



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

ALLEGATO

**METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEI
FERTILIZZANTI**

Supplemento n. 12

1. Determinazione dello zolfo da ammonio tiosolfato
2. Determinazione dello zolfo da potassio tiosolfato
3. Determinazione del mannitolo nei fertilizzanti a base di filtrato di crema di alghe
4. Metodo per la valutazione dell'attività biostimolante di prodotti a base di filtrato di crema di alghe
5. Determinazione del contenuto in triacontanolo
6. Determinazione del contenuto in piombo nei fertilizzanti mediante spettrometria di emissione atomica a plasma accoppiato induttivamente (ICP/AES)
7. Determinazione dell'acido δ -amminolevulinico nei concimi mediante HPLC a fase inversa
8. Determinazione del tasso di respirazione di ammendanti e substrati di coltivazione
9. Determinazione del rapporto isotopico del carbonio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e dell'azoto ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

10. Determinazione del comportamento termico di un composto mediante analisi termogravimetrica (TG) e termica-differenziale (DTA)
11. Determinazione della Capacità di Scambio Cationico (CSC) di fertilizzanti a base di zeolite
12. Determinazione quali- quantitativa del contenuto in fasi cristalline ed amorfe di zeoliti mediante metodo RIETVELD
13. Determinazione della composizione chimica delle zeoliti mediante spettrometria di fluorescenza a raggi X
14. Metodo per l'enumerazione di *Escherichia coli*
15. Metodo orizzontale per la ricerca di *Salmonella* spp.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

1 Determinazione dello zolfo da ammonio tiosolfato

1. Oggetto

Il presente documento stabilisce il procedimento da seguire per quantificare lo zolfo (espresso come anidride solforica) presente sotto forma di ammonio tiosolfato.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile ai fertilizzanti a base di ammonio tiosolfato soluzione.

3. Principio

Titolazione acido-base dell'alcalinità totale, seguita da titolazione iodometrica di tiosolfati e solfiti, e titolazione finale acido-base dei solfiti.

4. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

4.1 Bilancia analitica (con precisione 0,1 mg)

4.2 Burette dispensatrici (con precisione 0,01 mL)

5. Reattivi

5.1 Acido cloridrico 0,1N: non è necessario standardizzare la soluzione.

5.2 Iodio 0,1N: è necessario standardizzare la soluzione, con f_1 si indica il fattore di correzione della soluzione di Iodio 0,1N.

5.3 Sodio idrossido 0,1N: è necessario standardizzare la soluzione, con f_2 si indica il fattore di correzione della soluzione di sodio idrossido 0,1N.

5.4 Soluzione di rosso di metile in alcol etilico (indicatore): sciogliere 0,1 g di rosso di metile in 100 mL di etanolo al 95%.

5.5 Salda d'amido neutralizzata al rosso di metile (indicatore): scaldare all'ebollizione 4,5 L di acqua distillata, aggiungere 5 g di acido salicilico, 25 g di amido solubile e mescolare fino a solubilizzazione. Raffreddare e portare a 5 L con acqua distillata. Trasferire un'aliquota di circa 200 mL di soluzione, aggiungere poche gocce di soluzione di rosso di metile (5.4) e neutralizzare con NaOH 0,5N (successivo punto 5.6) fino a viraggio.

5.6 Sodio idrossido 0,5N: non è necessario standardizzare la soluzione.

5.7 Acqua distillata o demineralizzata di qualità equivalente.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

6. Procedimento

6.1 Titolazione acido-base dell'alcalinità totale:

Pesare circa 7 - 8 g di campione con la precisione di 0,1 mg in una beuta da 250 mL ed aggiungere circa 100 mL di acqua distillata. Registrare p = peso in g del campione inizialmente prelevato. Aggiungere qualche goccia di soluzione di rosso di metile (5.4) e titolare rapidamente con acido cloridrico 0,1N (5.1) fino al primo cambiamento di colore.

