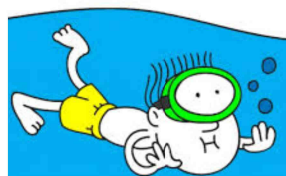




Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## **“REGOLE PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI PROVA, DELLA SOSPENSIONE INIZIALE E DELLE DILUIZIONI SUCCESSIVE PER L’ANALISI MICROBIOLOGICA”**

**Regole specifiche per la preparazione dei campioni liquidi (latte ed acqua)**



**Applicazione delle norme  
ISO 6887-5:2020  
UNI EN ISO 8199:2018**







## Agenda

ISO 6887-5:2020 Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination —

Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

*Abstract – Contents - Scope - Normative references - Principle – Diluents – Apparatus – Sampling - General procedures - Specific procedures - Further decimal dilutions*

UNI EN ISO 8199:2018 Qualità dell'acqua - Requisiti generali e guida per esami microbiologici basati su coltura

Abstract – Contents - Scope - Normative references - Terms and definitions – Diluents – Sample preparation

Riferimenti normativi Acque destinate al consumo umano

Prelievo/trasporto/conservazione/accettazione/analisi campioni di acqua

Parametri microbiologici e Procedure accreditate presso la UOS IGA CIP

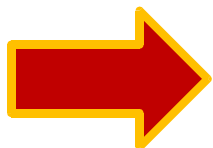






Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## ISO 6887-5:2020



# Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — **Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products**

Publicata ad aprile 2020 ha sostituito la Norma ISO 6887-5:2010 che aveva sostituito la ISO 8261:2001

### ABSTRACT

This document specifies rules for the preparation of samples of milk and milk products and their suspensions for microbiological examination when the samples require a different preparation from the general methods specified in ISO 6887-1.

This document excludes the preparation of samples for both enumeration and detection test methods where preparation details are specified in the relevant International Standards.

This document is intended to be used in conjunction with ISO 6887-1.







# Contents

<b>Foreword</b> .....	iv
<b>1 Scope</b> .....	1
<b>2 Normative references</b> .....	1
<b>3 Terms and definitions</b> .....	2
<b>4 Principle</b> .....	2
<b>5 Diluents</b> .....	2
5.1 List of diluents.....	2
5.2 Distribution and sterilization of the diluents.....	5
5.3 Performance testing for diluents.....	5
<b>6 Apparatus</b> .....	6
<b>7 Sampling</b> .....	6
<b>8 General procedures</b> .....	6
8.1 General.....	6
8.2 Frozen products.....	6
8.3 Hard and dry products.....	7
8.4 Liquid and non-viscous products.....	7
8.5 Multi-component products.....	7
8.6 Acidic products.....	7
8.7 High-fat foods (fat content > 20 % mass fraction).....	7
<b>9 Specific procedures</b> .....	7
9.1 Milk and liquid milk products.....	7
9.2 Dehydrated milk, dehydrated sweet whey, dehydrated acid whey, dehydrated buttermilk and lactose.....	7
9.3 Cheese and cheese products.....	8
9.4 Acid casein, lactic casein, rennet casein and caseinate.....	8
9.4.1 General case.....	8
9.4.2 Special case: Rennet casein.....	8
9.5 Butter.....	8
9.6 Milk-based ice-cream.....	9
9.7 Milk-based custard, desserts and sweet cream (pH > 5).....	9
9.8 Milk-based fermented milks, yogurt, probiotics milk products and sour cream (pH < 5).....	9
9.9 Dehydrated milk-based infant foods with or without probiotics.....	9
<b>10 Further decimal dilutions</b> .....	10
<b>Bibliography</b> .....	11







## 1 Scope

This document is applicable to:

- a) milk and liquid milk products;
- b) dehydrated milk products;
- c) cheese and cheese products;
- d) casein and caseinates;
- e) butter;
- f) milk-based ice-cream;
- g) milk-based custard, desserts and sweet cream;
- h) fermented milks, yogurt, probiotics milk products and sour cream;
- i) dehydrated milk-based infant foods, with or without probiotics.







## 2 Normative references

The following documents are referred to in the text in such a way that some or all of their content constitutes requirements of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

*ISO 6887-1, Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*

*ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

*ISO 11133, Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*







## 4 Principle

The general principles for sample preparation and subsequent steps are detailed in ISO 6887-1. This document describes specific sample preparation for milk and milk products.

### *ISO 6887-1*

#### *4 Principle*

*Preparation of the initial suspension (3.6) in such a way as to obtain as uniform a distribution as possible of the microorganisms contained in the test portion (3.5).*

*Preparation, if necessary, of further dilutions (3.7) in order to reduce the number of microorganisms*

*per unit volume to allow, after incubation, observation of their growth or not (in the case of tubes or*

*bottles) or colony counting (in the case of plates), as stated in each specific standard.*

*NOTE In order to restrict the range of enumeration to a given optimum interval, or if high numbers of microorganisms are foreseen, it is possible to inoculate only the necessary (decimal) dilutions needed to achieve the enumeration according to the calculations described in ISO 7218.*







## 5 Diluents

### 5.1 List of diluents

Follow current laboratory practices as specified in ISO 7218. The composition of culture media and reagents and their preparation are specified in ISO 6887-1 or in the following procedures.

#### 5.1.1 Basic materials. See ISO 6887-1.

5.1.2 Diluents for general use. Peptone salt solution, buffered peptone water and double-strength buffered peptone water are described in ISO 6887-1.

