



Roma, 13 settembre 1976

*Ministero della Sanità*

D.G.S.I.P. - DIV. VI

N° 406/AG.2.43  
Risposta al Foglio del  
N°

OGGETTO:

Analisi microbiologiche di  
acque minerali naturali. -

AI PRESIDENTI DELLE GIUNTE  
REGIONALI

LORO SEDI

AI PRESIDENTI DELLE GIUNTE  
PROVINCIALI DI

TRENTO E BOLZANO

AGLI ASSESSORATI ALLA SANITA'  
DELLE REGIONI

LORO SEDI

AGLI ASSESSORATI ALLA SANITA'  
DELLE PROVINCE DI

TRENTO E BOLZANO

AI COMMISSARI DI GOVERNO

LORO SEDI

Questo Ministero, con circolare n° 61 del 9 agosto 1976, ha fornito indicazioni sulle procedure relative ai controlli microbiologici delle acque minerali.

Alla luce dell'esperienza acquisita in materia e per tener conto delle più recenti esperienze scientifiche, si ritiene opportuno apportare alcune integrazioni e modifiche alla sopra richiamata circolare n. 61.

A tal fine nell'allegato A vengono fissate le modalità di campionamento delle acque minerali.

I campionamenti si riferiscono alle acque minerali prelevate alla sorgente, siano esse destinate all'imbottigliamento ovvero alla loro utilizzazione in loco presso stabilimenti termali.

Si riferiscono inoltre ai prelievi da effettuarsi presso gli impianti di imbottigliamento, presso i depositi degli

impianti di imbottigliamento, presso i depositi della distribuzione e presso i punti di vendita.

Restano esclusi dalla presente disciplina i campionamenti da effettuarsi agli impianti termali.

Tale provvisoria esclusione dipende dal fatto che è tutto ra allo studio la problematica concernente la costruzione, manutenzione e vigilanza delle piscine termali, che, come è noto, costituiscono parte rilevante degli impianti termali.

Non appena ultimati gli studi, verranno emanate le norme relative alla microbiologia degli impianti termali.

Negli allegati B e D viene proposta la nuova metodologia analitica (e relativo memorandum tecnico) per effettuare le analisi di cui sopra.

Nell'allegato C, infine, vengono fissati i controlli di qualità delle acque minerali e i relativi giudizi di accettabilità.

IL MINISTRO  
f.to DE LORENZO

Per copia conforme  
Il Direttore della Divisione VI

*Bernasconi*

BER/A

## **ALLEGATI**

### **A. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO**

- A.1 *alla fonte*
- A.2 *all'impianto di imbottigliamento*
- A.3 *ai depositi degli stabilimenti di imbottigliamento e della distribuzione*
- A.4 *ai punti di vendita*
- A.5 *personale addetto ai prelievi e alle analisi*
- A.6 *trasporto*
- A.7 *norme generali*

### **B. METODOLOGIA ANALITICA**

- B1 Riunione delle aliquote
- B.2 Parametri da determinare
- B.3 Determinazione della carica microbica
- B.4 Ricerca dei coliformi
  - B.4.1 *Metodo per insembramento in terreno liquido*
  - B.4.2 *Metodo per membrane filtranti*
- B.5 Ricerca degli streptococchi
- B.6 Ricerca dei clostridi solfito-riduttori
- B.7 Ricerca dello *Pseudomonas aeruginosa*
- B.8 Ricerca dello *Staphylococcus aureus*

### **C. CONTROLLO DI QUALITÀ**

- C.1 Norme generali
  - C.1.1 *Controllo da parte degli organi sanitari*
  - C.1.2 *Controllo da parte delle aziende di produzione*
- C.2 Giudizio di accettabilità
  - C.2.1 *Caratteri organolettici*
  - C.2.2 *Cariche microbiche*
  - C.2.3 *Indici di contaminazione e giudizio complessivo*

## **ALLEGATO A**

### **MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO**

#### **A.1 ALLA FONTE**

I controlli microbiologici alla fonte, sia di acque minerali destinate all'imbottigliamento che di acque minerali destinate all'utilizzo "in loco" presso stabilimenti termali, dovranno venire effettuati:

- A.1.1 da parte degli organi sanitari competenti;
- A.1.2 da parte delle aziende.

#### **A.1.1 Da parte degli organi sanitari competenti**

I controlli microbiologici dovranno essere eseguiti almeno nelle quattro stagioni.

I prelievi sono effettuati dagli organi sanitari competenti per territorio.

Il campione prelevato dovrà essere costituito da 9 litri suddivisi in tre aliquote eguali ed i prelevatori dovranno invitare i responsabili dello stabilimento a far assistere alle analisi un perito di fiducia.

Una delle aliquote del campione verrà consegnata al produttore insieme alla copia del verbale di prelievo, mentre un'altra verrà destinata per le analisi al P.M.P. della U.S.L. competente per territorio. La terza aliquota, insieme

alla terza copia del verbale, verrà inviata allo stesso laboratorio per esservi conservata a disposizione dell'Autorità sanitaria competente, per eventuali ulteriori accertamenti.

Il verbale di prelevamento, redatto in triplice copia, dovrà contenere:

- a) il numero d'ordine del prelievo
- b) la data, l'ora e il luogo del prelievo
- c) le generalità e la qualifica del personale che esegue il prelievo
- d) il nome, la ragione sociale e la sede dello stabilimento in cui viene eseguito il prelevamento, nonché le generalità del responsabile dello stabilimento
- e) le modalità seguite nel prelevamento dei campioni
- f) l'indicazione della temperatura alla quale i campioni debbono essere mantenuti
- g) la dichiarazione che il verbale è stato letto alla presenza del responsabile dello stabilimento e che a questi ne viene consegnata una copia
- h) la firma del prelevatore e quella del responsabile dello stabilimento; qualora l'interessato rifiutasse di firmare, deve esserne fatta menzione sul verbale
- i) le eventuali dichiarazioni od osservazioni del responsabile dello stabilimento.

In occasione dei controlli microbiologici alla fonte, saranno effettuati, di norma, controlli anche alla zona di protezione igienica della sorgente, alla captazione, alle condotte di adduzione.

Qualora i controlli microbiologici alla sorgente fornissero risultati sfavorevoli, di cui al successivo punto C.2.3, dovranno essere immediatamente sospese le operazioni di imbottigliamento dell'acqua minerale proveniente dalla sorgente interessata fino alla eliminazione delle cause che li hanno determinati.

Gli atti e i provvedimenti relativi sono disposti dall'Autorità regionale che terrà informato il Ministero della sanità.

#### A.1.2 Da parte delle aziende

I controlli microbiologici dovranno essere stagionali e attuati non oltre il 15° giorno dall'inizio di ogni singola stagione.

I risultati dovranno essere riportati su un apposito registro da tenersi a disposizione dell'Autorità sanitaria competente.

### A.2 ALL'IMPIANTO DI IMBOTTIGLIAMENTO

I controlli microbiologici all'impianto di imbottigliamento sono effettuati:

A.2.1 da parte degli organi sanitari competenti;

A.2.2 da parte delle aziende imbottigiatrici.

#### A.2.1 Da parte degli organi sanitari competenti

I controlli microbiologici dovranno essere eseguiti sul prodotto finito all'uscita della catena di imbottigliamento con le seguenti modalità:

- stabilimenti con produzione giornaliera oltre i 500.000 pezzi: periodicità settimanale;
- stabilimenti con produzione giornaliera tra i 200.000 e i 500.000 pezzi: periodicità quindicinale;
- stabilimenti con produzione giornaliera al di sotto dei 200.000 pezzi: periodicità mensile.

I prelievi sono effettuati dagli organi sanitari competenti per territorio.

Il campione prelevato dovrà essere costituito da 9 litri suddivisi in 3 aliquote eguali ed i prelevatori dovranno invitare i responsabili dello stabilimento a far assistere alle analisi un perito di fiducia.

Una delle aliquote del campione verrà consegnata al produttore insieme alla copia del verbale di prelevamento, mentre un'altra verrà destinata per le analisi al P.M.P. della U.S.L. competente per territorio. La terza aliquota, insieme alla terza copia del verbale, verrà inviata allo stesso laboratorio per esservi conservata a disposizione dell'Autorità sanitaria competente, per eventuali ulteriori accertamenti.

Il verbale di prelevamento, redatto in triplice copia, dovrà contenere gli stessi elementi di cui al precedente punto A.1.1.

Qualora i controlli microbiologici fornissero risultati dubbi o sfavorevoli, dovranno essere eseguite analisi alla sorgente e in almeno altri due punti dell'impianto.

In occasione dei controlli microbiologici agli stabilimenti di imbottigliamento, saranno effettuate, di norma, ispezioni anche ai locali e agli impianti di imbottigliamento.