6.2 Preparazione della soluzione del campione neutralizzata:

Trasferire la soluzione neutralizzata ottenuta al punto 6.1 in un matraccio tarato da 250 mL, portare a volume con acqua distillata ed omogeneizzare.

6.3 Titolazione iodometrica dei tiosolfati ($S_2O_3^{2-}$) e dei solfiti (SO_3^{2-})

Trasferire 25 mL della soluzione del campione preparata al punto 6.2 in una beuta da 250 mL ed aggiungere circa 75 mL di acqua distillata. Titolare con Iodio 0,1N (5.2) usando come indicatore salda d'amido neutralizzata (5.5) e conservare la soluzione per il successivo punto 6.4. Registrare V_1 = mL di Iodio 0,1N utilizzati nella titolazione.

6.4 Titolazione acido-base dei solfiti (SO_3^{2-})

Alla soluzione titolata ottenuta al punto 6.3 aggiungere, goccia a goccia, la minima quantità di soluzione del campione neutralizzata ottenuta al punto 6.2 necessaria a distruggere il colore blu ottenuto nella titolazione con Iodio. Aggiungere 1 o 2 gocce di soluzione alcolica di rosso di metile (5.4) e titolare quindi con sodio idrossido 0,1N (5.3) fino alla prima variazione di colore. Registrare V_2 = mL di sodio idrossido 0,1N utilizzati nella titolazione.

7. Espressione dei risultati

I risultati ottenuti sono espressi in percentuali peso/peso.

La percentuale di zolfo (espresso come SO_3) proveniente da tiosolfato è data dalle formule seguenti:

$$\% \text{ Tiosolfato di ammonio: } (NH_4)_2S_2O_3 \% = \frac{148,2 \times [(V_1 \times 0,1 \times f_1) - 0,667 \times (V_2 \times 0,1 \times f_2)]}{p}$$

dove:

V_1 = mL di Iodio 0,1N utilizzati nella iodometrica dei tiosolfati e dei solfiti

f_1 = fattore di correzione della soluzione di Iodio 0,1N

V_2 = mL di sodio idrossido 0,1N utilizzati nella titolazione acido-base dei solfiti

f_2 = fattore di correzione della soluzione di sodio idrossido 0,1N

% Zolfo (espresso come SO_3) da tiosolfato = Titolo in $(NH_4)_2S_2O_3$ % x 1,0805



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Dove:

$$148,2 = \frac{\text{P.M. (NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3 \times d \times 100}{1000} = \frac{148,2 \times 10 \times 100}{1000}$$

$$1,0805 = \frac{2 \times \text{P.M. SO}_3}{\text{P.M. (NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{2 \times 80,06}{148,21}$$

0,667 = fattore stechiometrico

d = diluizione

100 = fattore necessario per esprimere il risultato in percentuale

1000 = fattore di conversione del peso da mg a g

8. Ripetibilità e riproducibilità calcolata per un contenuto di tiosolfato di ca. il 60%

Unità di misura	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>R</i>
%	10	0,4	1,2



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

2 Determinazione dello zolfo da potassio tiosolfato

1. Oggetto

Il presente documento stabilisce il procedimento da seguire per quantificare lo zolfo (espresso come anidride solforica) presente sotto forma di potassio tiosolfato.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile ai fertilizzanti a base di potassio tiosolfato soluzione.

3. Principio

Titolazione acido-base dell'alcalinità totale, seguita da titolazione iodometrica di tiosolfati e solfiti, e titolazione finale acido-base dei solfiti.

4. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

4.1 Bilancia analitica (con precisione 0,1 mg)

4.2 Burette dispensatrici (con precisione 0,01 mL)

5. Reattivi

5.1 Acido cloridrico 0,1N: non è necessario standardizzare la soluzione.

5.2 Iodio 0,1N: è necessario standardizzare la soluzione, con f_1 si indica il fattore di correzione della soluzione di Iodio 0,1N.

5.3 Sodio idrossido 0,1N: è necessario standardizzare la soluzione, con f_2 si indica il fattore di correzione della soluzione di sodio idrossido 0,1N.

5.4 Soluzione di rosso di metile in alcol etilico (indicatore): sciogliere 0,1 g di rosso di metile in 100 mL di etanolo al 95%.

5.5 Salda d'amido neutralizzata al rosso di metile (indicatore): scaldare all'ebollizione 4,5 L di acqua distillata, aggiungere 5 g di acido salicilico, 25 g di amido solubile e mescolare fino a solubilizzazione. Raffreddare e portare a 5 L con acqua distillata. Trasferire un'aliquota di circa 200 mL di soluzione, aggiungere poche gocce di soluzione di rosso di metile (5.4) e neutralizzare con NaOH 0,5N (successivo punto 5.6) fino a viraggio.

5.6 Sodio idrossido 0,5N: non è necessario standardizzare la soluzione.

5.7 Acqua distillata o demineralizzata di qualità equivalente.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

6. Modo di operare

6.1 Titolazione acido-base dell'alcalinità totale:

Pesare circa 7 - 8 g di campione con la precisione di 0,1 mg in una beuta da 250 mL ed aggiungere circa 100 mL di acqua distillata. Registrare p = peso in g del campione inizialmente prelevato. Aggiungere qualche goccia di soluzione di rosso di metile (5.4) e titolare rapidamente con acido cloridrico 0,1N (5.1) fino al primo cambiamento di colore.

6.2 Preparazione della soluzione del campione neutralizzata:

Trasferire la soluzione neutralizzata ottenuta al punto 6.1 in un matraccio tarato da 250 mL, portare a volume con acqua distillata ed omogeneizzare.

6.3 Titolazione iodometrica dei tiosolfati ($S_2O_3^{2-}$) e dei solfiti (SO_3^{2-})

Trasferire 25 mL della soluzione del campione preparata al punto 6.2 in una beuta da 250 mL ed aggiungere circa 75 mL di acqua distillata. Titolare con Iodio 0,1N (5.2) usando come indicatore salda d'amido neutralizzata (5.5) e conservare la soluzione per il successivo punto 6.4. Registrare V_1 = mL di Iodio 0,1N utilizzati nella titolazione.

6.4 Titolazione acido-base dei solfiti (SO_3^{2-})

Alla soluzione titolata ottenuta al punto 6.3 aggiungere, goccia a goccia, la minima quantità di soluzione del campione neutralizzata ottenuta al punto 6.2 necessaria a distruggere il colore blu ottenuto nella titolazione con Iodio. Aggiungere 1 o 2 gocce di soluzione alcolica di rosso di metile (5.4) e titolare quindi con sodio idrossido 0,1N (5.3) fino alla prima variazione di colore. Registrare V_2 = mL di sodio idrossido 0,1N utilizzati nella titolazione.

7. Espressione dei risultati

I risultati ottenuti sono espressi in percentuali peso/peso.

La percentuale di zolfo (espresso come SO_3) proveniente da tiosolfato è data dalle formule seguenti:

$$\% \text{ Tiosolfato di potassio: } K_2S_2O_3 \% = \frac{190,32 \times [(V_1 \times 0,1 \times f_1) - 0,667 \times (V_2 \times 0,1 \times f_2)]}{p}$$

dove:

V_1 = mL di Iodio 0,1N utilizzati nella iodometrica dei tiosolfati e dei solfiti

f_1 = fattore di correzione della soluzione di Iodio 0,1N

V_2 = mL di sodio idrossido 0,1N utilizzati nella titolazione acido-base dei solfiti

f_2 = fattore di correzione della soluzione di sodio idrossido 0,1N

% Zolfo (espresso come SO_3) da tiosolfato = Titolo in $K_2S_2O_3$ % x 0,8413



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Dove:

$$190,32 = \frac{\text{P.M. K}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times d \times 100}{1000} = \frac{190,32 \times 10 \times 100}{1000}$$

$$0,8413 = \frac{2 \times \text{P.M. SO}_3}{\text{P.M. K}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{2 \times 80,06}{190,32}$$

0,667 = fattore stechiometrico

d = diluizione

100 = fattore necessario per esprimere il risultato in percentuale

1000 = fattore di conversione del peso da mg a g

8. Ripetibilità e riproducibilità calcolata per un contenuto di tiosolfato di ca il 50%

Unità di misura	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>R</i>
%	10	0,15	0,41



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

3 Determinazione del mannitolo nei fertilizzanti a base di filtrato di crema di alghe

1. Oggetto

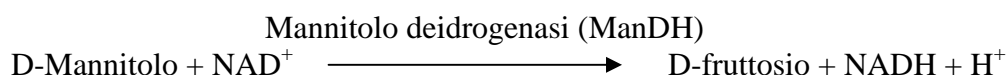
Il presente documento fissa un metodo per la determinazione del D-Mannitolo nei fertilizzanti organici.

2. Campo di applicazione

Il metodo permette la quantificazione del D-Mannitolo mediante metodo enzimatico (attraverso l'uso di un kit specifico) nei fertilizzanti liquidi a base di filtrato di crema di alghe.

3. Principio

Il contenuto in mannitolo viene determinato mediante l'uso di un kit enzimatico prodotto Megazyme Company, applicando la procedura descritta nelle istruzioni riportate unitamente al kit stesso. La determinazione enzimatica si basa sulla reazione di ossidazione del D-Mannitolo a D-fruttosio, operata dall'enzima nicotinamide-adenin dinucleotide (NAD⁺), in presenza di mannitolo-deidrogenasi (ManDH), con la formazione di nicotinamide-adenin dinucleotide ridotto (NADH):



La quantità di NADH prodotto in questa reazione è stechiometricamente correlato alla quantità di D-Mannitolo, e viene misurato attraverso l'incremento di assorbanza a 340 nm.

4. Reattivi

Durante la prova, se non è stato specificato altrimenti, usare solo reagenti di qualità analitica riconosciuta e acqua distillata o demineralizzata o di equivalente purezza.

4.1. Kit enzimatico K-MANOL 01/05 per la quantificazione del D-MANNITOLO / L-ARABITOLO (Megazyme International Ireland Ltd.).

Il kit dovrà contenere tutto il necessario per la realizzazione dell'analisi, ossia:

4.1.1. Reagente 1: Tris/HCl buffer (10 mL, 2 M, pH 9.0) e BSA (15 mg/mL), contenente sodio-azide (0.02 % m/v) quale conservante. La soluzione è stabile per circa 2 anni a 4°C.

4.1.2. Reagente 2: Soluzione di (×2) NAD⁺ (150 mg). La soluzione è stabile per circa 2 anni a -20°C.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

4.1.3. Reagente 3: Sospensione dell'enzima mannitolo-deidrogenasi (1,3 mL, 300 U/mL). La soluzione è stabile per circa 2 anni a 4°C.

4.1.4. Reagente 4: D-Mannitolo puro e soluzione di riferimento di D-Mannitolo (5 mL, 0,30 mg/mL). La soluzione è stabile per circa 2 anni a temperatura ambiente.

AVVERTENZE: Alcuni reagenti usati in questa procedura sono pericolosi; osservare particolare cura durante il loro utilizzo. Evitare il contatto con la pelle ed occhi e l'inalazione dei vapori. Si raccomanda all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

5. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

5.1 Agitatore meccanico

5.2 Provette in polipropilene

5.3 Spettrofotometro a mono o doppio raggio

5.4 Cuvette di quarzo o cuvette monouso, in materiale plastico, di cammino ottico di 1 cm

6. Preparazione del campione



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

6.1 Omogeneizzare ciascuna soluzione reagente mediante agitatore meccanico (5.1). Utilizzare acqua distillata per effettuare le diluizioni opportune. Il fattore di diluizione F dipende dalla concentrazione di D-Mannitolo attesa nel campione (vedere Tabella 1).

