

D.M. 13-01-1993

Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali e modalità per i relativi prelievi dei campioni.

(G.U. 19-01-1993, n. 14, Serie Generale)

▣ Preambolo

CAPO I

METODI DI ANALISI PER LA VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E DI COMPOSIZIONE DELLE ACQUE MINERALI NATURALI

▣ Art. 1

▣ Art. 2

CAPO II

MODALITA' PER IL PRELEVAMENTO DEI CAMPIONI

▣ Art. 3

▣ Art. 4

▣ Art. 5

▣ Art. 6

Preambolo

IL MINISTRO DELLA SANITA'

Visto il decreto legislativo 25 gennaio 1992, n. 105, recante disposizioni per l'attuazione della direttiva n. 80/777/CEE relativa all'utilizzazione e alla commercializzazione delle acque minerali naturali.

Visto in particolare l'art. 2, 3° comma, del citato decreto n. 105, che, ai fini del riconoscimento delle acque minerali naturali, prevede l'emanazione di norme concernenti i metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali stesse e le modalità per i relativi prelievi di campioni.

Visto l'art. 34 del regio decreto 28 settembre 1919, n. 1924

Visto l'art. 6, lettera t), della legge 23 dicembre 1978, n. 833

Visti gli articoli 1 e 3 del D.C.G. 7 novembre 1939, n. 1856.

Sentito il parere del Consiglio superiore di sanità in data 24 giugno 1992

Decreta:

CAPO I

METODI DI ANALISI PER LA VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E DI COMPOSIZIONE DELLE ACQUE MINERALI NATURALI

Art. 1

Ai fini del riconoscimento delle acque minerali naturali, le analisi microbiologiche debbono essere eseguite secondo le seguenti modalità:

1) Carica microbica.

Seminare in Plate Count Agar (tecnica agar germi) aliquote da 1 ml del campione in quattro piastre di Petri. Incubare due piastre a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 2\text{h}$ e due piastre a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $72\text{h} \pm 2\text{h}$. Procedere alla conta delle colonie.

2) Coliformi in 250 ml:

A) Metodo con terreno liquido. Seminare due beute provviste di campanula, contenenti ml 125 di brodo lattosato a tripla concentrazione, rispettivamente con ml 250 del campione. Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$. Le beute positive (torbidità e presenza di gas) debbono essere sottoposte a subcolture in brodo lattosato-bile verde brillante da incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$ ed a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$. Dalle colture positive procedure 2h ed a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$. Dalle colture positive procedere all'isolamento su agar Mac Conkey e alle prove biochimiche di conferma (H₂S, indolo, ornitina decarbossilasi).

B) Metodo con membrane filtranti. Filtrare due aliquote di 250 ml ciascuna di campione attraverso membrane filtranti (0.45μ). Porre le due membrane, rispettivamente, su piastre di “agar lattosato al tergitolo 7” da incubare a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 2\text{h}$ e di “agar lattosato al tergitolo 7 + cloruro di trifeniltetrazolio” da incubare a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Prelevare le colonie gialle su AT7 e quelle dal giallo al rosso su AT7 + TTC e seminarle in brodo lattosato-bile verde brillante da incubare rispettivamente a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$ e a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$. Dalle colture positive procedere alle prove di conferma come per il metodo in terreno liquido.

3) Streptococchi fecali in 250 ml:

A) Metodo con terreno liquido. Seminare 2 beute contenenti ml 125 di brodo glucosio-azide a tripla concentrazione rispettivamente con ml 250 del campione. Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$. Le beute positive (intorbidamento del terreno) debbono essere sottoposte alle prove di conferma mediante striscio in agar bile esculina-azide. Incubare a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ per $44\text{h} \pm 4\text{h}$. Considerare positive le colonie nere catalasi negative.

