

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO 13 gennaio 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.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

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

Visto in particolare l'art. 2, terzo 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 dei 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 procedere 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 «KP 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 prova viene considerata positiva quando si sviluppano colonie nere.

Identificazione presuntiva di Cl. perfringens.

Prelevare le colonie sospette (nere) e seminarle in tubi contenenti brodo tiogliccolato previamente 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Prelevare le colonie sospette (nere, generalmente con alone) e seminarle in Brain-Heart infusion broth. Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per $24\text{h} \pm 2\text{h}$. 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 con F1-1 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 con indofenolo o reattivo di Nessler (se necessario dopo distillazione) |
| 15) Fosforo totale | Spettrofotometria di assorbimento molecolare |
| 16) Solfuri | Spettrofotometria di assorbimento molecolare con 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 e successiva reazione con piridina
Metodo con elettrodo specifico |
| 23) Fenoli (esclusi quelli naturali che non reagiscono con il cloro) | Spettrofotometria molecolare con 4-aminoantipirina o p. nitroanilina
Determinazione GC e HPLC |
| 24) Agenti tensioattivi (MBAS anionici) | Metodo spettrofotometrico ai 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 organoclorogenati 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 la 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 di-fenilcarbazide Spettrofotometria di assorbimento atomico
35) Manganese	Spettrofotometria di assorbimento atomico Spettrofotometria di assorbimento molecolare con formilossima o persolfato di ammonio
36) Nitrati	Spettrofotometria molecolare al salicilato di sodio Spettrofotometria molecolare diretta all'ass. 210 nm
37) Nitriti	Spettrofotometria molecolare con acido solfanilico e ammina
38) Piombo	Spettrofotometria di assorbimento atomico
39) Rame	Spettrofotometria di assorbimento atomico
40) Selenio	Spettrofotometria di assorbimento atomico con la tecnica degli idruri Spettrofotometria molecolare al 2,3 diaminonafthalene

Per eseguire le analisi del presente articolo si può utilizzare, quando possibile, la cromatografia ionica.

CAPITOLO II

MODALITÀ 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 stesse, 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 ai 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.

Roma, 13 gennaio 1993

p. Il Ministro: AZZOLINI

93A6206