#### A.2.2 Da parte delle aziende imbottigiatrici

È buona norma effettuare con cadenza giornaliera i controlli microbiologici, sia per quanto riguarda il prodotto finito all'uscita della catena di imbottigliamento sia in almeno due diversi punti dell'impianto.

I risultati debbono essere riportati in un apposito registro, da tenersi a disposizione dell'Autorità sanitaria competente.

### A.3 AI DEPOSITI DEGLI STABILIMENTI DI IMBOTTIGLIAMENTO E DELLA DISTRIBUZIONE

Il campione deve essere suddiviso in 4 aliquote eguali, per un totale di almeno 12 litri, sia che il prelevamento venga effettuato sull'acqua già chiusa nei contenitori presso gli stabilimenti di produzione, sia nei depositi della distribuzione.

Le 4 aliquote, prelevate con criteri di casualità, dovranno essere costituite da contenitori recanti la stessa data di imbottigliamento.

Il verbale di prelevamento, redatto in quadruplica copia, deve contenere:

- a) il numero d'ordine del prelievo;
- b) la data, l'ora e il luogo del prelievo;
- c) le generalità e la qualifica del personale che esegue il prelievo;
- d) il nome, la ragione sociale e la sede del deposito in cui è stato eseguito il prelevamento, nonché le generalità del responsabile del deposito;
- e) le modalità seguite nel prelevamento dei campioni;
- f) l'indicazione della temperatura alla quale i campioni debbono essere mantenuti;
- g) la dichiarazione che il verbale è stato letto alla presenza del responsabile del deposito e che a questi ne viene consegnata una copia;
- h) la firma del prelevatore e quella del responsabile del deposito; qualora l'interessato rifiutasse di firmare, deve esserne fatta menzione sul verbale;
- i) le eventuali dichiarazioni od osservazioni del responsabile di cui sopra.

Una copia del verbale ed un'aliquota dei campioni verranno rilasciate al responsabile del deposito; altre due aliquote, accompagnate ciascuna da una copia del verbale di prelevamento, verranno inviate al P.M.P. competente per territorio, destinate, rispettivamente, una alla analisi di prima istanza e l'altra, eventualmente alla analisi di revisione; la quarta aliquota, insieme alla quarta copia del verbale di prelevamento, verrà inviata allo stesso laboratorio per esservi conservata a disposizione dell'Autorità sanitaria competente, per eventuali ulteriori accertamenti.

Nel caso in cui il depositario sia diverso dal produttore, sia le aliquote che le copie dei verbali di prelevamento saranno aumentate di una unità, che sarà destinata all'azienda produttrice.

Il P.M.P. dovrà curare la razionale conservazione dei campioni per una eventuale analisi di revisione da parte dell'Istituto Superiore di Sanità.

Tali campioni dovranno essere conservati per la durata massima di 60 giorni dalla data di ricevimento della comunicazione dell'esito delle analisi di prima istanza da parte degli interessati.

Si raccomanda di effettuare gli stoccaggi nel rispetto di criteri della più agevole individuazione, con particolare riferimento ai lotti di produzione giornaliera.

Qualora i controlli microbiologici fornissero risultati dubbi o sfavorevoli, dovranno essere eseguite analisi anche alla sorgente ed in almeno altri due punti degli impianti, nelle more delle analisi di seconda istanza.

#### A.4 AI PUNTI DI VENDITA

Il campione deve essere suddiviso in 5 aliquote eguali, per un totale di almeno 15 litri, che dovranno essere costituite da contenitori recanti la stessa data di imbottigliamento e prelevati con criteri di casualità.

Il verbale di prelevamento, redatto in cinque copie, dovrà contenere:

- a) il numero d'ordine del prelievo;
- b) la data, l'ora e il luogo del prelievo;
- c) le generalità e la qualifica del personale che esegue il prelievo;
- d) il nome, la ragione sociale e la sede del negozio al dettaglio in cui è stato eseguito il prelevamento, nonché le generalità del responsabile del negozio;
- e) le modalità seguite nel prelevamento dei campioni;
- f) l'indicazione della temperatura alla quale i campioni debbono essere mantenuti;
- g) la dichiarazione che il verbale è stato letto alla presenza del responsabile del negozio e che a questi ne viene consegnata una copia;
- h) la firma del prelevatore e quella del responsabile del negozio; qualora l'interessato rifiutasse di firmare, deve esserne fatta menzione sul verbale;
- i) le eventuali dichiarazioni od osservazioni del responsabile di cui sopra.

Una copia del verbale ed un'aliquota dei campioni verranno rilasciate al responsabile del negozio al dettaglio; altre due aliquote, accompagnate ciascuna da una copia del verbale di prelevamento, verranno inviate al P.M.P. competente per territorio, destinate, rispettivamente, una alla analisi di prima istanza e l'altra, eventualmente alla analisi di revisione; la quarta aliquota, insieme alla quarta copia del verbale di prelevamento, verrà inviata allo stesso laboratorio per esservi conservata a disposizione dell'Autorità sanitaria competente, per eventuali ulteriori accertamenti.

La quinta aliquota e la quinta copia del verbale sono destinate all'azienda produttrice.

Il P.M.P. dovrà curare la razionale conservazione dei campioni per una eventuale analisi di revisione da parte dell'Istituto Superiore di Sanità.

Tali campioni dovranno essere conservati per la durata massima di 60 giorni, a decorrere dalla data di ricevimento, da parte degli interessati, della comunicazione dell'esito delle analisi di prima istanza.

Qualora i controlli microbiologici fornissero risultati dubbi o sfavorevoli, dovranno essere eseguite analisi anche alla sorgente ed in almeno altri due punti degli impianti, nelle more delle analisi di seconda istanza.

#### A.5 PERSONALE ADDETTO AI PRELIEVI E ALLE ANALISI

Il prelevamento dei contenitori può essere effettuato dai vigili sanitari. Gli altri prelievi sono effettuati dal personale tecnico laureato del laboratorio che esegue le analisi.

Si rammenta che il personale addetto ai prelievi e alle analisi è tenuto al massimo riserbo circa i dati, le notizie e i risultati dei referti analitici acquisiti durante l'espletamento delle sue funzioni.

#### A.6 TRASPORTO

Il trasporto dei campioni viene effettuato con cassette coibentate e refrigerate in grado di assicurare il mantenimento dei medesimi ad una temperatura compresa tra +3°C e +5°C.

I campioni pervenuti al laboratorio debbono essere sottoposti alle analisi quanto prima possibile e al massimo entro 12 ore dal prelievo, mantenendo gli stessi a temperatura compresa tra +3°C e +5°C fino al momento delle analisi. Ove ciò non sia possibile la circostanza viene indicata nella relazione d'analisi.

#### A.7 NORME GENERALI

Il campione da esaminare è costituito da aliquote di almeno ml 3000 di acqua ciascuna, sia che il prelevamento venga effettuato sull'acqua già racchiusa nei contenitori, sia che venga effettuato sull'acqua prelevata all'emergenza, oppure ai vari punti dell'impianto.

Nella formazione delle aliquote bisogna tenere presente il reale volume dell'acqua contenuta nei contenitori.

Alle fonti e nei vari punti dell'impianto di produzione il prelievo viene effettuato con bottiglie sterili da ml 1000.

Il P.M.P. deve curare la razionale conservazione dei campioni, mantenendo gli stessi a temperatura compresa tra +3°C e +5°C. Ove ciò non avvenga, la circostanza deve essere segnalata.

Eventuali campioni presentati aperti o in confezioni non più integre verranno sottoposti ad analisi previo verbale, che dovrà contenere:

- a) data, ora e luogo di presentazione del campione;
- b) generalità e la qualifica del personale che riceve il campione;
- c) generalità del presentatore del campione;
- d) indicazioni relative allo stato del contenitore e dei suoi sistemi di chiusura ed ogni altra indicazione ritenuta necessaria;
- e) dichiarazione del presentatore del campione;
- f) firma del presentatore e del verbalizzante.

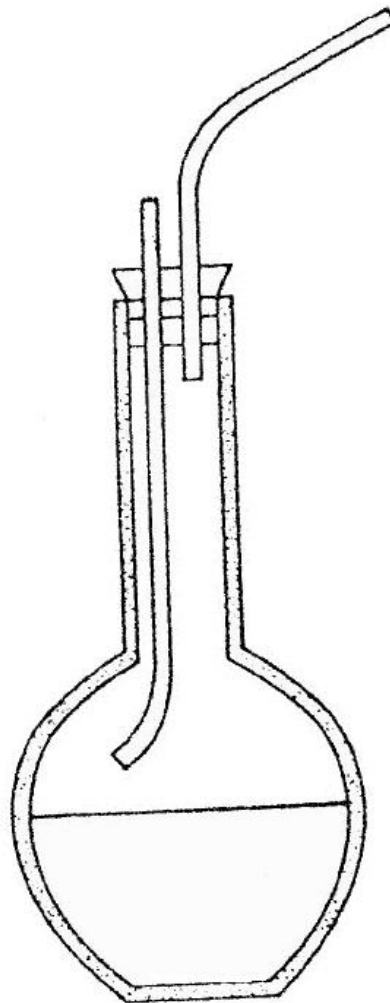
Le analisi eseguite sui campioni in questione, qualora sfavorevoli, non potranno essere utilizzate ai fini di provvedimenti contingibili ed urgenti, ma si procederà ai necessari campionamenti su confezioni dello stesso lotto, previa comunicazione alla azienda produttrice.

## **ALLEGATO B**

### **METODOLOGIA ANALITICA**

#### **B.1. RIUNIONE DELLE ALIQUOTE**

Prima di procedere alle semine, l'acqua delle aliquote costituenti il campione viene riunita asetticamente in pallone da 5 litri sterilizzato e chiuso con tappo di cotone. Il tappo di cotone viene sostituito con tappo di gomma a due vie munito di due tubi di vetro, sterilizzato a parte e avvolto in carta. Si ottiene una grossa pissetta (vedi figura).



Si agita accuratamente e si fa defluire l'acqua per gli insemnamenti attraverso il tubo piegato all'esterno. Se si tratta di acqua gasata, il pallone deve contenere circa 200 grammi di perline di vetro e l'agitazione viene prolungata fino ad ottenere una efficace dargasificazione.

#### **B.2. PARAMETRI DA DETERMINARE**

I parametri da esaminare sono i seguenti:

- Carica microbica a 20 °C e a 37 °C
- Coliformi in ml 250 da eseguire in duplice



- Streptococchi fecali in ml 250 da eseguire in duplice
- Clostridi solfito-riduttori in ml 250
- Pseudomonas Aeruginosa in ml 250
- Staphylococcus Aureus in ml 250.

### B.3. DETERMINAZIONE DELLA CARICA MICROBICA

La carica microbica viene determinata seminando l'acqua non diluita ed eventualmente sue diluizioni decimali successive in Agar Standard (1).

Viene quindi calcolato il numero dei microrganismi presenti in un millilitro di campione in esame enumerando le colonie microbiche che si sviluppano per diluizione di acqua seminate e che forniscono un risultato significativo.

#### a) Mezzo di diluizione

Acqua tamponata preparata con una soluzione concentrata allestita sciogliendo g. 34 di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in ml 500 di acqua distillata, aggiustando a pH 7,2 con NaOH 1/N e portando a volume di litro con acqua distillata.

Mantenere per non oltre un mese la soluzione concentrata in frigo a  $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ .

Per l'uso, aggiungere ml 1,25 della soluzione concentrata a 1 litro di acqua distillata; distribuire ml 80 in bottiglie di vetro neutro a chiusura ermetica e sterilizzare in autoclave a  $121\text{ }^\circ\text{C}$  per 20 minuti.

#### b) Preparazione delle diluizioni

Di norma, per l'acqua prelevata alla fonte e per quella appena confezionata è sufficiente la semina della sola acqua non diluita.

Negli altri casi è opportuno operare anche diluizioni 1:10 e 1:100 in acqua tamponata.

#### c) Insemezzamento

Insemezzare volumi di ml 1 di acqua impiegando pipette da ml 1 avendo cura di cambiare pipetta per ogni singola diluizione.

Impiegare quattro piastre per ciascuna diluizione.

Fondere i tubi di agar, mantenerli a  $+43\text{ }^\circ\text{C}/+45\text{ }^\circ\text{C}$  ed utilizzarli al massimo entro tre ore.

#### d) Incubazione

Di ciascuno gruppo di quattro piastre porne ad incubare due a  $+37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  per  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  e due a  $+20\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  per  $72\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . Incubare, inoltre, una piastra con il solo terreno ed una piastra con il terreno addizionato di diluente a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  come sopra indicato, nonché le corrispondenti repliche a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  (controlli di sterilità).

#### e) Conteggio delle colonie

Procedere alla conta delle colonie, tenendo presente che i risultati più attendibili si ottengono, per l'acqua non diluita, quando le piastre presentano un numero di colonie non superiore a 300 e, per l'acqua diluita, quando il numero di colonie è compreso tra 30 e 300.

#### B.4. RICERCA DEI COLIFORMI

DEFINIZIONE: batteri Gram-negativi, aerobi-anaerobi facoltativi, non sporigeni, di forma bastoncellare, fermentanti il lattosio con produzione di gas a 37 °C in 48 h.

##### B.4.1 Metodo per insemenza in terreno liquido

La ricerca viene effettuata in duplice su ml 250 di acqua, seminandola in contenitore graduato da ml 500 munito di campanula Durham e contenente ml 125 di Brodo Lattosato a tripla concentrazione (2).

Incubare a 37 °C ± 1 °C per 48 h ± 2 h.

Nel caso di prova presuntiva positiva (intorbidamento del terreno e formazione di gas nella campanula) si procede alle prove di conferma fino alla definizione di “genere”:

- a) seminare ml 0,1 della coltura presuntiva in provetta con campanula di Durham e contenente ml 10 circa di Brodo Lattosio-Verde Brillante-Bile (3) e incubare a 37 °C ± 1 °C per 48 h ± 2 h.
- b) seminare ml 0,1 della coltura presuntiva in provetta, come alla lettera a) e incubare a 44 °C ± 0,5 °C per 48 h ± 2 h.

In assenza di formazione di gas nelle due provette di Brodo Lattosio-Verde Brillante-Bile, la prova di conferma risulta negativa (assenza di coliformi).

La presenza di gas nella sola provetta a 37 °C denota positività per i coliformi.

La presenza di gas in ambedue le provette (incubate rispettivamente a 37 °C e a 44 °C) denota positività per i coliformi fecali.

Dalle colture positive di Brodo Lattosio-Verde Brillante-Bile (sia a 37 °C che a 44 °C.) si procede all'isolamento su Agar Mac Conkey (4). Incubare a 37 °C per 24h; dalle colonie acidificanti isolate procedere a trapianti in:

- a) TSI Agar (5) per la conferma della produzione di gas e per la dimostrazione della produzione di H<sub>2</sub>S;
- b) Acqua triptonata (6) per la determinazione dell'indolo;
- c) Brodo di Moller con aggiunta di ornitina (7) e relativo campione bianco, senza ornitina, per il test della decarbossilazione.

Come risulta dalla seguente tabella:

- A) Il genere Citrobacter differisce dai generi Escherichia, Klebsiella ed Enterobacter perché è H<sub>2</sub>S positivo;
- B) Il genere Escherichia differisce dai generi Klebsiella ed Enterobacter perché è indolo positivo;
- C) Il genere Klebsiella differisce dal genere Enterobacter perché è ornitindecarbossilasi negativo.

|              | H <sub>2</sub> S | Indolo | ornitindecarbossilasi |
|--------------|------------------|--------|-----------------------|
| Citrobacter  | -                | -      | V                     |
| Escherichia  | -                | - (1)  | V                     |
| Klebsiella   | -                | -      | -                     |
| Enterobacter | -                | -      | -                     |

(1) Anche Klebsiella Pneumoniae biotipo oazitica è indolo positiva. Differisce da Escherichia poiché scinde l'urea. Può spiegare i casi in cui la prova di conferma riveli la presenza di colon batteri non fecali ma indolo positivi.

##### B.4.2 Metodo per membrane filtranti

La ricerca dei coliformi totali, dei coliformi fecali e di E. Coli può essere condotta, in alternativa, filtrando due aliquote di 250 ml di acqua ciascuna su altrettante membrane sterili di acetato di cellulosa (pori da 0,45 micron).

Tali membrane verranno poste, rispettivamente, su piastre di “Agar lattosato al tergitolo 7” (AT7) (3) da incubare a  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per 24 ore e di “Agar lattosato al tergitolo 7 addizionato di cloruro di trifeniltetrazolio” (AT7 + TTC) (9), da incubare a  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  per 24 h.

Lettura: su AT7 i coliformi producono colonie gialle, a volte mucose, del diametro da 1 a 3 mm circa. Su AT7 + TTC i coliformi fecali producono colonie gialle fino al rosso scure del diametro di 0,5 – 3,5 mm circa; E.Coli produce colonie gialle o giallo-arancio del diametro di 1-2 mm circa.

Conferma: le colonie sospette devono essere identificate secondo il seguente schema:

-a) le colonie di coliformi sviluppate in AT7 vengono seminate in una provetta con campanula di Durham e contenente ml 10 circa di Brodo Lattosio-verde Brillante-Bile (3) da incubare a  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . La presenza, dopo incubazione, di intorbidamento e gas denota positività per i coliformi;

-b) le colonie di coliformi fecali e di E. Coli sviluppate in AT7 + TTC vengono seminate in una provetta con campanula di Durham e contenente ml 10 circa di Brodo Lattosio-verde Brillante-Bile (3) da incubare a  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  per  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . La presenza, dopo incubazione, di intorbidamento e gas denota positività per i coliformi fecali;

-c) per la conferma di E. Coli si esegue una successiva subcoltura trasferendo ml 0,1 della coltura in Brodo Lattosio-verde Brillante-Bile in una provetta contenente circa ml 10 di acqua triptonata da incubare a  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  per  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . L'aggiunta di ml 0,2 – 0,3 di reattivo di Kovacs con formazione di un anello rosso-ciliegia denota positività per E. Coli.

## B.5. RICERCA DEGLI STREPTOCOCCHI FECALI

DEFINIZIONE: varie specie, tipi e biotipi di Streptococchi appartenenti al gruppo D di Lancefield, capaci di crescere in presenza di sodio azide, etil-violetto e bile al 40%. Le specie più comuni sono: *S. faecalis*, *S. faecalis* var. *liquefaciens*, *S. faecalis* var. *zymogenes*, *S. durans*, *S. faecium*, *S. bovis*, *S. equinus*.

### B.5.1. Metodo per insembramento in terreno liquido

La ricerca viene effettuata su ml 250 di acqua in duplice. Si effettua la ricerca presuntiva seminando l'acqua in un contenitore graduato da ml 500 contenente ml 125 di Brodo Glucosio-Azide (10) a tripla concentrazione.

Incubare a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

Nel caso di prova presuntiva positiva (intorbidamento del terreno) si procede alla seguente prova di conferma: strisciare un'ansata della coltura in brodo glucosio-azide in una piastra contenente agar bile-esculina-azide (11) ed incubare a  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  per  $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ .

Gli streptococchi fecali crescono su tale terreno ed idrolizzano l'esculina; il prodotto finale, la 6,7 diidrossicumarina, si combina con gli ioni ferro dando luogo ad un composto nero che si diffonde nel terreno.

Le colonie sospette (nere e/o con alone nero) vengono infine sottoposte al test della catalasi. A tal fine si pone una goccia di  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 g/l) sulle colonie cresciute su agar bile-esculina-azide.

La positività della prova è segnalata dalla formazione di bolle di ossigeno. Solo le colonie catalasi-negative possono essere considerate formate da streptococchi fecali.

### B.5.2. Metodo per membrane filtranti

La ricerca degli streptococchi fecali può essere condotta, in alternativa, filtrando due aliquote di 250 ml di acqua ciascuna su altrettante membrane sterili di acetato di cellulosa (pori da 0,45 micron).

Tali membrane verranno poste su piastre di “KF streptococcus agar” (12) da incubare a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per  $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ .

LETTURA: gli streptococchi fecali producono colonie con centro rosso, più raramente rosse o rosa, con diametri variabili da 0,3 a 2 mm.

CONFERMA: un'aliquota significativa delle colonie sospette deve essere identificata secondo il seguente schema: prelevare le colonie sospette e strisciarle in una piastra contenente agar bile-esculina-azide, quindi procedere come previsto per il metodo in semenzamento in terreno liquido.

#### B.6. RICERCA DEI CLOSTRIDI SOLFITO-RIDUTTORI

DEFINIZIONE: bacilli Gram-positivi, corti e tozzi, anaerobi, sporigeni, capaci di ridurre il solfito con produzione di solfuri.

La ricerca viene effettuata su un volume di ml 250; si riscalda a 80 °C per 10 minuti, agitando, e si raffredda rapidamente; si filtra per membrana di acetato di cellulosa con pori del diametro di 0,45 micron, utilizzando apparecchio con imbuto graduato. Dopo filtrazione, la membrana viene posta in una piastra Petri di 10 cm di diametro, contenente ml 15 di SPS Agar (13) solidificato; si ricopre quindi con altri ml 10 di SPS Agar (13) disciolto e raffreddato a 45 °C, si fa solidificare e si incuba a 37 °C ± 1 °C per 24h ± 1h in giare per anaerobiosi.

Al termine dell'incubazione, se sono presenti colonie nere con alone nero, si prelevano con pipette Pasteur e si esegue un passaggio in un tubo contenente ml 15 di Brodo tioglicollato (14) riscaldato in bagnomaria bollente a 100 °C per 10 minuti subito prima dell'uso e quindi rapidamente raffreddato.

Dopo l'incubazione a 37 °C ± 1 °C per 24h, si allestisce un preparato microscopico colorato secondo Gram, per confermare la presenza di forme bastoncellari Gram positive; si eseguono quindi le seguenti colture:

- a) in un tubo di agar nutritivo (15) a becco di clarino; incubazione a 37 °C ± 1 °C in giare per anaerobiosi e quindi ricerca della catalasi, operando sulla patina batterica, per differenziare eventuali batteri solfito-riduttori appartenenti al genere Bacillus (genere Clostridium = catalasi assente; genere Bacillus = catalasi presente);
- b) in provetta (ml 0,1 della brodocoltura) contenente ml 7 di Latte tornasolato (16), ricoprendo quindi con ml 2 circa vaselina sterile.

Ciò allo scopo di riconoscere, nell'ambito dei clostridi solfito-riduttori, l'eventuale presenza di Cl. Perfringens che, dopo 24 – 48 ore di incubazione a 37 °C, produce acidificazione del mezzo con formazione di coagulo frammentato.

I Clostridi solfito-riduttori di origine fecale danno diverse reazioni in latte tornasolato (16), in un tempo massimo di 15 giorni:

Cl. perfringens = A C G S

Cl. histolyticum = C D

Cl. sporogenes = D

Cl. novji = C G (D)

(A= acidificazione; C= formazione di coagulo; G= produzione di gas; S= fermentazione tumultuosa con coagulo frammentato; D= digestione, con trasformazione del mezzo in liquido ambrato)

#### B.7. RICERCA DI PSUDOMONAS AERUGINOSA

DEFINIZIONE: bastoncelli Gram negativi di piccole dimensioni, capaci di crescere anche in terreni culturali contenenti cetrimide con formazione di colonie dotate di caratteristica pigmentazione blu-verdastra fluorescente, in grado di crescere a 42 °C per almeno tre successive subcolture, ossidasi + ed attaccanti il glucosio con processo ossidativo.

La ricerca viene effettuata mediante prova presuntiva filtrando per membrana di acetato di cellulosa con pori del diametro di 0,45 micron un volume di ml 250 di acqua, utilizzando apparecchio filtrante con imbuto graduato; dopo filtrazione porre la membrana in una piastra di Petri di 10 cm di diametro contenente 15 ml di Agar alla cetrimide (17). Incubazione a 37 °C per 48 h.

Le colonie sospette riferibili a *Ps. Aeruginosa* sviluppate su Agar cetrimide hanno, in genere, le seguenti caratteristiche: pochi mm di diametro, forma rotonda o più spesso irregolare, superficie liscia, consistenza butirrosa, colorazione verde-bluastro, fluorescente all'esame con la lampada a raggi ultravioletti.

Tali colonie vengono trasferite su Nutrient agar solidificato a becco di clarino, da incubare a 42 °C x 48 h.

Dopo lo sviluppo, una porzione della patina su Nutrient Agar viene utilizzata per la ricerca della ossidasi su cartine alla dimetil-p-fenilendiamina.

Ricerca dell'ossidasi: prelevare mediante ansa di platino una piccola parte della patina sviluppatasi su Nutrient agar e strisciarla su una cartina alla dimetil-p-fenilendiamina; la presenza di ossidasi verrà rilevata dalla comparsa di una macchia blu-violetto entro pochi minuti.

In caso di positività si utilizza la restante patina per l'identificazione con una "galleria" di test biochimici idonea per germi Gram-negativi non ascrivibili a enterobatteri (quali API 20 NE o equivalenti).

Nei casi dubbi eseguire ulteriori accertamenti, a partire dalla patina sviluppata su Nutrient agar:

a) riconoscimento della produzione di piocianina.

Inoculare il terreno di King A (18) posto in provette e solidificato a becco di clarino con una piccola quantità di patina, strisciando in superficie.

Incubare a 30 °C ± 1 °C per 1 – 4 giorni fino a comparsa di colore verde; aggiungere quindi 2 ml di cloroformio. Agitare e lasciare riposare per qualche minuto. La comparsa di colorazione blu nel cloroformio depone per la presenza di piocianina, elaborata da *Ps. Aeruginosa*.

b) prova di crescita a 42 °C: seminare una piccola parte della patina in provette di brodo nutritivo (21); incubare per 48 h ± 2 h in bagnomaria termostata regolato a 42 °C. In presenza di sviluppo batterico, eseguire una subcoltura con 0,05 ml della brodocoltura osservando le medesime condizioni sopra descritte e, ove questa risulti positiva, eseguirne una terza successiva.

