

PROTOCOLLO SPERIMENTALE PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLE CARAFFE FILTRANTI SULLA QUALITÀ CHIMICA E MICROBIOLOGICA DELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

1. FINALITÀ E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente protocollo è inteso alla valutazione del rischio igienico-sanitario correlato al consumo umano di acque conformi al D.Lgs. 31/2001 e *s.m.i.*, trattate mediante caraffe filtranti, nell'ambito della specifica collaborazione in corso tra Ministero della Salute ed Istituto Superiore di Sanità¹.

Vengono descritti i criteri di verifica in merito alla documentazione tecnica fornita a corredo della caraffa, le condizioni e le modalità operative da adottare durante i test di contatto nonché i metodi analitici per la caratterizzazione dell'acqua trattata in caraffa .

Il protocollo non è espressamente finalizzato alla valutazione dell'efficacia dei trattamenti effettuati in caraffa né alla formulazione di giudizi tecnici sull'utilità o meno di tali dispositivi.

2. NORMATIVE E STANDARD DI RIFERIMENTO

Il presente protocollo è stato redatto tenendo in considerazione i seguenti documenti di riferimento:

- D.Lgs. 31/2001 e *s.m.i.* sulla "qualità delle acque destinate al consumo umano" e *s.m.i.*
- D.M. 174/2004 "Regolamento concernente i materiali e gli oggetti che possono essere utilizzati negli impianti fissi di captazione, trattamento, adduzione e distribuzione delle acque destinate al consumo umano" e *s.m.i.*
- D.M. 25/2012 recante "Disposizioni tecniche concernenti apparecchiature finalizzate al trattamento dell'acqua destinata al consumo umano".
- Reg. CE 1935/04 sui "materiali e gli oggetti destinati al contatto con alimenti"
- Dir. 2004/17/CE che "coordina le procedure di appalto degli enti erogatori di acqua e di energia, degli enti che forniscono servizi di trasporto e servizi postali" e *s.m.i.*
- Norma francese NFP-41-650 del maggio 2009 concernente "gli apparecchi per il trattamento dell'acqua: specifiche per le caraffe filtranti".
- Norma britannica BS-8427:2004 del dicembre 2004 concernenti "i sistemi filtranti dell'acqua mediante caraffa: specifiche".
- Report DWI 6049/2 "Assessment of the Effects of Jug Water Filters on the Quality of Public Water Supplies".
- Rapporto tecnico EUR 20833 EN/1, CPDW Project.
- Rapporto tecnico EUR 20833 EN/2, CPDW Project.
- Metodo 5320B. *American Water Works Association, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters", 21^a edizione.*
- Metodo 3125B . *American Water Works Association, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters", 21^a edizione.*
- Rapporti ISTISAN 07/31. "Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.lgs. 31/2001. Metodi chimici".
- Norma UNI EN 12915-1. Prodotti utilizzati per il trattamento delle acque destinate al consumo umano. Carbone attivo granulare Parte 1: Carbone attivo granulare vergine.
- Norma UNI EN 12915-2. Prodotti utilizzati per il trattamento delle acque destinate al consumo umano. Carbone attivo granulare Parte 2: Carbone attivo granulare riattivato.

¹ Progetto CCM 2011 - Verifica apparecchi per il trattamento delle acque

- Norma UNI EN 12903:2009. Prodotti chimici utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Carbone attivo in polvere.
- Norma UNI EN 12904:2005. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Sabbia e ghiaia di quarzo.
- Norma UNI EN 12905:2006. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Alluminosilicati espansi.
- Norma UNI EN 12906:2006. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano – Pomice.
- Norma UNI EN 12907:2009. Prodotti chimici utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Carbone pirolizzato.
- Norma UNI EN 12909:2006. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano – Antracite.
- Norma UNI EN 12910:2006. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano – Granato.
- Norma UNI EN 12911:2007. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Sabbia verde al manganese.
- Norma UNI EN 12912:2006. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano – Barite.
- Norma UNI EN 12913:2006. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Terra di diatomite in polvere.
- Norma UNI EN 12914:2006. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Perlite in polvere.
- Norma UNI EN 13752:2009. Prodotti utilizzati per il trattamento delle acque destinate al consumo umano - Diossido di manganese.
- Norma UNI EN 13753:2009. Prodotti utilizzati per il trattamento delle acque destinate al consumo umano - Allumina attiva granulare.
- Norma UNI EN 13754:2009. Prodotti utilizzati per il trattamento delle acque destinate al consumo umano - Bentonite.
- Norma UNI EN 14368:2004. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Carbonato di calcio rivestito di diossido di manganese.
- Norma UNI EN 14369:2004. Prodotti utilizzati per il trattamento di acque destinate al consumo umano - Allumina attiva granulare rivestita di ferro.

3. TERMINI, DEFINIZIONI ED ACRONIMI

Ai fini del presente protocollo sono adottate le seguenti definizioni:

Acqua di prova

Acqua di composizione nota rispetto ai parametri di interesse, utilizzata nelle prove di contatto per la valutazione degli effetti prodotti dall'utilizzo della caraffa filtrante sulla qualità chimica e microbiologica.

Acqua di prova per valutazioni su qualità chimica (AP_C)

Acqua di prova per la valutazione degli effetti sulla qualità chimica dell'acqua filtrata.

Acqua di inoculo per valutazioni su qualità microbiologica (AP_I)

Acqua di inoculo utilizzata nella valutazione degli effetti sulla qualità microbiologica dell'acqua trattata in caraffe filtranti.

Acqua di prova per valutazioni su qualità microbiologica (AP_M)

Acqua di prova per la valutazione degli effetti sulla qualità microbiologica dell'acqua trattata in caraffe filtranti.

Capacità nominale della cartuccia filtrante (CN_{filtro})

Volume massimo di acqua trattabile con una cartuccia filtrante, entro il quale il produttore garantisce il corretto funzionamento del dispositivo.

Caraffa filtrante

Dispositivo di filtrazione per acqua potabile non collegato ad una rete idrica, dotato di una cartuccia filtrante e di un recipiente utilizzato per conservare l'acqua filtrata e dispensarla al momento del consumo.

Cartuccia filtrante

Filtro, generalmente composito e costituito da carboni, resine e/o altri materiali, utilizzato in caraffe filtranti al fine di modificare le proprietà organolettiche dell'acqua di origine, di rimuovere altre sostanze potenzialmente presenti in traccia nell'acqua di origine e/o di svolgere attività batteriostatiche; la cartuccia filtrante è caratterizzata da una capacità nominale che definisce il massimo volume di acqua da filtrare.

Ciclo di contatto

Sequenza di prove di contatto. Nella pianificazione del presente protocollo sono previsti:

- cicli di contatto settimanali, ciascuno composto di 5 successivi cicli di contatto giornalieri e di una pausa inter-settimanale;
- cicli di contatto giornalieri, ciascuno dei quali composto da 4 cicli intra-giornalieri, eseguiti in sequenza nel corso della stessa giornata e da un ciclo inter-giornaliero eseguito tra 2 sequenze successive di cicli intra-giornalieri.

Pausa inter-settimanale

Periodo di 48 ore interposto tra due successivi cicli di contatto settimanali, durante il quale la caraffa è lasciata alla temperatura di $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con la cartuccia filtrante immersa nell'acqua di prova.

Prove di contatto

Prove finalizzate alla valutazione degli effetti prodotti dall'utilizzo della caraffa filtrante sulla qualità chimica e microbiologica dell'acqua trattata. I test vengono espletati lasciando a contatto un'acqua di prova con la cartuccia filtrante nei tempi e nei modi stabiliti in modo da simulare in condizioni standardizzate l'utilizzo della caraffa da parte dell'utente.

4. VALUTAZIONE DOCUMENTALE

Acquisire ed esaminare la documentazione a corredo di ciascuna caraffa (istruzioni d'uso e raccomandazioni indicate eventualmente anche sulla confezione) al fine di verificare:

- la presenza ed adeguatezza della certificazione di rispondenza ai requisiti di sicurezza alle direttive comunitarie che prevedono la marcatura CE;
- la presenza e la completezza della dichiarazione di conformità delle apparecchiature relativamente: al D.M. 25/2012, al D.M. 174/2004, al D.Lgs. 31/2001 e *s.m.i.* e, in difetto di misure specifiche, al regolamento CE 1935/2004; ai requisiti di sicurezza applicabili; alle norme specifiche applicabili; alle finalità specifiche cui l'apparecchiatura è destinata;
- la presenza sulla confezione e l'adeguatezza delle informazioni inerenti le finalità specifiche cui l'apparecchiatura è destinata, i valori dei parametri del D.Lgs. 31/2001 e *s.m.i.* modificati dal trattamento applicato, il periodo di utilizzo e i valori prestazionali garantiti dal dispositivo impiegato;
- la tipologia dei trattamenti implementati;
- le modalità di pulizia preliminare della caraffa prima del suo primo impiego;
- la procedura per l'attivazione e il posizionamento della cartuccia filtrante;

- la procedura per la riattivazione della cartuccia filtrante dopo un periodo di mancato utilizzo
- la capacità filtrante della caraffa ;
- la capacità nominale della cartuccia filtrante;
- la temperatura e le condizioni di conservazione dalla caraffa durante l'utilizzo;
- le eventuali limitazioni di utilizzo;
- le ulteriori raccomandazioni d'uso.

5. PROVE DI CONTATTO

5.1. Criteri

Le procedure descritte nel presente protocollo per le prove di contatto sono state elaborate tenendo conto dei seguenti criteri:

- necessità di definire ed armonizzare criteri e metodi di valutazione per la valutazione del rischio igienico-sanitario correlato al consumo umano di acque trattate mediante caraffe filtranti, con particolare riguardo a:
 - riferimenti normativi vigenti, con particolare riguardo al D.lgs. 31/2001 e *s.m.i.* e D.M. 25/2012;
 - standard europei attualmente disponibili;
 - modalità operative fornite dai produttori delle caraffe filtranti attualmente in commercio e/o ragionevolmente praticabili dall'utenza;
 - parametri per i quali sulla base dei dati disponibili siano state evidenziate o presunte modificazioni sulla qualità dell'acqua filtrata in caraffa di potenziale interesse igienico-sanitario;
 - composizione e qualità rappresentativa delle acque potabili attualmente in distribuzione in Italia².
- acquisizione dei dati di prova entro i limiti temporali fissati nel progetto CCM 2011;
- valutazione di un numero rappresentativo di caraffe filtranti sulla base degli obiettivi e risorse disponibili per il progetto CCM 2011.

5.2. Valutazione degli effetti sulla qualità chimica dell'acqua filtrata

5.2.1. Procedura generale

Ciascuna caraffa in esame è sottoposta ad una serie di prove di contatto con AP_C appositamente preparata in laboratorio.

Al fine di simulare le condizioni di utilizzo reale del dispositivo di trattamento, sono previsti 5 cicli di contatto settimanali consecutivi. In particolare, le prove sono articolate in 4 cicli di contatto intra-giornalieri della durata di 30 min ciascuno, da espletare in sequenza. Al termine dell'ultimo ciclo intra-giornaliero è avviato un ciclo di contatto inter-giornaliero durante il quale l'acqua di prova viene mantenuta in contatto con la cartuccia filtrante fino al successivo giorno di prova.

Al termine della sequenza di 5 giorni di prove di contatto intra- ed inter-giornaliere viene effettuata una pausa di 48 ore (pausa inter-settimanale), durante la quale la caraffa è mantenuta alla temperatura di 25 ± 2°C in presenza dell'acqua di prova. Al termine della pausa inter-settimanale che conclude ciascun ciclo di

² Sono stati presi in considerazione i dati rappresentativi relativi a i valori medi dei principali parametri di qualità dell'acqua (pH, conduttività elettrica, alcalinità, durezza totale, fluoruro, cloruro, nitrato, solfato, magnesio, calcio, sodio e potassio) distribuita nei maggiori centri urbani, disponibili sulla base dei dati pubblici relativi a controlli interni ed esterni di cui al D.Lgs. 31/2001 e *s.m.i.*

contatto settimanale l'acqua di prova viene scartata e la cartuccia filtrante viene riattivata per avviare il successivo ciclo settimanale.

Tutti i cicli sono espletati ponendo la caraffa in contatto statico con l'acqua di prova in quantità compresa tra 0,5 e 2% della CN_{filtro} (preferibilmente prossimo all'1% della CN_{filtro}) in modo da garantire l'immersione completa della cartuccia filtrante³. Nel corso del test la temperatura della caraffa è mantenuta a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Immediatamente prima di ogni nuovo ciclo di contatto la caraffa è interamente svuotata, prelevando aliquote dell'acqua di prova per le eventuali analisi chimiche e scartando il liquido non necessario. I cicli di contatto settimanali vengono ripetuti fino al raggiungimento di un volume di acqua trattato pari al 125% della CN_{filtro} (5 settimane nel caso in cui si utilizzi, per ogni ciclo di contatto, un volume di acqua pari all'1% del CN_{filtro}). Il superamento della CN_{filtro} consente la valutazione del comportamento della cartuccia filtrante nel caso in cui l'utilizzatore della caraffa non rispetti i limiti di impiego specificati dal produttore.

In Fig. 1 è rappresentato uno schema sinottico della procedura applicata durante i test di contatto al fine di valutare gli effetti sulla qualità chimica dell'acqua trattata.

La Fig. 2 mostra una schematizzazione delle attività giornaliere espletate durante le prove di contatto.

Tutte le prove eseguite su ciascuna caraffa sono replicate cambiando la cartuccia filtrante al fine di valutare la variabilità di comportamento di quest'ultima.

5.2.2. Pulizia preliminare della caraffa ed attivazione o riattivazione della cartuccia filtrante

Le operazioni preliminari di pulizia della caraffa e di attivazione iniziale della cartuccia filtrante sono effettuate in base alle indicazioni del produttore. Le successive operazioni di riattivazione della cartuccia filtrante dopo ciascuna pausa inter-settimanale sono espletate applicando le istruzioni specifiche del produttore o, in assenza, le prescrizioni fornite per la prima attivazione.

5.2.3. Composizione dell'AP_C

La preparazione di AP_C è eseguita all'inizio di ciascun ciclo di prova giornaliero. Nelle Tab. 1 e 2 sono elencate la composizione dell'AP_C⁴ e la concentrazione dei costituenti necessari alla sua preparazione.

Immediatamente prima del riempimento della caraffa, l'acqua di prova viene additivata con aliquote di soluzioni acquose contenenti sodio umato, sodio ipoclorito e cloroformio in concentrazione definita in

³ Ad esempio nel caso di un dispositivo filtrante con CN_{filtro} pari a 100 L, viene impiegato 1 L di acqua di prova se sufficiente a ricoprire l'intera cartuccia.

⁴ Per l'individuazione della composizione dell'acqua di prova sulla base dei criteri definiti per le prove di contatto (cfr. sez. 5.1), sono state fissate le concentrazioni degli ioni fluoruro, nitrato, solfato, calcio e magnesio considerando in particolare:

- fluoruro in concentrazione prossima al valore medio nelle acque potabili italiane esaminate;
- nitrato in concentrazione prossima al valore massimo riscontrabile nelle acque potabili italiane esaminate;
- durezza totale in concentrazione prossima a quella minima riscontrabile nelle acque potabili italiane esaminate, e comunque nel campo di applicazione delle caraffe;
- calcio e magnesio in concentrazione compatibile col valore prescelto di durezza totale assicurando, al contempo, un rapporto ponderale tra i due ioni (Ca/Mg) pari al valore medio riscontrabile nelle acque potabili italiane esaminate.

I criteri utilizzati nella scelta dei valori di concentrazione per i parametri nitrato e durezza derivano dalla necessità di testare il comportamento delle cartucce filtranti nelle condizioni più critiche per il mantenimento della qualità dell'acqua trattata.

La concentrazione degli ioni bicarbonato, cloruro, solfato, sodio e potassio nell'acqua di prova è stata stabilita prendendo in considerazione la tipologia dei sali inorganici disponibili in commercio, i valori medi riscontrabili nelle acque potabili italiane esaminate ed applicando i criteri inerenti l'elettroneutralità e il bilanciamento ionico alla soluzione risultante.

tabb. 1 e 2, al fine di simulare la presenza, rispettivamente, della sostanza organica disciolta, del disinfettante residuo a base di cloro e dei sottoprodotti di quest'ultimo⁵.

Immediatamente prima dei test di contatto, prelevare ed analizzare aliquote dell'acqua di prova nei giorni fissati per la caratterizzazione di verifica della qualità dell'AP_C trattata nella caraffa.

5.2.4. Parametri da esaminare

I seguenti parametri sono determinati nei campioni di AP_C prima e dopo il trattamento all'interno della caraffa: pH, conduttività elettrica, solidi sospesi totali, cloro residuo libero e combinato (Cl_{2,lib} e Cl_{2,comb}), alcalinità totale, nitrito, nitrato, solfato, cloruro, fluoruro, durezza totale, ammonio, calcio, magnesio, sodio, potassio, argento, altri elementi in tracce tra quelli all'All. I, parte B del D.lgs. 31/2001, carbonio organico totale, trialometani (THM), composti organoalogenati adsorbibili (AOX), composti organici estraibili in diclorometano.

Ulteriori parametri potranno essere oggetto di determinazione analitica in base a valutazioni specifiche sulle tecnologie di trattamento e sui materiali impiegati, derivanti principalmente dell'analisi documentale (sez. 4).

5.2.5. Procedura di riempimento della caraffa con l'AP_C

Il quantitativo di AP_C necessario all'allestimento delle prove di contatto intra e inter-giornaliere viene preparato solubilizzando i sali inorganici, elencati nella Tab. 2, in acqua demineralizzata all'interno di un recipiente in polietilene munito di rubinetto.

Immediatamente prima del riempimento della caraffa in esame un'aliquota di tale soluzione è introdotta in una bottiglia di vetro provvista di ancoretta magnetica e di tappo in polietilene con due vie di accesso. Nella bottiglia sono quindi aggiunti, in successione, volumi appropriati delle soluzioni stock contenenti sodio umato, cloroformio e sodio ipoclorito in modo da ottenere le rispettive concentrazioni specificate in Tab. 2. La soluzione acquosa è quindi omogeneizzata per agitazione lenta con ancoretta magnetica evitando la formazione di vortici. L'AP_C così ottenuta viene travasata nella caraffa in esame, simulando il riempimento del dispositivo mediante un comune rubinetto di utenza, utilizzando un tubo di Teflon e pressurizzando la bottiglia con gas inerte. Al fine di limitare il rischio di perdite delle sostanze volatili durante l'operazione di travaso, l'estremità del tubo di Teflon introdotta nella caraffa deve essere posta a diretto contatto con la cartuccia filtrante.

5.2.6. Piano e procedura di campionamento dell'acqua trattata in caraffa

Nei giorni durante i quali il volume filtrato nella caraffa raggiunge il 5%, il 15%, il 25%, il 35%, il 50%, il 75%, il 100% e il 125% della CN_{filtro} vengono prelevati ed analizzati campioni dell'acqua trattata al termine di ciascuno dei 4 cicli di contatto intra-giornalieri e del successivo ciclo di contatto inter-giornaliero. I parametri pH, nitrito, nitrato, solfato, cloruro, fluoruro, durezza totale, ammonio, calcio, magnesio, sodio, potassio e argento saranno determinati in tutti i prelievi effettuati, mentre i rimanenti saranno analizzati nei campioni prelevati almeno in corrispondenza del 5%, 25%, 50% e 100% della CN_{filtro}.

Il prelievo delle aliquote di AP_C trattata nella caraffa è effettuato applicando le seguenti modalità.

- Al termine del periodo di contatto con la cartuccia filtrante, l'acqua trattata viene omogeneizzata per 60 s all'interno della caraffa mediante agitazione lenta con ancoretta magnetica evitando la formazione di vortici.

⁵ La concentrazione finale di sodio umato è tale da assicurare la presenza in acqua di un valore di carbonio organico totale pari a 0,4 mg/L, corrispondente a quello mediamente riscontrabile nelle acque potabili di origine sotterranea. Le concentrazioni di sodio ipoclorito e di cloroformio nell'acqua di prova sono rispettivamente pari al valore consigliato di disinfettante residuo (0,2 mg/L di cloro libero) e al valore parametrico dei trialometani (25 µg/L).

- Le aliquote di AP_C trattata necessarie alla determinazione analitica delle specie volatili e/o reattive (Cl_{2,lib}, Cl_{2,comb}, THM e AOX) sono prelevate e trasferite direttamente nei contenitori di analisi mediante sifonamento attraverso un tubo in Teflon. In particolare il riempimento dei *vial* utilizzati per la determinazione dei trialometani viene effettuato evitando il gorgogliamento del campione nel recipiente ed assicurando la fuoriuscita di alcuni millilitri di liquido.
- Le aliquote di AP_C trattata necessarie alla determinazione analitica delle altre specie da esaminare sono prelevate direttamente dalla caraffa.
- La concentrazione delle specie volatili e/o reattive (Cl_{2,lib}, Cl_{2,comb}, THM e AOX) è determinata nelle singole aliquote di campione prelevate dalla caraffa al completamento di ciascuno dei cicli intra- e inter-giornalieri. I risultati ottenuti nell'arco di una giornata durante le prove di contatto intra-giornaliere (4 valori per parametro, ovvero uno per ogni ciclo di contatto) sono mediati. Questa procedura consente la valutazione della concentrazione media giornaliera dei suddetti parametri senza incorrere nel rischio di sottostimare gli analiti a seguito della loro progressiva riduzione che si verificherebbe in caso di stoccaggio temporaneo dell'acqua trattata.

I rimanenti parametri da esaminare, non affetti da tale problema, sono dosati in base alle seguenti modalità:

- direttamente nel campione medio composito ottenuto mescolando 4 volumi uguali prelevati ciascuno al termine di ogni ciclo di contatto intra-giornaliero.;
- nel singolo campione derivante dalla successiva prova di contatto inter-giornaliera.

5.2.7. Metodi analitici

Tutti i parametri sono dosati secondo le procedure descritte nei Rapporti ISTISAN 07/31, ad eccezione dei composti organici estraibili in diclorometano, degli AOX e dell'argento. La determinazione dei primi è effettuata applicando la procedura descritta nei Rapporti tecnici EUR 20833 EN/1 e 2; la concentrazione di AOX e quella dell'argento sono invece misurate utilizzando, rispettivamente, il metodo 5320B e il metodo 3125B pubblicati dall'*American Water Works Association in Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters*, 21^a edizione.

5.3. Valutazione degli effetti sulla qualità microbiologica dell'acqua filtrata

5.3.1. Generalità

Le caraffe da esaminare sono sottoposte ad esame mediante un test di contatto con un'acqua di prova appositamente preparata in laboratorio in cui è inoculata una sospensione omogenea di batteri coliformi (*Enterobacter aerogenes*).

Con l'obiettivo di simulare le condizioni di utilizzo reale del dispositivo di trattamento tenendo conto dei criteri definiti in sez. 5.1., i cicli di contatto si sviluppano con tempistica e modalità in funzione della capacità nominale della cartuccia filtrante.

Nel caso in cui il produttore riporti la CN_{filtro}, il valore del volume deve essere diviso per il tempo (1 settimana = 5 giorni), in modo da ottenere il volume giornaliero da filtrare. Quando per la cartuccia filtrante è indicata la durata di utilizzo oltre la CN_{filtro}, la prova deve essere condotta filtrando il 5% della CN_{filtro} / giorno.

Gli esami sono ripetuti fino al raggiungimento di un volume di acqua trattato pari al 125% della CN_{filtro}. Il superamento della CN_{filtro} consente di valutare il comportamento della cartuccia filtrante nel caso in cui l'utilizzatore della caraffa non rispetti i limiti di impiego specificati dal produttore.

Durante il fine settimana (pausa inter-settimanale), la caraffa è mantenuta al buio a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, riempita con acqua di prova in condizioni statiche.

Ciascun test di prova è eseguito ponendo il dispositivo filtrante in contatto statico con acqua di prova in modo da garantire l'immersione completa della cartuccia filtrante.

Nel corso del test la temperatura della caraffa è mantenuta alla temperatura di $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e al buio.

Tutte le prove eseguite su ciascuna caraffa sono replicate utilizzando una nuova cartuccia filtrante al fine di valutare la variabilità di comportamento di quest'ultima.

5.3.2. Pulizia preliminare della caraffa ed attivazione e riattivazione della cartuccia filtrante

Le operazioni preliminari di pulizia della caraffa e di attivazione iniziale della cartuccia filtrante sono effettuate in base alle indicazioni del produttore. Le successive operazioni da eseguire dopo ciascuna pausa inter-settimanale sono espletate applicando, per il caso specifico, le istruzioni del produttore o, in assenza, le prescrizioni fornite per la prima attivazione.

5.3.3. Preparazione della sospensione di *E. aerogenes* ATCC 13048

5.3.3.1. A partire dal ceppo standard, seminare *E. aerogenes* in Brodo Triptone di Soia (TSB) per 24 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A partire da questa sospensione, seminare una piccola aliquota su piastre di Triptone Soia Agar incubando a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 20 ± 4 ore.

5.3.3.2. Il prelievo delle colonie è realizzato con una spatola sterile di vetro risospendendo in circa 5 mL di una soluzione salina sterile (0,85% NaCl). Omogeneizzare la sospensione batterica con l'aiuto di un agitatore per almeno 5 min.

5.3.3.3. Seminare la sospensione su agar MacConkey (20 ± 4 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$) per la determinazione delle concentrazioni. E' possibile conservarla per una settimana a $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

Per l'eventuale diluizione della sospensione, per il raggiungimento della concentrazione prevista, eventualmente, utilizzare acqua di prova. La preparazione della sospensione di *E. aerogenes* deve essere effettuata e titolata settimanalmente per essere utilizzata per l'alimentazione della settimana successiva.

5.3.4. Preparazione dell' AP_M

La AP_M viene preparata a partire da acqua di rubinetto, trattata come di seguito indicato:

- Rimuovere il cloro mediante una soluzione al 10% di sodio tiosolfato in ragione di 0,1 mL per 100 mL di acqua;
- Filtrare attraverso membrane di esteri misti di cellulosa con pori di diametro di $0,22 \mu\text{m}$;
- Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.

5.3.5. Preparazione dell' AP_I

La AP_I viene preparata a partire AP_M trattate come di seguito indicato:

- Aggiungere allo 0,1% peptone di caseina di soia.
- Al momento della prova aggiungere un'aliquota della sospensione omogenea del ceppo di *E. aerogenes* ATCC 13048 in modo da raggiungere una concentrazione finale di 10^1 - 10^3 batteri / 100 mL.

L' AP_I viene utilizzata per l'alimentazione della caraffa nei cicli di contatto previsti; parallelamente, su un'aliquota della AP_I mantenuta in laboratorio a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e prelevata in corrispondenza di ciascun ciclo di contatto viene eseguita la determinazione della concentrazione di *E. aerogenes* (ufc / 100 mL), considerata come concentrazione di riferimento dell' AP_I .

Per il quantitativo di AP_I da preparare, bisogna tenere conto delle quantità necessarie per i due utilizzi e del volume necessario per i cicli di contatto giornalieri in base alla CN_{filtro} .

5.3.6. Piano e procedura di riempimento, inoculo e campionamento⁶

Al fine di simulare le condizioni di utilizzo reale del dispositivo di trattamento, sono previsti 5 cicli di contatto settimanali consecutivi. In particolare, le prove sono articolate in 4 cicli di contatto intra-giornalieri della durata di 30 min ciascuno, da espletare in sequenza. Al termine dell'ultimo ciclo intra-giornaliero è avviato un ciclo di contatto inter-giornaliero durante il quale l'acqua di prova viene mantenuta in contatto con la cartuccia filtrante fino al successivo giorno di prova.

Al termine della sequenza di 5 giorni di prove di contatto intra- ed inter-giornaliere viene effettuata una pausa di 48 ore (pausa inter-settimanale), durante la quale la caraffa è mantenuta alla temperatura di $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in presenza dell'acqua di prova. (è in contrasto con 5.3.6.3.1)

Per le prove del primo ciclo settimanale, finalizzato al pre-condizionamento della caraffa, viene utilizzata AP_M mentre i 4 successivi cicli di contatto settimanali sono condotti utilizzando AP_I preparata all'inizio di ogni ciclo.

Tutti i cicli sono espletati ponendo la caraffa in contatto statico con l'acqua di prova in quantità compresa tra 0,5 e 2% della CN_{filtro} (preferibilmente prossimo all'1% della CN_{filtro}) in modo da garantire l'immersione completa della cartuccia filtrante⁷.

In Tab. 3 è rappresentato lo schema della procedura che deve essere applicata durante i test di contatto al fine di valutare gli effetti sulla qualità microbiologica dell'acqua trattata.

Di seguito si riporta un calendario delle procedure ed operazioni da eseguire nel corso della sequenza di 5 cicli settimanali eseguiti per la valutazione di ciascuna caraffa filtrante.

5.3.6.1. Prima settimana (25% della CN_{filtro})

5.3.6.1.1. Per l'attivazione della cartuccia filtrante si utilizza AP_M , operando come descritto in sez. 5.3.2.

5.3.6.1.2. Si procede quindi alla fase di pre-condizionamento della cartuccia con AP_M , che comprende 4 successivi cicli di contatto intra-giornalieri della durata di 30 min ciascuno, cui segue un ciclo inter-giornaliero, in cui la caraffa è mantenuta al buio a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. In ciascun ciclo la caraffa è tenuta in contatto statico con AP_M in quantità preferibilmente prossima all'1% della CN_{filtro} e comunque in modo da garantire l'immersione completa della cartuccia filtrante⁸.

5.3.6.1.3. La fase settimanale di precondizionamento si protrae per 5 giorni consecutivi cui segue la pausa inter-settimale, fino al 25% della CN_{filtro} indicata dal produttore.

5.3.6.1.4. Durante la fase di precondizionamento si effettuano analisi dell'acqua di prova per la determinazione di *Escherichia coli* ed Enterococchi.

5.3.6.2. Seconda settimana (50% della CN_{filtro})

5.3.6.2.1. Primo giorno:

a) Preparare una quantità di AP_I secondo quanto descritto in 5.3.5.

b) Prelevare 1 L dell' AP_I e mantenerla in un contenitore sterile, al buio a $25 \pm 2^\circ\text{C}$: da tale sospensione prelevare giornalmente aliquote per la determinazione della concentrazione di *E. aerogenes* (ufc/100 mL) considerata come concentrazione di riferimento dell' AP_I .

⁶ Si riporta, a titolo di esempio il calendario di prove da eseguire nell'arco di 5 settimane sino al 125% della CN_{filtro} .

⁷ Ad esempio nel caso di un dispositivo filtrante con CN_{filtro} pari a 100 L, viene impiegato 1 L di acqua di prova se sufficiente a ricoprire l'intera cartuccia.

⁸ Ad esempio nel caso di un dispositivo filtrante con CN_{filtro} pari a 100 L, si impiegherà 1 L di acqua di prova se sufficiente a ricoprire l'intera cartuccia per un totale di 5 L al giorno..

c) Utilizzare altre aliquote dell'AP_I (crf. 5.3.6.2.1.a) per i cicli di contatto intra- ed inter-giornalieri, come di seguito descritto:

- dopo aver proceduto allo svuotamento della caraffa contenente l'AP_M, al termine della pausa inter-settimanale, eseguire 4 cicli di contatto intra-giornaliero con AP_I della durata di 30 min ciascuno ed a seguire un quinto ciclo di contatto inter-giornaliero;
- al termine di ciascun ciclo di contatto intra-giornaliero recuperare la AP_I filtrata dalla caraffa e, riunendo i volumi ottenuti da ciascuno dei primi 4 cicli di contatto intra-giornaliero, formare il campione medio composito giornaliero, da sottoporre ad analisi per la determinazione di *E. aerogenes*;
- la caraffa contenente l'AP_I del quinto e ultimo ciclo di contatto inter-giornaliero, è conservata a 25 ± 2°C fino al giorno successivo.

5.3.6.2.2. *Secondo giorno:*

- a) Recuperare l'AP_I rimasta nella caraffa durante il ciclo inter-giornaliero e procedere alla determinazione di *E. aerogenes*.
- b) eseguire 4 cicli di contatto intra-giornaliero con AP_M della durata di 30 min ciascuno ed a seguire un quinto ciclo di contatto inter-giornaliero;
- c) al termine di ciascun ciclo di contatto intra-giornaliero recuperare la AP_M filtrata dalla caraffa e, riunendo i volumi ottenuti da ciascuno dei primi 4 cicli di contatto intra-giornaliero, formare il campione medio composito giornaliero, da sottoporre ad analisi per la determinazione di *E. aerogenes*.
- d) la caraffa contenente l'AP_M del quinto e ultimo ciclo di contatto inter-giornaliero, è conservata a 25 ± 2°C fino al giorno successivo.
- e) prelevare 100 mL di aliquota di AP_I (cfr. 5.3.6.2.1. b) per la determinazione della concentrazione di *E. aerogenes*.

5.3.6.2.3. *Terzo giorno:*

Procedere secondo quanto descritto al punto 5.3.6.2.2.

5.3.6.2.4. *Quarto giorno:*

Procedere secondo quanto descritto al punto 5.3.6.2.2.

5.3.6.2.5. *Quinto giorno:*

- a) Recuperare l'AP_M rimasta nella caraffa durante il ciclo inter-giornaliero e procedere alla determinazione di *E. aerogenes*.
- b) eseguire 4 cicli di contatto intra-giornaliero con AP_I della durata di 30 min ciascuno ed a seguire un quinto ciclo di contatto (inter-settimanale);
- c) al termine di ciascun ciclo di contatto intra-giornaliero recuperare la AP_M dalla caraffa e, riunendo i volumi ottenuti da ciascuno dei primi 4 cicli di contatto intra-giornaliero, formare il campione medio composito giornaliero, da sottoporre ad analisi per la determinazione di *E. aerogenes*.
- d) la caraffa contenente l'AP_M del ciclo di contatto inter-settimanale, è conservata a 25 ± 2°C per le successive 48 ore.
- e) prelevare 100 mL di aliquota di AP_I (cfr. 5.3.6.2.1.b) per la determinazione della concentrazione di *E. aerogenes*.

5.3.6.3. *Terza settimana (75% della CN filtro)*

5.3.6.3.1. *Primo giorno:*

- a) Recuperare l'AP_M rimasta nella caraffa durante la pausa inter-settimanale (cfr. 5.3.6.2.5.b) e procedere alla determinazione di *E. aerogenes*.
- b) Procedere come indicato in 5.3.6.2.1.a.

c) Procedere come indicato in 5.3.6.2.1.b.

d) Procedere come indicato in 5.3.6.2.1.c.

5.3.6.3.2. *Secondo giorno:*

Procedere come indicato in 5.3.6.2.2.

5.3.6.3.3. *Terzo giorno:*

Procedere come indicato in 5.3.6.2.2.

5.3.6.3.4. *Quarto giorno:*

Procedere come indicato in 5.3.6.2.2.

5.3.6.3.5. *Quinto giorno:*

Procedere come indicato in 5.3.6.2.5.

5.3.6.4. *Quarta settimana (100% della CN_{filtro})*

Procedere come indicato in 5.3.6.3.

5.3.6.5. *Quinta settimana (125% della CN_{filtro})*

Procedere come indicato in 5.3.6.3.

5.3.7. *Metodi analitici*

5.3.7.1. Per la determinazione di *Escherichia coli* ed Enterococchi si utilizzano i metodi previsti da Rapporti ISTISAN 07/5 "Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL. vo 31/2001. Metodi microbiologici".

5.3.7.2. *Procedura analitica per la determinazione di Enterobacter aerogenes.*

La procedura analitica di seguito descritta si utilizza per la determinazione di *Enterobacter aerogenes* sia nell' AP₁ trattata in caraffa che nell' AP₁ utilizzata come riferimento.

Separatamente per ogni verifica, prelevare 100 mL dal campione medio composito, e dal filtrato dopo stagnazione e dall'AP₁ (cfr. 5.3.6.2. b) controllo e filtrare attraverso una membrana di esteri misti di cellulosa con pori di diametro di 0,45 µm, secondo le normali e definite regole per l'analisi microbiologica. La membrana è quindi posta su una piastra di terreno MacConkey agar successivamente incubata a 36 ± 1°C per 20 ± 4 ore.

5.4. **Indagini supplementari correlate a diverse modalità di utilizzo**

Al termine dell'espletamento delle prove sperimentali su un numero rappresentativo di caraffe disponibili in commercio, saranno selezionati alcuni dispositivi da sottoporre ad ulteriori test di contatto per valutare gli effetti di differenti modalità di utilizzo, comunque plausibili, sulla qualità dell'acqua trattata. In particolare saranno effettuate prove:

- termostatando la caraffa alla temperatura di 4 - 5°C per stimare gli effetti della temperatura di refrigerazione sul comportamento delle cartucce filtranti prescelte;
- incrementando il tempo di utilizzo della cartuccia filtrante fino al raggiungimento del 200% della CN_{filtro} per valutare gli effetti correlati ad un utilizzo prolungato;
- conservando la cartuccia filtrante in assenza di acqua di prova durante la notte e/o il fine settimana.

5.5. **Valutazione dei risultati**

In base ai risultati ottenuti durante l'indagine, saranno valutati:

- gli andamenti temporali delle variazioni di composizione chimica e microbiologica dell'acqua trattata in caraffa;
- la capacità da parte della cartuccia filtrante di essere colonizzata da microrganismi.

Tabella 1

Composizione dell'acqua di prova impiegata nella valutazione degli effetti sulla qualità chimica dell'acqua filtrata⁹.

Specie chimica	Concentrazione	
Sodio	63	mg/L
Potassio	31	mg/L
Magnesio	12	mg/L
Calcio	60	mg/L
Durezza totale	20	°F
Bicarbonato	0,21	g/L
Fluoruro	0,19	mg/L
Cloruro	91	mg/L
Nitrato	24	mg/L
Solfato	50	mg/L
Ipoclorito (come Cl ₂)	0,20	mg/L
Umato	0,67	mg/L
Cloroformio	25	µg/L
Concentrazione degli ioni idrogeno (pH)	7.9	Unità di pH
Conducibilità elettrica ($\chi_{20^{\circ}\text{C}}$)	783	µS/cm
TOC	0,4	mg/L

Tabella 2

Concentrazione dei sali da impiegare nella preparazione dell'acqua di prova definita in Tab. 1.

Reagente	Concentrazione (mg/L)
NaF	0,420
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	106
Mg(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	67,5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	173
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	88,0
KHCO ₃	79,1
NaHCO ₃	227
NaClO (come Cl ₂)	0,20
Na ₂ umato 50-60%	1,5
Cloroformio	0,025

⁹ La composizione è rappresentativa di valori riferiti ad analisi di una soluzione preparata di fresco.

Tabella 3

Piano e procedura di riempimento, inoculo e campionamento¹⁰ per le prove microbiologiche (cfr.5.3.6).

Periodo di prova		Attivazione della cartuccia filtrante e prove di contatto			Determinazione analitica delle concentrazioni di <i>E. aerogenes</i>			
Settimana	Giorno	Attivazione o Riattivazione cartuccia filtrante	Preparazione nuova AP _i da utilizzare per il ciclo di contatto settimanale	Ciclo di contatto intra- ed inter-giornaliero o inter-settimanale (5% CN _{filtro})		su campione composito giornaliero	su campione inter-giornaliero o inter-settimanale	su AP _i di riferimento
				AP _I	AP _M			
1 (25% CN _{filtro})	1° giorno	✓	Nota 1		✓			
	2° giorno				✓			
	3° giorno				✓			
	4° giorno				✓			
	5° giorno				✓			
Pausa inter-settimanale								
2 (50% CN _{filtro})	1° giorno	✓	✓	✓		✓	✓	✓
	2° giorno				✓	✓	✓	✓
	3° giorno				✓	✓	✓	✓
	4° giorno				✓	✓	✓	✓
	5° giorno				✓	✓	✓	✓
Pausa inter-settimanale								
3 (75% CN _{filtro})	1° giorno	✓	✓	✓		✓	✓	✓
	2° giorno				✓	✓	✓	✓
	3° giorno				✓	✓	✓	✓
	4° giorno				✓	✓	✓	✓
	5° giorno				✓	✓	✓	✓
Pausa inter-settimanale								
4 (100% CN _{filtro})	1° giorno	✓	✓	✓		✓	✓	✓
	2° giorno				✓	✓	✓	✓
	3° giorno				✓	✓	✓	✓
	4° giorno				✓	✓	✓	✓
	5° giorno				✓	✓	✓	✓
Pausa inter-settimanale								
5 (125% CN _{filtro})	1° giorno	✓	✓	✓		✓	✓	✓
	2° giorno				✓	✓	✓	✓
	3° giorno				✓	✓	✓	✓
	4° giorno				✓	✓	✓	✓
	5° giorno				✓	✓	✓	✓
Termine delle prove								

Nota 1: nella 1 settimana di prove di contatto viene eseguito il pre-condizionamento della cartuccia filtrante utilizzando AP_M.

¹⁰ Si riporta, a titolo di esempio il calendario di prove da eseguire nell'arco di 5 settimane sino al 125% della CN_{filtro}.

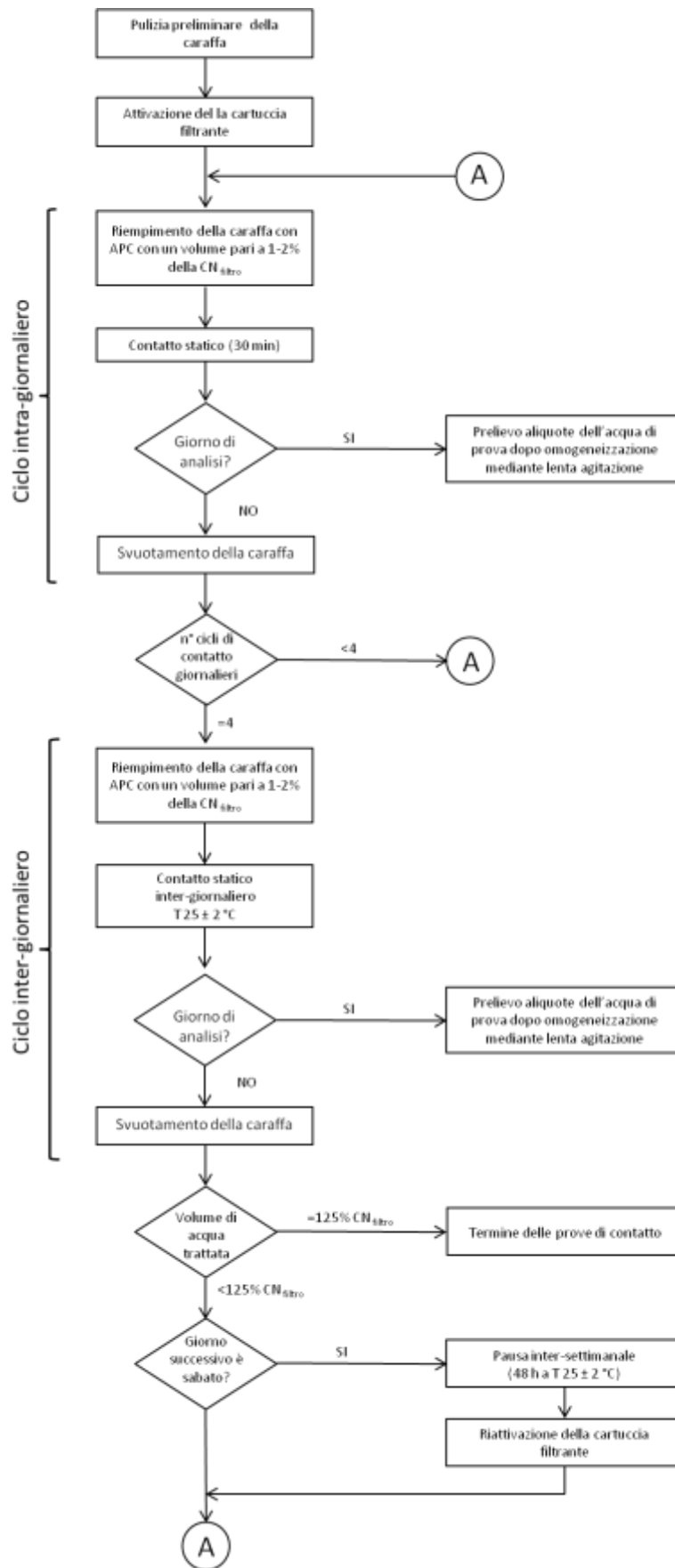


Figura 1. Schema sinottico della procedura applicata durante le prove chimiche.

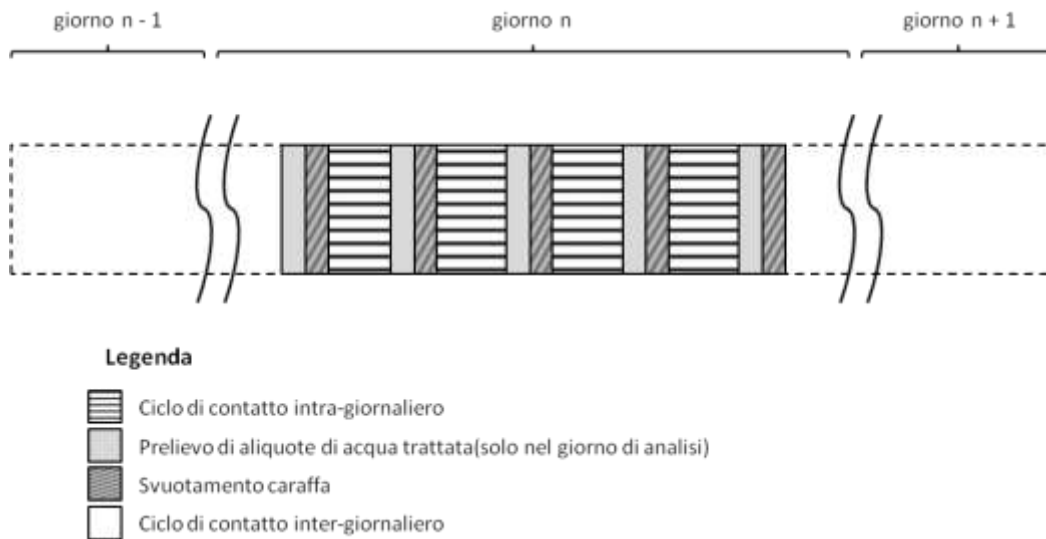


Figura 2. Schematizzazione delle attività giornaliere espletate durante le prove chimiche.