B) Metodo con membrane filtranti. Filtrare due aliquote di 250 ml ciascuna del campione attraverso membrane filtranti. Porre le due membrane, rispettivamente, su due piastre di “KF streptococcus agar” da incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $44\text{h} \pm 4\text{h}$. Sottoporre le colonie sospette, rosse o rosa, alle prove di conferma come per il metodo in terreno liquido

4) Spore di clostridi solfito-riduttori in 50 ml.

Riscaldare ml 50 del campione a 80°C per 10 minuti. Raffreddare rapidamente e filtrare per membrana. Porre la membrana su agar SPS ricoprendo con altri 10 ml di SPS a 45°C Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 1\text{h}$ in giare per anaerobiosi. La provavene considerata positiva quando si sviluppano colonie nere.

Identificazione presuntiva di *Cl. perfringens*.

Prelevare le colonie sospette (nere) e seminarle in tubi contenenti brodo tioglicollato precedentemente riscaldato a 100°C per 10 minuti e rapidamente raffreddato. Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 2\text{h}$ ed eseguire subcolture in:

agar nutritivo a becco di clarino, da incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 2\text{h}$ in giare per anaerobiosi, per verificare la negatività della catalasi;

provetta di latte tornasolato ricoperto con ml 2 di vaselina, da incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per 24-48h, per verificare l'acidificazione e la formazione di coagulo frammentato.

5) *Pseudomonas aeruginosa* in 250 ml.

Filtrare ml 250 del campione e porre la membrana su agar-cetrimide. Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$.

Prelevare le colonie sospette (verdi-bluastre e/o fluorescenti agli UV) e trasferirle su nutrient agar a becco di clarino. Incubare a $42^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ per $48\text{h} \pm 2\text{h}$. Dalla patina procedere:

alla verifica della positività della ossidasi su cartine alla bimetil-p-fenilendiamina;

alla identificazione mediante “galleria” di test biochimici (API 20 NE o equivalenti).

Nei casi dubbi eseguire anche:

l'evidenziazione della produzione di piocianina a 30°C in terreno di King A

la prova di crescita in Nutrient broth in b.m. a 42°C (ripetuta tre volte);

il test di ossidazione del glucosio a 37°C (Terreno al blu di bromotimolo).

6) *Staphylococcus aureus* in 250 ml.

Filtrare ml 250 del campione e porre la membrana su Baird-Parker agar Incubare a 37°C ± 1° per 24h ± 2h.

Prelevare le colonie sospette (nere, generalmente con alone) e seminarle in Brain-Heart infusion broth

Incubare a 37°C ± 1° per 24h ± 2h. Dalla brodocoltura eseguire:

preparato microscopico previa colorazione di Gram;

semina in profondità in provetta di agar di Mossel e Martin per evidenziare il tipo respiratorio;

test della coagulasi.

Art. 2

Ai fini del riconoscimento delle acque minerali naturali, le analisi chimiche e fisico chimiche debbono essere eseguite secondo i seguenti metodi di misura:

1) Residuo fisso a 180°C	Metodo gravimetrico
2) Ossidabilità	Digestione al permanganato di potassio
3) Anidride carbonica	Titrimetria a pH 3,8 con indicatore o potenziometro
4) Silice	Spettrofotometria di assorbimento molecolare
5) Bicarbonati	Titolazione con pHmetro
6) Cloruri	Titrimetria con indicatore o potenziometro Titrimetria con nitrato di mercurio Volumetria sec. Mohr
7) Solfati	Gravimetria con cloruro di bario Metodo turbidimetrico
8) Sodio	Spettrofotometria di assorbimento atomico o di emissione
9) Potassio	Spettrofotometria di assorbimento atomico o di emissione
10) Calcio	Spettrofotometria di assorbimento atomico Titrimetria con EDTA
11) Magnesio	Spettrofotometria di assorbimento atomico Titrimetria con EDTA
12) Ferro disciolto	Spettrofotometria di assorbimento atomico Spettrofotometria di assorbimento molecolare o fenantrolina