In presenza di sviluppo microbico, da quest'ultima subcoltura eseguire un esame microscopico previa colorazione di Gram.

c) ossidazione del glucosio: rigenerare due provette di terreno al Bleu di bromotimolo (19) mediante immersione in bagnomaria bollente per 10'; lasciar raffreddare a circa 50 °C. Aggiungere a ciascuna provetta ml 1 di una soluzione di glucosio al 6% in precedenza sterilizzato mediante filtrazione per filtro Seitz.

Raffreddare rapidamente le provette mediante immersione in acqua e ghiaccio.

Prelevare, mediante ago di platino una delle colonie sviluppatasi su Agar alla cetrimide aventi le caratteristiche descritte in precedenza e seminare per infissione centrale e profonda in ambedue le provette. Ricoprire una delle due provette con olio di paraffina neutro e sterile (da 1 a 1,5 cm di altezza).

Incubare a 37 °C per 2 – 10 giorni.

Lettura: l'attacco ossidativo del glucosio è rivelato dal viraggio al giallo del terreno ricoperto d'olio.

## B.8. RICERCA DELLO STAPHYLOCOCCUS AUREUS

DEFINIZIONE: Cocchi Gram positivi disposti a coppie o a grappoli, capaci di formare il caratteristico pigmento, di crescere in presenza di elevate concentrazioni di NaCl, di fermentare il mannitolo e di possedere coagulasi e DNAasi.

La ricerca viene effettuata filtrando per membrana di acetato di cellulosa con pori del diametro di 0,45 micron un volume di ml 250 di acqua, utilizzando apparecchio filtrante con imbuto graduato; dopo filtrazione porre la membrana in una piastra Petri di cm 10 di diametro contenente 15 ml di Baird Parker Agar (20).

Incubare a  $+ 37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

Se si sviluppano colonie nere, seminare queste in Brodo nutritivo (21) e incubare a  $+ 37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per 24 h. dalla brodocoltura eseguire:

- a) una colorazione secondo Gram per confermare la presenza di cocci Gram positivi;
- b) una semina in profondità in provetta di Agar di Mossel e Martin (22) per evidenziare il tipo respiratorio: Staphylococcus aerobio-anaerobio facoltativo (crescita ed attacco del mannitolo sia sul fondo che alla superficie dell'agar); Micrococcus-aerobio (crescita ed attacco del mannitolo solo sulla superficie dell'agar);
- c) il test della coagulasi, per confermare la presenza dello Staphylococcus aureus, con carattere di patogenicità.

## ***ALLEGATO C***

### **CONTROLLI DI QUALITA'**

#### C.1 NORME GENERALI

##### C.1.1 Controllo da parte degli organi sanitari

I controlli microbiologici eseguiti dagli organi sanitari competenti, alla fonte, lungo la catena di imbottigliamento, all'uscita della catena imbottigliamento, ai depositi dello stabilimento e della distribuzione e ai punti di vendita dovranno comprendere la determinazione di tutti i parametri indicati al punto C.2.3 della presente circolare.

##### C.1.2 Controlli da parte delle aziende

I controlli microbiologici eseguiti dalle aziende, alla fonte dovranno comprendere la determinazione di tutti i parametri indicati al punto C.2.3 della presente circolare; quelli eseguiti sul prodotto all'uscita della catena imbottigliamento e su almeno due punti dell'impianto di imbottigliamento dovranno comprendere la determinazione dei coliformi, dello pseudomonas aeruginosa e dello staphylococcus aureus.

#### C.2 GIUDIZIO DI ACCETTABILITA'

##### C.2.1 CARATTERI ORGANOLETTICI

Nella fase di commercializzazione l'acqua minerale naturale non deve presentare alterazioni che rappresentino un difetto dal punto di vista organolettico.

##### C.2.2 Cariche microbiche

Alla fonte la carica microbica totale di un'acqua minerale dovrà essere conforme al suo microbismo naturale. La sorgente dovrà comunque risultare efficacemente protetta nei confronti di qualsiasi tipo di contaminazione.

Alla fonte i valori di carica microbica non dovranno normalmente oltrepassare, rispettivamente, 20 u.f.c. per ml a 20°C dopo 72 ore e 5 u.f.c. per ml a 37 °C dopo 24 ore. Le determinazioni dovranno essere eseguite entro 12 ore dal prelievo e l'acqua dovrà essere mantenuta a temperatura compresa tra 3°C e 5°C fino al momento dell'analisi.

Dopo l'imbottigliamento tali valori non dovranno essere normalmente superiori, rispettivamente, 100 u.f.c. per ml a 20°C dopo 72 ore e 20 u.f.c. per ml a 37 °C dopo 24 ore. Le determinazioni dovranno essere eseguite entro 12 ore dall'imbottigliamento e l'acqua dovrà essere mantenuta a temperatura compresa tra 3°C e 5°C fino al momento dell'analisi.

I valori di cui sopra debbono essere comunque considerati come numeri indicativi e non come numeri massimi di concentrazione.

Durante la fase di commercializzazione la carica microbica saprofitaria dell'acqua minerale imbottigliata presenta ampie ed inevitabili variazioni dovute a fattori diversi quali la composizione chimica dell'acqua, la durata e la temperatura di stoccaggio, la natura del contenitore, ecc. Non è quindi possibile stabilire limiti rigidi per tali parametri, pur tenendo conto che in linea di massima, i valori più elevati raggiungono livelli dell'ordine di  $10^4$  cellule microbiche per ml per le acque non addizionate di anidride carbonica e di  $10^3$  cellule microbiche per ml per le acque addizionate di anidride carbonica.

Nel caso che vengano riscontrati valori di carica microbica superiori a quelli sopra indicati, dovranno essere eseguiti ulteriori accertamenti sia sul prodotto imbottigliato che alla fonte, prima di esprimere il giudizio di non accettabilità, che non potrà basarsi comunque che sui parametri di cui al successivo punto C.2.3.

### C.2.3 Indici di contaminazione e giudizio complessivo di qualità

L'accettabilità di un'acqua minerale, in riferimento a tali indici, si riassume nelle seguenti condizioni:

- 1) assenza dei coliformi in 250 ml (accertata su semina in due repliche da 250 ml);
- 2) assenza degli streptococchi fecali in 250 ml (accertata su semina in due repliche da 250 ml);
- 3) assenza delle spore di clostridi solfito riduttori in 50 ml (accertata su unica semina del volume indicato);
- 4) assenza dello *Staphylococcus aureus* in 250 ml (accertata su unica semina del volume indicato);
- 5) assenza dello *Pseudomonas aeruginosa* in 250 ml (accertata su unica semina del volume indicato).

È da precisare, per quanto riguarda gli indici di cui ai punti 1) e 2), che la positività di entrambe le repliche per la ricerca dei coliformi e degli streptococchi fecali, oppure di una sola replica relativa ai coliformi e di una relativa agli streptococchi fecali, implica già in prima istanza il giudizio di non accettabilità, mentre nei casi di positività isolate di singole repliche relative a questi indici è d'obbligo ripetere le analisi su nuovi campioni. In tali analisi di seconda istanza la non accettabilità è data invece anche dalla positività isolata di una singola replica.

La seguente tabella riassume questi criteri.

| coliformi |           | streptococchi fecali |           | clostridi solfito riduttori | pseudomonas aeruginosa | staphylococcus aureus | GIUDIZIO in 1.a istanza        |
|-----------|-----------|----------------------|-----------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1.a repl. | 2.a repl. | 1.a repl.            | 2.a repl. |                             |                        |                       |                                |
| -         | -         | -                    | -         | -                           | -                      | -                     | accettabile                    |
| - -       | - -       | -                    | -         | -                           | -                      | -                     | non accettabile                |
| -         | -         | - -                  | - -       | -                           | -                      | -                     | non accettabile                |
| - -       | -         | - -                  | -         | -                           | -                      | -                     | non accettabile                |
| -         | -         | -                    | -         | -                           | - -                    | -                     | non accettabile                |
| -         | -         | -                    | -         | -                           | -                      | - -                   | non accettabile                |
| - -       | -         | -                    | -         | - -                         | -                      | -                     | non accettabile                |
| -         | -         | - -                  | -         | - -                         | -                      | -                     | non accettabile                |
| - -       | -         | -                    | -         | -                           | -                      | -                     | rinvio ad esame di 2.a istanza |
| -         | -         | - -                  | -         | -                           | -                      | -                     | rinvio ad esame di 2.a istanza |
| -         | -         | -                    | -         | - -                         | -                      | -                     | rinvio ad esame di 2.a istanza |

| coliformi |           | streptococchi fecali |           | clostridi solfito riduttori | pseudomonas aeruginosa | staphylococcus aureus | GIUDIZIO in 2.a istanza |
|-----------|-----------|----------------------|-----------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1.a repl. | 2.a repl. | 1.a repl.            | 2.a repl. |                             |                        |                       |                         |
| -         | -         | -                    | -         | -                           | -                      | -                     | accettabile             |
| - -       | -         | -                    | -         | -                           | -                      | -                     | non accettabile         |
| -         | -         | - -                  | -         | -                           | -                      | -                     | non accettabile         |
| -         | -         | -                    | -         | - -                         | -                      | -                     | non accettabile         |
| -         | -         | -                    | -         | -                           | - -                    | -                     | non accettabile         |
| -         | -         | -                    | -         | -                           | -                      | - -                   | non accettabile         |



## ***ALLEGATO D***

### **MEMORANDUM TECNICO**

#### D.1 SCHEMA DI CLASSIFICAZIONE

Vengono di seguito riportati i criteri di massima intesi alla ascrizione di genere di taluni schizomiceti saprofiti, fra quelli più facilmente reperibili nelle acque minerali naturali e coltivabili in Agar Standard.

Tali organismi possono essere così raggruppati:

##### a) organismi bastoncellari Gram negativi:

aerobi

- 1) Alcaligenes
- 2) Flavobacterium

Pseudomonadaceae

- 3) Pseudomonas
- 4) Xanthomonas

anaerobi facoltativi

- 5) Chromobacterium

Enterobacteriaceae

- 6) Proteus
- 7) Providencia
- 8) Serratia

Vibrionaceae

- 9) Aeromonas
- 10) Vibrio

##### b) organismi bastoncellari Gram positivi:

- 1) Bacillus

##### c) organismi coccoidi Gram positivi

- 1) Micrococcus
- 2) Planococcus
- 3) Staphylococcus

In presenza di particolari reperti, quali Vibrio, Staphylococcus, ecc., microrganismi per altro facilmente coltivabili in agar, si renderanno necessari ulteriori accertamenti al fine di addivenire alla diagnosi di specie.

##### a) organismi bastoncellari Gram negativi:

- 1) Alcaligenes (famiglia non assegnata)

Morfologia: bastoncelli o coccobacilli (0,5 – 1,0 x 0,5 – 2,6 µm).

Mobili per flagelli peritrichi.

Strettamente aerobi (metabolismo a tipo ossidativo). Alcuni ceppi sono capaci di respirazione anaerobia in presenza di nitrati o nitriti.

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi positivi; catalasi positivi; indolo negativi. Riducono i nitrati. Non idrolizzano l'esculina, la gelatina, il DNA e, generalmente, non utilizzano i carboidrati.

Note: formano colonie non pigmentate.

2) *Flavobacterium* (famiglia non assegnata)

Morfologia: bastoncelli con estremità arrotondate (0,5 x 1,0 – 3,0 µm).

Immobili.

Strettamente aerobi (metabolismo a tipo ossidativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi positivi; catalasi positivi. Non riducono i nitrati (ad esclusione di *F. balustinum*). Generalmente idrolizzano l'esculina, la gelatina e il DNA. Ossidano il glucosio.

Note: formano colonie giallo-arancio; esistono anche ceppi non pigmentati.

3) *Pseudomonas* (famiglia Pseudomonadaceae)

Morfologia: bastoncelli isolati (0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0 µm).

Mobili per uno o più flagelli polari.

Strettamente aerobi (metabolismo a tipo ossidativo); alcuni ceppi sono capaci di respirazione anaerobia in presenza di nitrati.

Principali caratteristiche biochimiche: generalmente ossidasi positivi; catalasi positivi. Le specie fluorescenti possono essere differenziate in base al seguente schema:

|                                      | OSSIDASI | ARGININA<br>DEIDROL. | IDROLASI<br>GELATINA | CRESCITA<br>A 41 C |
|--------------------------------------|----------|----------------------|----------------------|--------------------|
| <i>P. aeruginosa</i>                 | +        | +                    | +                    | +                  |
| <i>P. fluorescens</i><br>biovars I-V | +        | +                    | +                    | -                  |
| <i>P. Putida</i><br>biovars A-B      | +        | +                    | -                    | -                  |

Note: alcune specie producono pigmenti blu, rosso, verde e giallo.

4) *Xanthomonas* (famiglia Pseudomonadaceae)

Morfologia: bastoncelli isolati (0,4 – 0,7 x 0,7 – 1,8 µm).

Mobili per un unico flagello polare.

Strettamente aerobi (metabolismo a tipo ossidativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi negativi o debolmente positivi; catalasi positivi. Non riducono i nitrati.

Note: formano colonie generalmente gialle.

5) *Chromobacterium* (famiglia non assegnata)

Morfologia: bastoncelli con estremità arrotondate (0,6 – 0,9 x 1,5 – 3,5 µm), qualche volta leggermente ricurvi, singoli od occasionalmente in coppia o a catena corta.

Mobili per un flagello polare associato generalmente a 1-4 flagelli subpolari o laterali.

Anaerobi facoltativi (metabolismo a tipo fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi positivi; catalasi positivi; indolo negativi. Riducono i nitrati, spesso con produzione di gas. Fermentano il glucosio senza produzione di gas.

Note: formano colonie violente; in brodo nutritivo producono un anello viola superficiale.

6) *Proteus* (famiglia Enterobacteriaceae)

Morfologia: bastoncelli esili con estremità arrotondate (0,4 – 0,8 x 1,0 – 3,0 µm).

Mobili per flagelli peritrichi.

Aerobi ed anaerobi facoltativi (metabolismo di tipo ossidativo e fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi negativi. Idrolizzano l'urea. Riducono i nitrati. I generi *Proteus* e *Providencia* differiscono dagli altri enterobatteri perché sono fenilalaninadesaminasi positivi; il genere *Proteus* differisce dal genere *Providencia* perché produce idrogeno solforato, presenta il fenomeno dello "swarming" e idrolizza la gelatina.

7) *Providencia* (famiglia Enterobacteriaceae)

Morfologia: bastoncelli esili con estremità arrotondate (0,6 – 0,8 x 1,5 – 2,5 µm).

Mobili per flagelli peritrichi.

Aerobi ed anaerobi facoltativi (metabolismo di tipo ossidativo e fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi negativi; indolo positivi. Riducono i nitrati. I generi *Providencia* e *Proteus* differiscono dagli altri enterobatteri perché sono fenilalaninadesaminasi positivi; il genere *Providencia* differisce dal genere *Proteus* perché non produce idrogeno solforato, non presenta il fenomeno dello "swarming" e non idrolizza la gelatina.

8) *Serratia* (famiglia Enterobacteriaceae)

Morfologia: bastoncelli esili con estremità arrotondate (0,5 – 0,8 x 0,9 – 2,0 µm).

Mobili per flagelli peritrichi.

Aerobi ed anaerobi facoltativi (metabolismo di tipo ossidativo e fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi negativi; catalasi positivi. Idrolizza la gelatina e DNA. Riducono i nitrati.

9) *Aeromonas* (famiglia Vibrionaceae)

Morfologia: bastoncelli con estremità arrotondate o coccobacilli (0,3 – 1,0 x 1,0 – 3,5 µm).

Mobili per un unico flagello polare (nei terreni solidi possono formare flagelli peritrichi). *A. salmonicida* è immobile.

Aerobi ed anaerobi facoltativi (metabolismo di tipo ossidativo e fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi positivi; catalasi positivi. Riducono i nitrati.

10) *Vibrio* (famiglia Vibrionaceae)

Morfologia: bastoncelli ricurvi (0,5 – 0,8 x 1,4 – 2,6 µm); la morfologia deve essere studiata su colture giovani, di 5-6 ore. Crescita ottimale a pH 8 con midica alofila (3% di cloruro di sodio)

Mobili per flagelli polari (nei terreni solidi possono formare flagelli laterali).

Aerobi ed anaerobi facoltativi (metabolismo di tipo ossidativo e fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: generalmente ossidasi positivi. Riducono i nitrati.

Note: la maggior parte delle specie richiede Na<sup>+</sup> per la crescita.

SCHEMA RIASSUNTIVO

|                 | MOBILITÀ | OSSIDASI | METABOLISMO  | RIDUZ. NITRATI | PIGMENTO           |
|-----------------|----------|----------|--------------|----------------|--------------------|
| Alcaligenes     | +        | +        | ossidativo   | +              |                    |
| Flavobacterium  | -        | +        | ossidativo   | -/+            | Giallo arancio     |
| Pseudomonas     | +        | +        | ossidativo   | +/-            | Blu, verde, ecc. * |
| Xanthomonas     | +        | -        | ossidativo   | -              |                    |
| Chromobacterium | +        | +        | ossid./ferm. | +              | Viola              |
| Proteus         | +        | -        | ossid./ferm. | +              |                    |
| Providencia     | +        | -        | ossid./ferm. | +              |                    |
| Serratia        | +        | -        | ossid./ferm. | +              | Rosso*             |
| Aeromonas       | +        | +        | ossid./ferm. | +              |                    |
| Vibrio          | +        | +        | ossid./ferm. | +              |                    |

\*: alcuni ceppi

b) organismi bastoncellari Gram positivi:

1) Bacillus

Morfologia: bastoncelli per lo più di notevoli dimensioni (da 0,5 x 1,2 µm a 2,5 x 10 µm), isolati o in catene; dotati di endospore resistenti.

Generalmente mobili per flagelli peritrichi.

Aerobi ed anaerobi facoltativi (metabolismo di tipo ossidativo e fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: ossidasi positivi o negativi; generalmente catalasi positivi.

Note: talora producono pigmento; la tassonomia di tali microrganismi è complessa, alcune specie sono di sicura assunzione tassonomica, mentre altre specie sono di incerta collocazione. Sotto un profilo operativo, a fini eminentemente pratici, la classificazione delle specie più significative e diffuse può essere eseguita secondo il seguente schema:

|  | IDROLISI |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | VP       | GLU | ARA | ANA | AMI | CAS | GEL | LEC | NIT | CIT | MOB |
| SPORE CENTRALI<br>O SUBTERMINALI<br>NON DEBORDANTI |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| B. subtilis  | +        | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | +   |     |
| B. anthracis                                       | +        | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | D   | -   |
| B. cereus  | +        | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| B. coagulans                                       | +        | +   | D   | +   | +   | D   | -   | -   | D   | D   |     |
| B. firmus  | -        | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   | D   | -   |     |
| B. lentus  | -        | +   | +   | -   | +   | D   | D   | -   | D   | -   |     |
| B. licheniformis                                   | +        | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   |     |
| B. megaterium                                      | -        | +   | D   | -   | +   | +   | +   | -   | D   | +   |     |
| B. pumilus   | +        | +   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | +   |     |
| SPORE CENTRALI                                     |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

| O SUBTERMINALI<br>OVALARI E<br>DEBORDANTI   |   |    |    |   |   |   |   |   |   |    |
|---|---|----|----|---|---|---|---|---|---|----|
| B. alvei                                    | + | +  | -  | + | + | + | + | - | - | -  |
| B. brevis                                   | - | D  | -  | - | + | + | + | - | D | D  |
| B. circulans                                | - | +  | +  | D | + | D | D | - | D | D  |
| B. macerans                                 | - | +G | +  | + | + | - | + | - | + | D  |
| B. polymyxa                                 | + | +G | +  | + | + | + | + | - | + | -  |
| SPORE TERMINALI<br>SFERICHE E<br>DEBORDANTI |   |    |    |   |   |   |   |   |   |    |
| B. pasteurii                                | - | ND | ND | + | - | D | + | - | + | ND |
| B. sphaericus                               | - | -  | -  | - | - | D | D | - | - | D  |

+:  $\geq 90\%$  dei ceppi sono positivi

D: 11 – 89% dei ceppi sono positivi

G: produzione di gas

GLU: acidificazione di glucosio

ANA: crescita in anaerobiosi

CAS: caseina

LEC: lecitinasi

CIT: utilizzazione del citrato

-:  $\geq 90\%$  dei ceppi sono negativi

ND: dati non disponibili

VP: Voges. Proskauer

ARA: acidificazione di arabinosio

AMI: amido

GEL: gelatina

NIT: riduzione dei nitrati a nitriti

MOB: mobilità

### c) organismi coccoidi Gram positivi

#### 1) Micrococcus (famiglia Micrococcaceae)

Morfologia: cocci singoli, in coppia, in tetradi o a grappoli (0,5 – 2,0  $\mu\text{m}$ ).

Immobili.

Strettamente aerobi (metabolismo a tipo ossidativo).

Principali caratteristiche biochimiche: l'acidificazione dei carboidrati permette l'identificazione delle singole specie.

Note: molte specie formano colonie pigmentate.

#### 2) Planococcus (famiglia Micrococcaceae)

Morfologia: cocci singoli, in coppia, occasionalmente in tetradi (1,0 – 1,2  $\mu\text{m}$ ).

Mobili per uno o due flagelli.

Strettamente aerobi (metabolismo a tipo ossidativo).

Principali caratteristiche biochimiche: la maggior parte dei ceppi idrolizza la gelatina.

Note: formano colonie giallo-arancio.

#### 3) Staphylococcus (famiglia Micrococcaceae)

Morfologia: cocci singoli, in coppia o a grappoli (0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ ).

Immobili.

Aerobi e anaerobi facoltativi (metabolismo a tipo ossidativo e fermentativo).

Principali caratteristiche biochimiche: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hvicus* subsp. *hvicus* differiscono dagli altri stafilococchi perché sono coagulasi a DNAasi positivi.

#### SCHEMA RIASSUNTIVO

|                | tetradi | mobilità | fermentazione<br>anaerobia di<br>glucosio | lisostafina |
|----------------|---------|----------|---|-------------|
| Micrococcus    | +       | -        | -   | R           |
| Planococcus    | -       | +        | -   | R           |
| Staphylococcus | -       | -        | +   | R           |

R: resistente

S: sensibile

#### D.2 FORMULE DEI TERRENI IMPIEGATI

##### 1. Agar Standard (Plate Count Agar)

|                        |       |    |  |      |
|------------------------|-------|----|--|------|
| Triptosio (o equival.) | 5     | g  |  |      |
| Estratto di lievito    | 2,5   | g  |  |      |
| Glucosio               | 1     | g  |  |      |
| Agar                   | 15    | g  |  |      |
| Acqua distillata       | 1.000 | ml |  | pH 7 |

Sterilizzare a 121°C per 20'.

##### 2. Brodo Lattosato

|                      |       |    |  |        |
|----------------------|-------|----|--|--------|
| Estratto di carne    | 3     | g  |  |        |
| Peptone (o equival.) | 5     | g  |  |        |
| Lattosio             | 5     | g  |  |        |
| Acqua distillata     | 1.000 | ml |  | pH 6,7 |

N.B. – Per l'impiego in questi metodi, il brodo lattosato è concentrato tre volte.

Distribuire in contenitori forniti di campanula di Durnam e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'.

##### 3. Brodo Lattosato al verde Brillante e Bile

|                         |        |    |  |              |
|-------------------------|--------|----|--|--------------|
| Peptone (o equival.)    | 10     | g  |  |              |
| Lattosio                | 10     | g  |  |              |
| Bile di bue disidratata | 20     | g  |  |              |
| Verde brillante         | 0,0133 | g  |  |              |
| Acqua distillata        | 1.000  | ml |  | pH 7,2 – 7,4 |

Distribuire in contenitori forniti di campanula di Durnam e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'.

##### 4. MacConkey Agar

|                      |    |   |  |  |
|----------------------|----|---|--|--|
| Peptone (o equival.) | 17 | g |  |  |
|----------------------|----|---|--|--|

|                                |       |    |        |
|--------------------------------|-------|----|--------|
| Peptone Proteosio (o equival.) | 3     | g  |        |
| Lattosio                       | 10    | g  |        |
| Sali biliari n.3               | 1,5   | g  |        |
| Cloruro di sodio               | 5     | g  |        |
| Agar                           | 13,5  | g  |        |
| Rosso neutro                   | 0,03  | g  |        |
| Cristalvioletto                | 0,01  | g  |        |
| Acqua distillata               | 1.000 | ml | pH 7,1 |

Sterilizzare a 121°C per 20'.

5. TSI Agar (Triplo zucchero Ferro Agar)

|                                |       |    |        |
|--------------------------------|-------|----|--------|
| Peptone Proteosio (o equival.) | 20    | g  |        |
| Cloruro di sodio               | 5     | g  |        |
| Lattosio                       | 10    | g  |        |
| Glucosio                       | 1     | g  |        |
| Solfato d'ammonio ferroso      | 0,2   | g  |        |
| Tiosolfato di sodio            | 0,2   | g  |        |
| Agar                           | 13    | g  |        |
| Rosso fenolo                   | 0,025 | g  |        |
| Acqua distillata               | 1.000 | ml | pH 7,4 |

Sterilizzare a 121°C per 15'.

6. Acqua triptonata per la dimostrazione dell'Indolo (Indole Nitrite Medium ovvero Trypticase Nitrate Broth)

|                         |       |    |        |
|-------------------------|-------|----|--------|
| Tripeptone (o equival.) | 20    | g  |        |
| Fosfato bisodico        | 2     | g  |        |
| Glucosio                | 1     | g  |        |
| Agar                    | 1     | g  |        |
| Nitrato di potassio     | 1     | g  |        |
| Acqua distillata        | 1.000 | ml | pH 7,2 |

Sterilizzare a 121°C per 15'.

7. Brodo di Möller

|                              |       |    |      |                          |
|------------------------------|-------|----|------|--------------------------|
| Peptone Tiotone (o equival.) | 20    | g  | }    | + 1% L- o 2% DL-Ornitina |
| Estratto di carne di bue     | 2     | g  |      |                          |
| Glucosio                     | 0,5   | g  |      |                          |
| Bromo Cresolo Porpora        | 0,01  | g  |      |                          |
| Rosso Cresolo                | 0,005 | g  |      |                          |
| Piridoxal                    | 0,005 | g  |      |                          |
| Acqua distillata             | 1.000 | ml | pH 6 |                          |

Sterilizzare a 121°C per 15'.

8. AT 7 (Agar al tergitolo 7)

|                               |    |   |
|-------------------------------|----|---|
| Proteose peptone (n. 3 Difco) | g  | 5                                       |
| Estratto di lievito           | g  | 3                                       |
| Lattosio                      | g  | 10                                      |
| Blu di Bromotimolo            | mg | 25                                      |
| Tergitolo                     | mg | 100                                     |
| Agar                          | g  | 15 – 20 (secondo il potere gelificante) |
| Acqua distillata              | ml | 1.000                                   |
| pH finale                     |    | 6,9 ± 0,2                               |

Sterilizzare in autoclave a 121 °C x 15 minuti. Distribuire in piastra.

9. AT 7 – TTC

Come il terreno n° 8, aggiungendo cloruro di trifeniltetrazolio (TTC) mg 35/litro.

L'integrazione va fatta addizionando asetticamente a 1 litro di terreno sterilizzato e raffreddato a 50 °C. 3,5 ml di una soluzione acquosa sterile all'1% di 2.3.5 trifeniltetrazolio cloruro.

10. Brodo Glucosio Azide (Azide Dextrose Broth)

|                          |       |    |
|--------------------------|-------|----|
| Estratto di carne di bue | 4,5   | g  |
| Triptosio (o equival.)   | 15    | g  |
| Glucosio                 | 7,5   | g  |
| Cloruro di sodio         | 7,5   | g  |
| Azide di sodio           | 0,2   | g  |
| Acqua distillata         | 1.000 | ml |

N.B. – Per l'impiego in questi metodi, il Brodo Glucosio Azide è concentrato 3 volte.

Sterilizzare a 121 °C per 15'.

11. Bile – esculina – azide agar

|                             |       |           |
|-----------------------------|-------|-----------|
| Triptone                    | 17    | g         |
| Peptone                     | 3     | g         |
| Estratto di lievito         | 5     | g         |
| Ox – Bile disidratata       | 10    | g         |
| Cloruro di sodio            | 5     | g         |
| Esculina                    | 1     | g         |
| Citrato ferrico ammoniacale | 0,5   | g         |
| Azide di sodio              | 0,15  | g         |
| Agar                        | 12-20 | g (*)     |
| Acqua distillata            | 1.000 | ml        |
| pH finale                   |       | 7,2 ± 0,1 |

Sterilizzare a 121 °C per 15'

(\*) Secondo il potere gelificante



12. KF Streptococcus agar:

|                               |    |           |
|-------------------------------|----|-----------|
| Proteose peptone (n. 3 Difco) | g  | 10        |
| Estratto di lievito           | g  | 10        |
| Cloruro di sodio              | g  | 5         |
| Sodio glicerofosfato          | g  | 10        |
| Maltosio                      | g  | 20        |
| Lattosio                      | g  | 1         |
| Sodio azide                   | g  | 0,4       |
| Porpora di Bromocresolo       | mg | 15        |
| Agar                          | g  | 20        |
| Acqua distillata              | ml | 1.000     |
| pH finale                     |    | 7,2 ± 0,2 |

Sterilizzare in autoclave a 121 °C x 15 minuti. Raffreddare il terreno a 50 °C e aggiungere asepticamente 10 ml di soluzione acquosa sterile all'1% di 2.3.5 trifeniltetrazolio cloruro.

13. SPS Agar

|                                |       |        |
|--------------------------------|-------|--------|
| Solfito di sodio               | 0,5   | g      |
| Solfato di polimixina          | 0,01  | g      |
| Sulfodiazina                   | 0,12  | g      |
| Triptosio peptone (o equival.) | 15    | g      |
| Estratto di lievito            | 10    | g      |
| Agar                           | 13,9  | g      |
| Citrato di ferro               | 0,5   | g      |
| Acqua distillata               | 1.000 | ml     |
|                                |       | pH 7,0 |

Sterilizzare in autoclave a 121 °C x 15'.

14. Brodo Tioglicollato

|                          |       |        |
|--------------------------|-------|--------|
| Cistina                  | 0,5   | g      |
| Tioglicollato di sodio   | 0,75  | g      |
| Tiosolfato di sodio      | 0,1   | g      |
| Cloruro di sodio         | 2,5   | g      |
| Fosfato bisodico         | 5     | g      |
| Fosfato monopotassico    | 3     | g      |
| Cloruro di calcio        | 0,01  | g      |
| Polipeptone (o equival.) | 20    | g      |
| Agar                     | 0,7   | g      |
| Glucosio                 | 7,5   | g      |
| Solfato di magnesio      | 0,1   | g      |
| Estratto di lievito      | 2,5   | g      |
| Acqua distillata         | 1.000 | ml     |
|                          |       | pH 7,1 |

|                          |       |    |  |        |
|--------------------------|-------|----|--|--------|
| 15. Agar nutritivo       |       |    |  |        |
| Triptosio (o equiv.)     | 5     | g  |  |        |
| Estratto di carne di bue | 3     | g  |  |        |
| Agar                     | 15    | g  |  |        |
| Acqua distillata         | 1.000 | ml |  | pH 6,8 |

|                                     |       |    |  |        |
|-------------------------------------|-------|----|--|--------|
| 16. Latte tornasolato (Litmus Milk) |       |    |  |        |
| Latte scremato in polvere           |       |    |  |        |
| (Skim Milk)                         | 100   | g  |  |        |
| Tornasole                           | 0,75  | g  |  |        |
| Acqua distillata                    | 1.000 | ml |  | pH 6,8 |

|                         |       |    |  |        |
|-------------------------|-------|----|--|--------|
| 17. Agar alla cetrimide |       |    |  |        |
| Triptosio (o equiv.)    | 20    | g  |  |        |
| Cloruro di magnesio     | 1,4   | g  |  |        |
| Solfato di potassio     | 10    | g  |  |        |
| Agar                    | 13,6  | g  |  |        |
| Cetrimide               | 0,3   | g  |  |        |
| Acqua distillata        | 1.000 | ml |  | pH 7,2 |

|   |    |       |  |  |
|---|----|-------|--|--|
| 18. Terreno di King A:                  |    |       |  |  |
| Peptone batteriologico                  | g  | 20    |  |  |
| Glicerina                               | g  | 10    |  |  |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anidro) | g  | 10    |  |  |
| MgCl <sub>2</sub> (anidro)              | g  | 1,4   |  |  |
| Agar                                    | g  | 12    |  |  |
| Acqua distillata                        | ml | 1.000 |  |  |
| pH finale                               |    | 7,2   |  |  |

Sterilizzare in autoclave a 121 °C x 15 minuti. Raffreddare facendo solidificare in provetta a becco di clarino.

|                                    |       |    |  |        |
|------------------------------------|-------|----|--|--------|
| 19. Terreno al bleu di bromotimolo |       |    |  |        |
| Peptone (o equival.)               | 2     | g  |  |        |
| Cloruro di sodio                   | 5     | g  |  |        |
| Fosfato bipotassico                | 0,3   | g  |  |        |
| Agar                               | 3     | g  |  |        |
| Bleu di bromotimolo                | 0,03  | g  |  |        |
| Acqua distillata                   | 1.000 | ml |  | pH 7,2 |

20. Baird Parker Agar

|                          |       |    |   |   |
|--------------------------|-------|----|---|---|
| Triptosio (o equival.)   | 10    | g  | } | + ml 10 tellurito di potassio 1%          |
| Estratto di carne di bue | 5     | g  |   |   |
| Estratto di lievito      | 1     | g  |   |   |
| Glicina                  | 12    | g  |   |   |
| Piruvato di sodio        | 10    | g  |   |   |
| Cloruro di litio         | 5     | g  |   |   |
| Agar                     | 20    | g  |   |   |
| Acqua distillata         | 1.000 | ml | } | + ml 50 emulsione giallo d'uovo 50 pH 7,2 |

21. Brodo nutritivo

|                        |       |    |        |
|------------------------|-------|----|--------|
| Triptosio (o equival.) | 10    | g  |        |
| Estratto di bue        | 5     | g  |        |
| Acqua distillata       | 1.000 | ml | pH 6,9 |

22. Agar di Mossel e Martin con mannitolo

|                        |       |    |      |
|------------------------|-------|----|------|
| Triptosio (o equival.) | 10    | g  |      |
| Mannitolo              | 10    | g  |      |
| Estratto di lievito    | 1,5   | g  |      |
| Cloruro di sodio       | 5     | g  |      |
| Agar                   | 5     | g  |      |
| Bromocresolporpora     | 0,015 | g  |      |
| Acqua distillata       | 1.000 | ml | pH 7 |