##### 5.1.2.1 Quarter-strength Ringer's solution.

##### 5.1.2.2 Peptone solution

##### 5.1.2.3 Phosphate buffer solution.







## 6 Apparatus

Usual microbiological laboratory equipment for general use (see ISO 7218 and ISO 6887-1) and, in particular, the following.

**6.1 Water baths**, capable of maintaining temperatures of (34 to 38) °C and (44 to 47) °C.

**6.2 Spatulas or glass rods.**

**6.3 Hotplate** or other apparatus, capable of gentle heating (not gas burners), and capable of operating at the required temperature.

**6.4 Glass beads**, of diameter about 6 mm.







## 7 Sampling

Sampling is not part of the method specified in this document. Follow the specific ISO document dealing with the product concerned. If there is no specific ISO document dealing with the sampling of the product concerned, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

Recommended sampling techniques are given in ISO 707 - IDF 50.







## 8 General procedures

### 8.1 General

All preparations and manipulations should be carried out using an aseptic technique with sterile equipment to prevent microbial contamination of samples from all external sources (see ISO 7218).

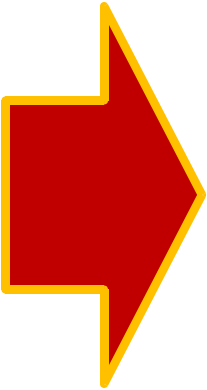
Follow the general procedure for preparation of the initial suspension as described in ISO 6887-1.





## 9 Specific procedures

### 9.1 Milk and liquid milk products



Mix the test sample thoroughly so that the microorganisms are distributed as evenly as possible by rapidly inverting the sample container 25 times. Avoid foaming or allow any foam to disperse.

The interval between mixing and removing the test portion shall not exceed 3 min.



Remove the *test sample* with a sterile pipette and prepare further dilutions in accordance with ISO 6887-1 or inoculate directly a medium or a broth in accordance with the procedure of the specific method of enumeration or detection.







## 10 Further decimal dilutions

See ISO 6887-1.

To transfer a correct volume from a viscous initial suspension such as acid or rennet casein (see [9.4](#)), rinse the pipette with diluent by aspirating several times, using the diluent in the tube used for making the decimal dilution.

Alternatively, if the initial suspension is too viscous, increase the proportion of the diluent of the initial suspension (see ISO 6887-1).

When 10 ml plus 90 ml, or 11 ml plus 99 ml, have been taken, mix the suspension by shaking manually as described in [9.1](#) or by using a vortex.







## 1. Scopo

Lo scopo della presente procedura è quello di descrivere le modalità operative e le responsabilità per la preparazione dei campioni di prova, delle sospensioni iniziali e delle diluizioni decimali per l'esame microbiologico del latte e dei prodotti a base di latte compresi quelli destinati alla prima infanzia.

## 3. Definizioni ed abbreviazioni

### 3.1 Campione di laboratorio

Campione preparato per l'invio al laboratorio e previsto per l'ispezione o le prove.

### 3.2 Porzione di prova

(microbiologia) Volume misurato o massa misurata di campione rappresentativo prelevato dal campione di laboratorio per l'utilizzo nella preparazione della sospensione iniziale.







### 3.3 Sospensione iniziale; diluizione primaria

Sospensione, soluzione o emulsione ottenuta dopo che una quantità del prodotto da esaminare previamente pesata o misurata viene mescolata con nove parti di diluente, se necessario usando un agitatore meccanico.

Nota 1: In alcuni casi e in particolare per prodotti che danno una sospensione iniziale di 1+ 9 che è troppo viscosa o densa, può essere necessario aggiungere una maggiore quantità di diluente. In altri casi può essere richiesta una sospensione iniziale più concentrata di quella 1+ 9 per attenersi a specifici criteri di refertazione. Tali variazioni devono essere tenute in debito conto nelle successive operazioni di calcolo e/o nell'espressione del risultato.

Nota 2: L'uso della prima diluizione è il più appropriato per ottenere un risultato  $\geq 10$  microrganismi per grammo. Se si desidera ottenere risultati che sono inferiori a questa soglia è possibile usare una minor quantità di diluente per la sospensione iniziale.

### 3.4 Ulteriori diluizioni decimali

Sono sospensioni, soluzioni o emulsioni che si ottengono mescolando un volume specifico della diluizione primaria con nove volumi di diluente. Ripetendo questa operazione per ogni diluizione così preparata un certo numero di volte si ottengono una serie di diluizioni decimali idonee alla inoculazione dei terreni colturali.







## 5. Principio

Si prepara una sospensione iniziale per ottenere una distribuzione più uniforme possibile dei microrganismi contenuti nel campione di prova; se necessario preparare ulteriori diluizioni decimali del campione da esaminare per ridurre il numero di microrganismi per unità di volume per consentire dopo l'incubazione l'osservazione di qualsiasi crescita nel caso di terreni di coltura liquidi, o di colonie nel caso di piastre di Agar.

Al fine di limitare se richiesto l'intervallo di conta ad un dato intervallo oppure se si prevedono elevati numeri di microrganismi, è possibile inoculare solo le diluizioni decimali (almeno due diluizioni successive) necessarie per ottenere la conta secondo il calcolo specificato nella ISO 7218.