13) Fluoro	Determinazione con elettrodo specifico Spettrofotometria molecolare del complesso alizarina-lantanio o con alizarina-zirconio
14) Azoto ammoniacale	Spettrofotometria di assorbimento molecolare indofenolo o relativo di Nessler (se necessario distillazione)
15) Fosforo totale	Spettrofotometria di assorbimento molecolare
16) Solfuri	Spettrofotometria di assorbimento molecolare ossalato di p. dimetilamminoanilina
17) Stronzio	Spettrofotometria di assorbimento atomico
18) Litio	Spettrofotometria di assorbimento atomico
19) Alluminio	Spettrofotometria di assorbimento atomico
20) Bromo	Titrimetria Spettrofotometria d'assorbimento molecolare
21) Iodio	Titrimetria Spettrofotometria d'assorbimento molecolare
22) Cianuri	Titrimetria con nitrato d'argento e p-dimetilamminobenzilidenrodanina Spettrofotometria molecolare con clorammina T successiva reazione con piridina Metodo con elettrodo specifico
23) Fenoli (esclusi quelli naturali che non reagiscono con il cloro)	Spettrofotometria molecolare con 4-aminoantipirina p. nitroanilina Determinazione GC e HPLC
24) Agenti tensioattivi (MBAS anionici)	Metodo spettrofotometrico al blu di metilene
25) Oli minerali - idrocarburi disciolti o emulsionati	Estrazione e determinazione con spettrofotometria infrarossa
26) Idrocarburi aromatici policiclici	Spettrofotometria di fluorescenza dopo purificazione su strato sottile
27) Pesticidi e bifenili policlorurati	Determinazione per via gas-cromatografica
28) Composti organoalogenati che non rientrano nella voce pesticidi	Determinazione per via gas-cromatografica dopo estrazione e con la tecnica dello spazio di testa
29) Arsenico	Spettrofotometria di assorbimento atomico con tecnica degli idruri Spettrofotometria molecolare con dietilditiocarbammato di argento
30) Bario	Spettrofotometria di assorbimento atomico Metodo turbidimetrico
31) Borati	Spettrofotometria molecolare con acido carminico Spettrofotometria di assorbimento atomico
32) Cadmio	Spettrofotometria di assorbimento atomico
33) Cromo VI	Spettrofotometria molecolare con difenilcarbazolo

35) Manganese	Spettrofotometria di assorbimento atomico Spettrofotometria di assorbimento atomico
36) Nitrati	Spettrofotometria di assorbimento molecolare formalossima o persolfato di ammonio Spettrofotometria molecolare al salicilato diso
37) Nitriti	Spettrofotometria molecolare diretta all'u.v. 21 Spettrofotometria molecolare con acido solfan ammina
38) Piombo	Spettrofotometria di assorbimento atomico
39) Rame	Spettrofotometria di assorbimento atomico
40) Selenio	Spettrofotometria di assorbimento atomico con tecnica degli idruri Spettrofotometria molecolare al 2.3 diaminona Per eseguire le analisi del presente articolo si pu utilizzare, quando possibile, la cromatografia i

CAPO II MODALITA' PER IL PRELEVAMENTO DEI CAMPIONI

Art. 3

Il prelevamento dei campioni delle acque minerali naturali, da analizzare ai fini della valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle spese, è effettuato dal personale tecnico laureato del laboratorio che esegue le analisi.

Art. 4

Il prelevamento è effettuato alla presenza dell'autorità sanitaria competente per territorio, che redige il verbale di prelevamento.

Art. 5

Il verbale di prelevamento deve indicare l'ora e la data del prelevamento stesso, le generalità e le qualifiche dei presenti, la descrizione dell'opera di captazione e la sua esatta ubicazione nel territorio, le modalità di prelevamento, i risultati delle determinazioni eseguite sul posto, i dati meteorologici e pluviometrici, anche relativi a giorni precedenti, precisando in particolare la data e la durata delle ultime precipitazioni, ed ogni altro elemento ritenuto utile; il verbale è firmato dai presenti al prelevamento.

Art. 6

Il presente decreto sarà pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica.