrepanze nelle valutazioni e nelle azioni da adottare per affrontare tali variazioni. Nella valutazione del parametro, ai fini della formulazione del giudizio di qualità delle acque, è bene, tuttavia, sottolineare che va sempre considerato l'eventuale concomitante riscontro di batteri indicatori di contaminazione fecale.

Il parametro *C. perfringens* spore comprese, in base a quanto disposto dalla Dir. (UE) 2020/2184 e, conseguentemente, dal D.lgs. 18/2023, deve essere ricercato solo se indicato come appropriato dalla valutazione del rischio. Da diversi decenni, *C. perfringens* è stato adottato come indicatore di qualità delle acque per la capacità - in quanto specie di origine fecale, dotata di spore altamente resistenti al calore, alla disinfezione e a condizioni ambientali avverse - di segnalare eventi di contaminazione fecale pregressa o intermittente. Nelle acque sottoposte a processi di trattamento, il parametro è potenzialmente rilevabile soltanto nella forma sporale poiché peculiarmente resistente ai processi di sanificazione. Pertanto, i batteri derivanti dalla germinazione delle spore, possono rappresentare una valida misura dell'efficacia dei processi di rimozione lungo l'intero sistema di potabilizzazione.

La presenza di basse concentrazioni di spore di *Clostridium perfringens* nelle acque destinate al consumo umano difficilmente rappresenta un rischio significativo per soggetti sani in relazione al loro consumo. Tuttavia, se l'acqua contaminata da spore di *C. perfringens* fosse impiegata nel settore alimentare, e i prodotti non fossero cotti in modo appropriato, potrebbero verificarsi alterazioni delle caratteristiche igienico-sanitarie con rischi per la salute.

Anche se non esiste un consenso scientifico assoluto, numerosi studi riguardanti acque superficiali e reflue, hanno correlato la presenza di *C. perfringens* a quella delle cisti/oocisti dei protozoi patogeni *Giardia* e *Cryptosporidium*, con cui condividono caratteristiche di persistenza nell'ambiente e resistenza ai trattamenti. Per quanto riguarda le acque potabili, invece, non è stata dimostrata alcuna correlazione, probabilmente anche a causa della differenza nei volumi d'acqua utilizzati per la ricerca dei parametri: 100 mL per *C. perfringens* e 300- 1000 L per *Giardia* e *Cryptosporidium*. Tuttavia, il parametro può essere considerato importante nella valutazione dell'efficienza dei trattamenti di rimozione fisica, mediante filtrazione, dei due protozoi patogeni dato che le spore hanno dimensioni inferiori delle cisti/oocisti.

## Cosa fare in caso di superamento dei valori di parametro?

La Dir. (UE) 2020/2184 e, di conseguenza, il D.lgs. 18/2023, hanno fissato per i Batteri coliformi un valore di parametro pari a 0 batteri/100 mL per le acque di rete e a 0/250 mL per le acque confezionate in bottiglia. Anche per il parametro *C. perfringens* spore comprese, il valore previsto è pari a 0/100 mL, mentre, per il conteggio delle colonie a 22°C, l'indicazione fornita è "senza variazioni anomale", come già menzionato.

Il superamento dei valori di parametro previsti per gli indicatori microbiologici alla parte C

dell'Allegato I del D.lgs.18 non necessariamente dà luogo a non conformità, a condizione che sia garantito che tali superamenti non siano associati a rischi o a danni diretti per la salute umana. Ciò è stabilito nell'Art.15, comma 1. lettera d) del D.lgs. 18/2023 che testualmente riporta: *"nel caso di superamento dei valori di parametro stabiliti nell'Allegato I, Parte C, l'autorità sanitaria esamina se tale inosservanza costituisca un rischio per la salute umana e - limitatamente ai casi in cui sia necessario per tutelare la salute umana - adotta provvedimenti congrui a ripristinare la qualità delle acque"*. L'accertamento da parte dell'autorità sanitaria della non sussistenza di rischi sanitari fa sì che il superamento si configuri in "inosservanza", non comporti perdita di idoneità all'uso, non sia sanzionabile, ma obblighi comunque il gestore ad eseguire un'indagine approfondita per capirne le cause e adottare misure idonee di ripristino del valore prestabilito.



.Diversamente, il superamento del valore di parametro previsto per i parametri microbiologici fondamentali riportati nella parte A dell'Allegato I del D.lgs. 18/2023, ossia *E. coli* ed enterococchi, rappresenta sempre un potenziale rischio per la salute umana e si configura sempre come una non conformità.

Per il parametro conteggio delle colonie a 22°C, in assenza di un valore soglia, il concetto di superamento dei valori di parametro non è applicabile e, pertanto, nessun valore può configurarsi come inosservanza o non conformità. Tuttavia, in presenza di valori considerati anomali, è necessario che il gestore valuti se gli incrementi osservati possano essere associati a condizioni di rischio per la salute e, se necessario, adotti provvedimenti correttivi.

## Fonti bibliografiche

1. Decreto Legislativo 23 febbraio 2023, n. 18. Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2020, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano (23G00025) (GU Serie Generale n.55 del 06-03-2023).
2. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption.
3. WHO 2022. Guidelines for drinking-water quality. Fourth edition incorporating the first and second addenda.