## 6.1 Apparecchiature

Agitatore meccanico (tipo Vortex)

Omogeneizzatore peristaltico (tipo Stomacher)

Frigorifero da  $+3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Termostato a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Termostato a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Bilancia tecnica con precisione fino a 0,01 g

Pipettatrice automatica

Cappa a flusso laminare

Lampada Bunsen

Bagnomaria a  $45^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Bagnomaria a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

## 6.2 Materiali

Forbici, cucchiari, spatole sterili

Beute e/o bottiglie in vetro sterili

Sacchetti sterili presto-chiuso

Pipette sterili monouso in plastica o in vetro da 1 ml, 2 ml, 10 ml, 25 ml

Micropipetta 100 microl

Perline di vetro







### 6.3.1 Diluenti per uso generale

Durante l'analisi, se non diversamente specificato, utilizzare solo reagenti di grado analitico riconosciuto e solo acqua distillata sterile o deionizzata.

- Soluzione di sale peptonato
- **Acqua peptonata (PTW)**
- Acqua peptonata tamponata (BPW) (terreno di pre-arricchimento)
- Soluzione di Ringer 1/4x
- Soluzione peptonata
- Soluzione di fosfato tamponata







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## 8.2 Preparazione del campione da esaminare e della sospensione iniziale.

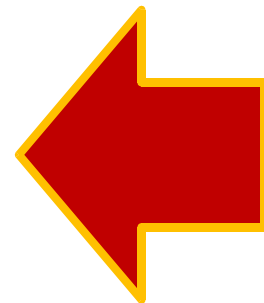
### Prodotti liquidi e non viscosi

Agitare il campione accuratamente, manualmente o meccanicamente, in modo da distribuire i microrganismi nel modo più uniforme possibile.

#### 8.2.2 Procedure specifiche

##### **Latte e prodotti liquidi a base di latte**

**Agitare il campione** accuratamente in modo da distribuire i microrganismi nel modo più uniforme possibile **capovolgendo** il contenitore del campione rapidamente **25 volte**. **Evitare la formazione di schiuma o fare in modo che quella presente si disperda**. **L'intervallo tra il mescolamento e il prelievo della porzione da esaminare non dovrebbe essere superiore a 3 minuti.**



Prelevare 1 ml del campione con una pipetta sterile e addizionarla a 9 ml di diluente (oppure 10 ml del campione a 90 ml di diluente, o 11 ml del campione a 99 ml di diluente). Agitare la diluizione primaria (per esempio 25 volte con movimento manuale di circa 300 mm per 7 secondi o usando un agitatore meccanico da 5 a 10 secondi) per ottenere una diluizione di 1:10.

Preparare le diluizioni successive come in 8.3.







### 8.3 Ulteriori diluizioni decimali

Quando si trasferisce da una diluizione primaria viscosa, quale la caseina acida o con caglio, risciacquare la pipetta con diluente aspirando diverse volte, utilizzando il diluente nella provetta in uso per creare la diluizione decimale.

Importante – Se il precedente passaggio è effettuato senza risciacquare la pipetta, il volume della diluizione primaria viscosa è inesatto.

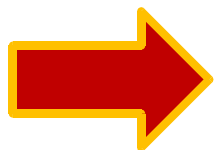
Quando si prelevano 10 ml più 90 ml, oppure 11 ml più 99 ml, agitare manualmente come descritto nel punto 8.2.2.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



## **UNI EN ISO 8199:2018      Qualità dell'acqua**

### **Requisiti generali e guida per esami microbiologici basati su coltura**

**Sommario :** La norma specifica i requisiti e fornisce una guida per l'esecuzione delle manipolazioni comuni a ciascuna tecnica di coltura per l'esame microbiologico dell'acqua, con particolare riferimento alla preparazione di campioni, terreni di coltura, apparecchiature generali e vetreria, se non diversamente richiesto nella norma specifica. Descrive anche le varie tecniche disponibili per il rilevamento e il conteggio mediante coltura e i criteri per determinare quale tecnica sia appropriata.

Questo documento è principalmente destinato agli esami per batteri, lieviti e muffe, ma alcuni aspetti sono applicabili anche a batteriofagi, virus e parassiti. Esclude le tecniche non basate su coltura di microrganismi, quali i metodi di reazione a catena della polimerasi (PCR).





## ISO 8199:2018(E)

## ISO 8199:2018(E)

## Contents

	Page
Foreword	v
Introduction	vii
1 Scope	1
2 Normative references	1
3 Terms and definitions	1
4 Principle	4
5 General measurement requirements	4
5.1 Uniformity of temperatures	4
5.2 Incubation times	4
5.3 Volumes and masses	4
6 Diluents and culture media	5
6.1 General	5
6.2 Quality requirements of ingredients	5
6.3 Diluents	5
7 Sterilization and decontamination	5
7.1 Sterilization of apparatus and glassware	5
7.2 Sterilization of consumables	6
7.3 Decontamination of glassware and materials after use	6
7.4 Waste management	6
8 Samples and sample handling	6
8.1 Sampling	6
8.2 Sample preparation	7
8.2.1 Waters and other aqueous matrices	7
8.2.2 Swabs	7
9 Enumeration (quantitative) methods	8
9.1 Inoculation of test portions in (or on) solid media	8
9.1.1 General	8
9.1.2 Pour plate technique	8
9.1.3 Spread plate technique	9
9.1.4 Membrane filtration technique	10
9.1.5 Incubation	12
9.1.6 Counting and confirmation from solid media	12
9.1.7 General guidance for calculation of results	13
9.1.8 Expression of results	14
9.2 Enumeration using a liquid medium	24
9.2.1 General	24
9.2.2 Procedure	25
9.2.3 Choice of inoculation system	25
9.2.4 Incubation	26
9.2.5 Interpretation of results	26
9.2.6 Uncertainty of test results	27
9.2.7 Determination of MPN values	27
10 Detection (qualitative) methods	30
10.1 General	30
10.2 Procedure	31
10.3 Uncertainty of test results	31
11 Performance characteristics of methods	31
12 Analytical quality control	32
12.1 General	32

12.2 Internal quality control	32
12.2.1 General	32
12.2.2 Process controls	32
12.3 External quality assessment	33
Annex A (informative) Criteria for the choice of technique	35
Annex B (informative) Confidence intervals for colony count technique and choice of method of calculation in special cases	40
Annex C (normative) Counting and calculations with two Petri dishes per dilution	44
Annex D (normative) Composition, preparation and performance testing of diluents	51
Bibliography	55



## 1 Scope

This document specifies requirements and gives guidance for performing the manipulations common to each culture technique for the microbiological examination of water, particularly the preparation of samples, culture media, and general apparatus and glassware, unless otherwise required in the specific standard. It also describes the various techniques available for detection and enumeration by culture and the criteria for determining which technique is appropriate.

This document is mainly intended for examinations for bacteria, yeasts and moulds, but some aspects are also applicable to bacteriophages, viruses and parasites. It excludes techniques not based on culturing microorganisms, such as polymerase chain reaction (PCR) methods.

## 2 Normative references

The following documents are referred to in the text in such a way that some or all of their content constitutes requirements of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 7704, *Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 19458, *Water quality — Sampling for microbiological analysis*



### 3 Terms and definitions

#### 3.15

##### **test portion**

specified quantity of the sample that is taken for analysis

EXAMPLE 0,1 ml, 1 ml, 100 ml of sample.

#### 3.16

##### **test sample**

undiluted, diluted or otherwise prepared *test portion* (3.15) of a sample to be tested, after completion of all preparation steps such as centrifugation, filtration, homogenization, pH adjustment and determination of ionic strength





## 6.3 Diluents

The following diluents are commonly used in water microbiology. However, other appropriate diluents may be used and this list is not exhaustive:

- saline solution;
- peptone diluent;
- peptone saline solution [maximum recovery diluent (MRD)];
- quarter-strength Ringer's solution;
- phosphate buffer solution.

Follow the formulations and the preparation, storage and performance testing instructions given in Annex D for these diluents.





## 8.2 Sample preparation

### 8.2.1 Waters and other aqueous matrices

Clean and dirty water should be separated and processed using separate equipment in separate areas to reduce cross-contamination risk where possible. Alternatively, process batches of clean waters before dirty water.

Before examination, mix the sample thoroughly by agitation to achieve uniform distribution of microorganisms and other particles. This can be achieved by inversion of the sample or by a to-and-fro motion. Depending on the nature of the water and the microbial content anticipated, make any necessary dilutions at this stage.

For plate counts, ten-fold dilutions are usually used. For membrane filtration (with a smaller surface area), smaller dilution steps are recommended. For many most probable number (MPN) techniques, dilutions are an inherent part of the procedure. Refer to [9.2.3](#) for guidance on dilutions in MPN techniques. See ISO 6887-1[7] for general guidance on the preparation of serial dilutions.

For ten-fold dilutions, aseptically measure nine volumes of the diluent and one volume of the water sample into sterile dilution bottles or tubes. Alternatively, volumes of diluent pre-sterilized in screw-capped bottles are used and volumes verified after autoclaving. One or more ten-fold dilutions are made by transferring one volume of water sample to nine volumes of diluent. Mix the solution thoroughly with a fresh pipette or by mechanical means and transfer one volume of this dilution to another nine volumes of diluent. Repeat these steps as many times as required. Prepare sufficient volumes of each dilution for all the tests to be carried out on each water sample.

For dilutions of other magnitudes, the volume of diluent to volume of sample is adjusted accordingly. For example, four-fold dilutions can be made as described above for ten-fold dilutions, only in this case one volume of water sample is mixed with three volumes of diluent. Another approach is to use a ten-fold dilution series, but filter both 10 ml and 30 ml volumes.

If the concentration of the target organism is expected to be high, hundred-fold dilution steps may be used by mixing one volume of water sample with 99 volumes of diluent, but such large intervals between measurements can adversely affect the reliability of the test results.





## Riferimenti normativi

### Acque destinate al consumo umano

- **Dlgs 2 febbraio 2001, n. 31 e s.m.i.** : recepimento Dir. 98/83/CE concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano
- **DECRETO 14 giugno 2017** Recepimento della direttiva (UE) 2015/1787 che modifica gli allegati II e III della direttiva 98/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano. Modifica degli allegati II e III del decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31.
- **Reg. 852/2004/CE**, sull'igiene dei prodotti alimentari: «Definizioni»: "acqua potabile": l'acqua rispondente ai requisiti minimi fissati nella direttiva 98/83/CE del Consiglio, del 3 novembre 1998, sulla qualità delle acque destinate al consumo umano;
- **Reg. 852/2004/CE**, allegato I **Produzione primaria**, Parte A Requisiti generali in materia di igiene per la produzione primaria e le operazioni associate, capo II Requisiti in materia di igiene, punto 4: «**Gli operatori del settore alimentare che allevano**, raccolgono o cacciano animali o producono prodotti primari di origine animale **devono**, se del caso, adottare misure adeguate per [...]», lettera d): «**Utilizzare acqua potabile o acqua pulita, ove necessario in modo da prevenire la contaminazione**».







## Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n.31

### **Acque destinate al consumo umano:**

- acque trattate o non trattate, destinate ad uso potabile, per la preparazione di cibi e bevande, o per altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine
- acque utilizzate in un'impresa alimentare per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano
- impianti di distribuzione domestici per l'erogazione dell'acqua destinata al consumo umano, compresa la rete esterna.







## Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n.31 Allegato I: Parametri e valore di parametro

- **OBLIGATORI:** parametri microbiologici e chimici, essenziali in materia di qualità e tutela della salute e sono in relazione diretta con la salute umana (all. 1 tab. A e B)
- **Parte A: Parametri microbiologici**
- **Parte B: Parametri chimici (As, Cd, Pb, Hg, Nitrati, IPA, Antiparassitari....)**
- **INDICATORI:** ulteriori parametri secondari che in sé non presentano un rischio diretto per la salute umana e forniscono indicazioni sulla variazione della qualità dell'acqua e sulla necessità di adottare eventuali azioni correttive (all. 1 tab. C)
- **Parte C: Parametri “indicatori” di variazioni anomale della qualità dell'acqua (Microrganismi a 22°C e 37°C, *Cl. perfringens*, Torbidità, Radioattività, Alghe, Enterovirus, Elminti...)**





Allegato I

**Parametri e valori di parametro\***

**PARTE A**

**Parametri microbiologici**

Parametro	Valore di parametro (numero/100 ml)
Escherichia coli (E. coli)	0
Enterococchi	0

Per le acque messe in vendita in bottiglie o contenitori sono applicati i seguenti valori:

Parametro	Valore di parametro
Escherichia coli (E. coli)	0/250 ml
Enterococchi	0/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	0/250 ml
Conteggio delle colonie a 22° C	100/ml
Conteggio delle colonie a 37° C	20/ml





## FASE PREANALITICA (campionamento)



Prelievo dei campioni  
Trasporto dei campioni  
Conservazione dei campioni



## FASE ANALITICA



Accettazione dei campioni  
Analisi Microbiologiche

## FASE POST ANALITICA



Idoneità del risultato







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

◆ **UNI EN ISO 5667-1:2007 Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 1:**



**Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento**

◆ **UNI EN ISO 5667-3:2018 Qualità dell'acqua – Campionamento – Parte 3:**

**Conservazione e trattamento dei campioni d'acqua**

◆ **UNI EN ISO 19458:2008 Qualità dell'acqua - Campionamento per analisi**

**microbiologiche**







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



## Prelievo dei campioni

- ◆ Il prelievo dei campioni per l'esame microbiologico deve essere sempre effettuato con recipienti sterili di materiale idoneo e utilizzati solo a questo scopo, a perfetta tenuta e seguendo scrupolosamente le norme di asepsi.
- ◆ Possono essere utilizzate bottiglie sterili in materiale plastico o in vetro Pyrex o sacchetti sterili monouso.
- ◆ Contenitori di capacità di 500 mL sono sufficienti per l'analisi dei parametri microbiologici, (per le acque destinate all'imbottigliamento il volume da campionare deve essere superiore a 1 L)
- ◆ Nel caso in cui le acque da sottoporre ad analisi siano disinfettate (tracce di cloro), Bottiglie e contenitori per i prelievi devono contenere **sodio tiosolfato** al 10%, nella quantità di 1 mL per litro di acqua.
- ◆ I contenitori utilizzati per prelevare i campioni d'acqua per analisi microbiologiche non devono mai essere sciacquati all'atto del prelievo per evitare possibili contaminazioni.







## Trasporto e conservazione dei campioni

- ◆ Il campione deve essere protetto sia dalla luce (ultravioletta e visibile) sia dalle alte temperature e deve essere trasportato in laboratorio in idonee condizioni igieniche
- ◆ Tutti i campioni, dall'atto del prelievo sino all'arrivo in laboratorio, vanno conservati ad una temperatura di  $5 \pm 3$  °C
- ◆ Se il trasporto è superiore alle 8 h, la temperatura deve essere monitorata e registrata, le condizioni di trasporto devono essere fornite al momento dell'accettazione dei campioni
- ◆ Il tempo che intercorre tra prelievo e analisi dei campioni non deve superare le 24 h





## Accettazione dei campioni

- ◆ **Analisi in AC sulle acque destinate al consumo umano**
- ◆ **Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione:**
  - data e ora del campionamento
  - temperatura di conservazione
  - il tipo di acqua prelevata
  - precisa annotazione del punto in cui è stato effettuato il prelievo







## Qualità dell'acqua – Parametri microbiologici

- ◆ **Rapporti ISTISAN 2007/05 (ISS) - Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici**
- ◆ **Manuale ARPAT 2012 - Guida pratica per l'esecuzione di prove microbiologiche su alimenti e acque**
- ◆ **ISO 8199:2018 - Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture**







## Qualità dell'acqua – Procedure UOS IGA CIP

1. POS MIC 059 NOR – Microrganismi a 22°C, microrganismi a 37°C (Esame colturale – conta UFC)
2. POS MIC 060 NOR – Enterococchi (Esame colturale – conta UFC)
3. POS MIC 061 NOR – *Escherichia coli*, coliformi (Esame colturale – conta UFC)
4. POS MIC 062 NOR – *Pseudomonas aeruginosa* (Esame colturale – conta UFC)

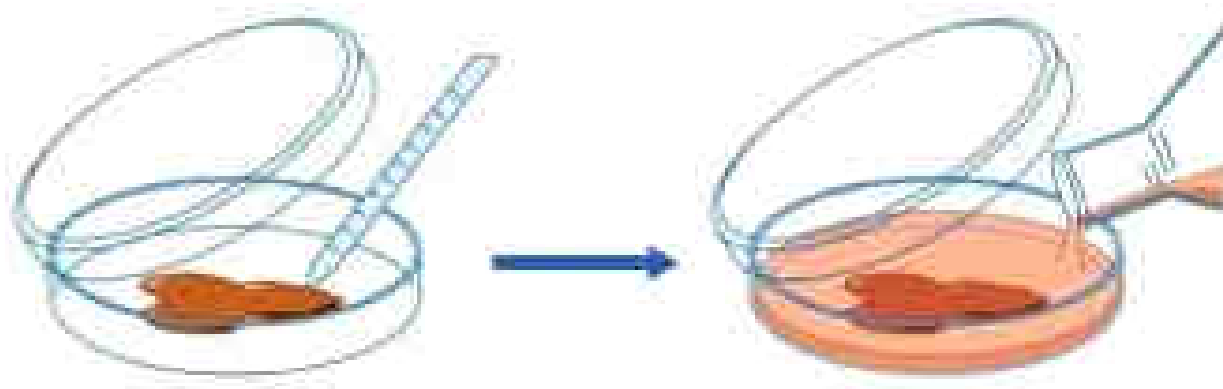




## Qualità dell'acqua – Procedure UOS IGA CIP

POS MIC 059 NOR – Microrganismi a 22°C e a 37°C

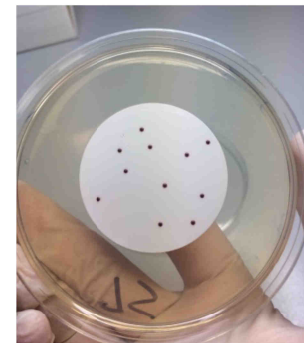
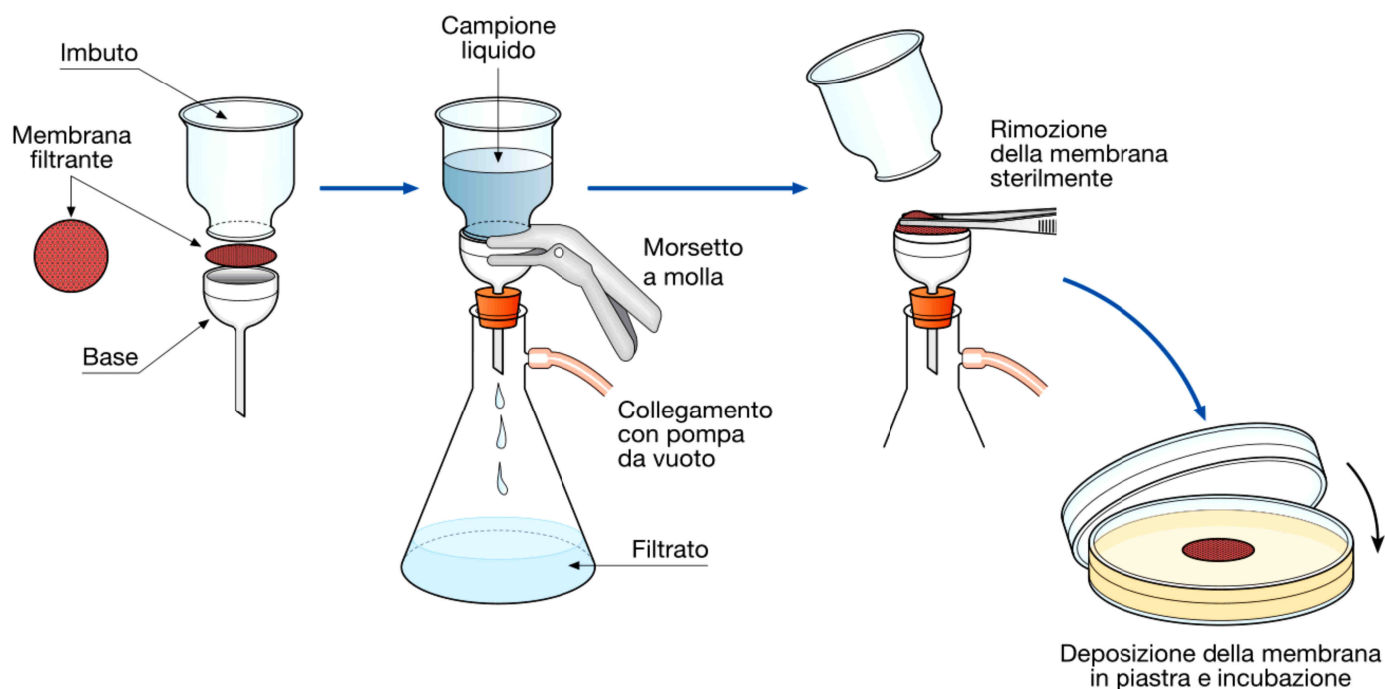
Tecnica per inclusione





- POS MIC 060 NOR – Enterococchi
- POS MIC 061 NOR – *Escherichia coli*, coliformi
- POS MIC 062 NOR – *Pseudomonas aeruginosa*

### TECNICA PER FILTRAZIONE SU MEMBRANA







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**Qualità dell'acqua**

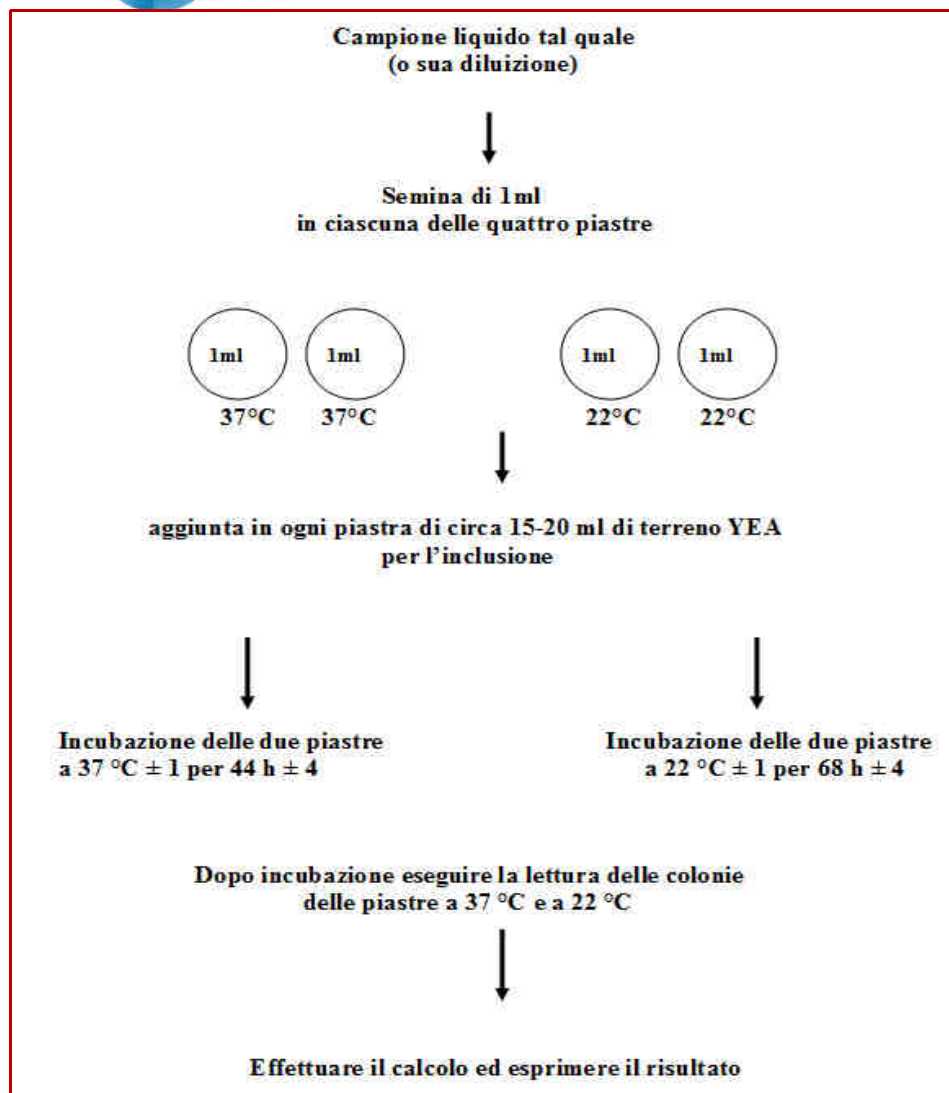
**Modalità operative**

**tecnica di**

**filtrazione su membrana**



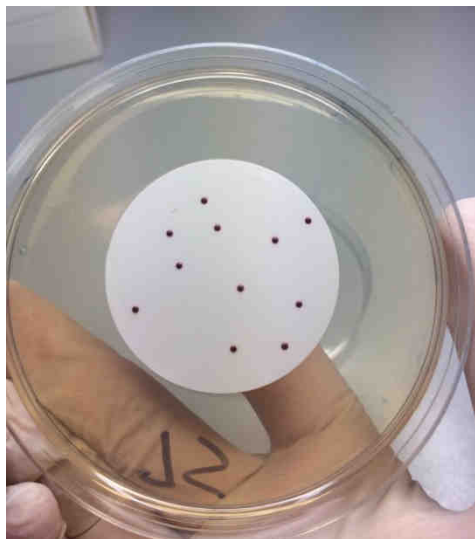






## UNI EN ISO 7899-2:2003: Ricerca ed enumerazione di enterococchi intestinali.

### Metodo di filtrazione su membrana



MISCELARE IL CAMPIONE E PREPARARE LE NECESSARIE DILUIZIONI

↓  
Filtrare il campione in esame

↓  
Trasferire la membrana su Slanetz Bartley

↓  
Incubare a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 44 ore  $\pm 4$  ore.

↓  
Contare tutte le colonie tipiche che assumono colore rosa-rosso-marrone

↓  
Conferma: trasferire la membrana su terreno ABE preriscaldato a  $44^{\circ}\text{C}$

↓  
Incubare a  $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  per 2 ore  
(se opportuno prolungare per altre 2 ore)

↓  
Le colonie confermate presentano un alone marrone - nero

↓  
Calcolare il numero confermato di Enterococchi





**UNI EN ISO 9308-1: 2017– Conta di *Escherichia coli* e batteri coliformi –  
parte 1: Metodo per filtrazione su membrana per acque contraddistinte da una ridotta flora batterica di fondo**

MISCELARE IL CAMPIONE DI ACQUA E ALLESTIRE LE NECESSARIE DILUIZIONI

↓  
Filtrare il campione in esame

↓  
Trasferire la membrana su Chromogenic Coliform Agar (CCA)

↓  
Incubare a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  per (da 21 a 24) ore

CONTEGGIO DELLE COLONIE DI  
E. COLI

Contare tutte le colonie tipiche che  
producono colore dal blu scuro al viola

↓  
CALCOLO E INTERPRETAZIONE  
DEI RISULTATI

CONTEGGIO DELLE COLONIE DI  
COLIFORMI (non E.coli)

Contare tutte le colonie sospette che  
producono colore rosso o rosa

↓  
CONFERMA DELLE COLONIE

Subcoltura su Trypton soya agar (TSA)  
delle colonie da confermare  
incubare a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  per (da 21 a 24)  
ore

↓  
Conferma tramite test dell'ossidasi

↓  
CALCOLO E INTERPRETAZIONE  
DEI RISULTATI







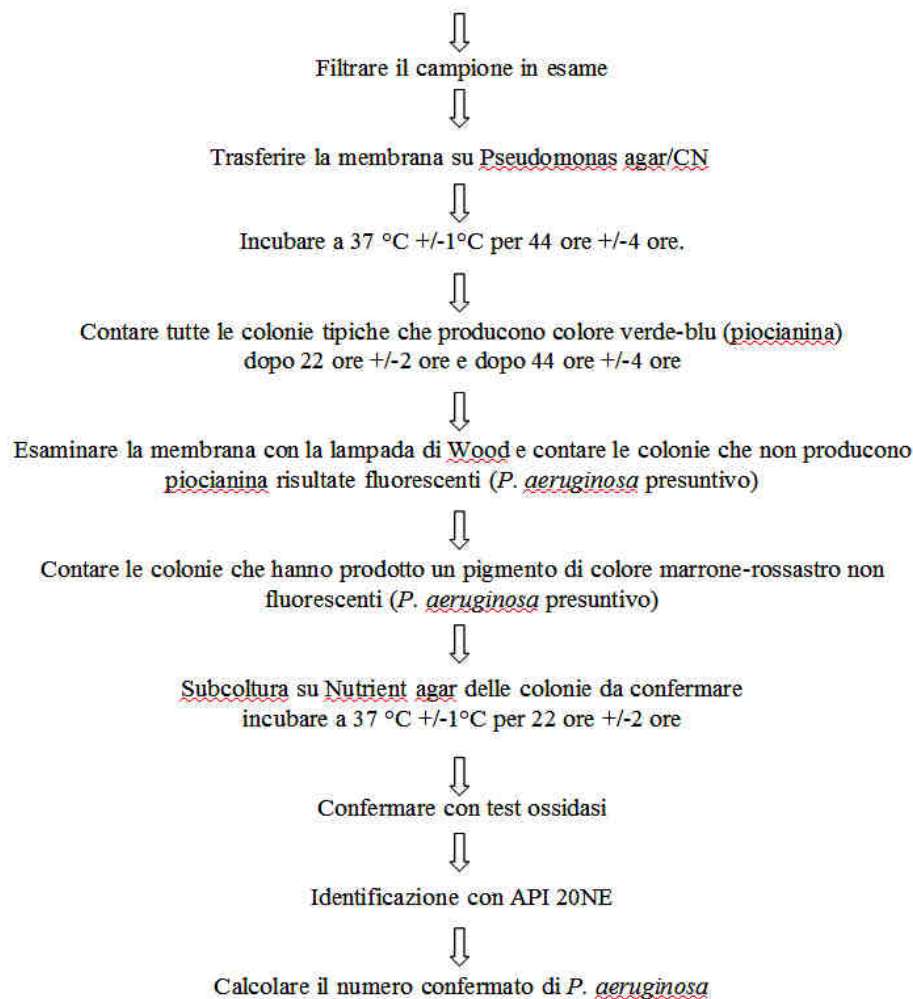
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

POS MIC 062 NOR – *Pseudomonas aeruginosa*

UNI EN ISO 16266:2008 - Ricerca e conta di *Pseudomonas aeruginosa*

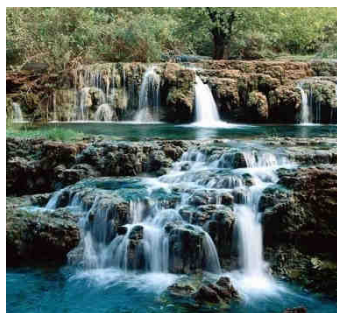
Metodo per filtrazione su membrana

MISCELARE IL CAMPIONE E PREPARARE LE NECESSARIE DILUIZIONI





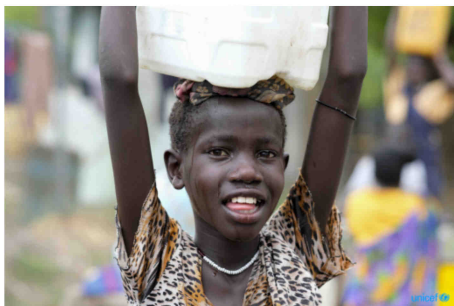
- UNI EN ISO 14189:2016 - Qualità dell'acqua - Conteggio di *Clostridium perfringens* - Metodo basato sulla tecnica della filtrazione su membrana
  - D.Lgs. 31/2001: *Cl. perfringens* (spore comprese) parametro indicatore All. I parte C
- “Tale parametro non deve essere misurato a meno che le acque provengano o siano influenzate da acque superficiali ” Valore limite: 0 ufc/ 100ml







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



**Non sprechiamo  
l'acqua!!!**

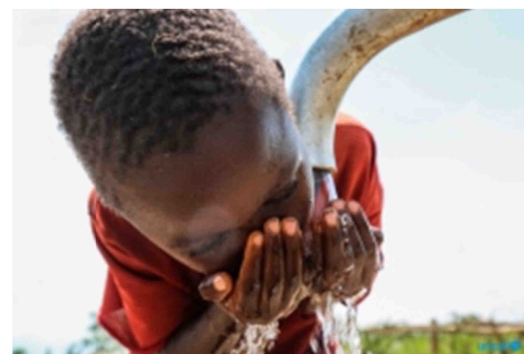


Foto tratte dal sito dell'UNICEF