6.2 Preparare da un minimo di 3 ad un massimo di 5 repliche per ciascuna soluzione per la determinazione del D-Mannitolo.

6.3 Preparare la Soluzione A, contenente 0,30 mg/mL di D-Mannitolo a partire dallo stock fornito con il kit (Reagente 1 + Reagente 2). Inoltre, preparare una Soluzione B, contenente 0,5 mg/mL di D-Mannitolo a partire dal D-Mannitolo puro (Reagente 4). Tali due soluzioni verranno utilizzate come controlli positivi per il successivo dosaggio. Nella prima fase dell'analisi, sarà necessario costruire una retta di taratura dello spettrofotometro (5.3), con una pendenza costante; ciò permetterà di utilizzare la retta per le determinazioni successive, semplicemente aggiungendo alle soluzioni da analizzare i due controlli (Soluzioni A e B).

7. Procedimento

7.1 Utilizzare il Reagente 1 così come fornito dal kit. Solubilizzare il contenuto del "Reagente 2" in 3,3 mL in acqua distillata. Dividere la soluzione ottenuta in aliquote di appropriato volume e conservarle in provette di polipropilene (5.2) a -20°C tra un utilizzo e l'altro e su ghiaccio durante l'analisi. Solubilizzare il contenuto del secondo "Reagente 2" solo se espressamente richiesto. Utilizzare il contenuto del "Reagente 3" così come fornito nel kit. Utilizzare il contenuto del "Reagente 4" così come fornito nel kit.

7.2 Tarare lo spettrofotometro (5.3) alla lunghezza d'onda di 340 nm, alla temperatura di ~ 25°C. La quantità di D-Mannitolo nella cuvetta (5.4) dovrà ricadere nell'intervallo tra 2 e 75 µg (in un volume di campione tra 0,10-2,0 mL). La soluzione campione dovrà perciò essere diluita con acqua distillata al fine di ottenere una concentrazione di D-Mannitolo tra 0,05 e 0,75g/L. Il volume finale sarà di 2,32 mL. Effettuare la lettura del bianco riempiendo la cuvetta di acqua distillata e leggendo il valore di assorbanza (A).

Tabella 1.

Concentrazione stimata di D-Mannitolo (g/L)	Diluizione in acqua (mL)	Fattore di diluizione (F)
<0,75	Nessuna diluizione	1
0,75 - 7,5	1 mL campione + 9 mL acqua	10
>7,5	1 mL campione + 99 mL acqua	100



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

7.3 Utilizzare per l'analisi i seguenti volumi da inserire nelle cuvette:

	Bianco	Campione
Acqua distillata (a ~ 25°C) :	2,10 mL	2,00 mL
Campione :	-	0,10 mL
“Reagente 1” (Tris/HCl buffer) :	0,10 mL	0,10 mL
“Reagente 2” (NAD ⁺) :	0,10 mL	0,10 mL

7.4 Miscelare utilizzando una spatolina in plastica oppure mediante lento capovolgimento della cuvetta, dopo averla chiusa mediante apposito tappo o con Parafilm®.
Leggere l'assorbanza della soluzione (A1) dopo circa 2 minuti.

7.5 Iniziare la reazione enzimatica aggiungendo alla soluzione A1 il “Reagente 3”:

	Bianco	Campione
“Reagente 3” (ManDH)	0,02 mL	0,02 mL

Miscelare utilizzando una spatolina in plastica oppure mediante lento capovolgimento della cuvetta, dopo averla chiusa mediante apposito tappo o con Parafilm®.
Leggere l'assorbanza della soluzione (A2) al termine della reazione, dopo circa 4 minuti.

8. *Espressione dei risultati*

Determinare la differenza di assorbanza (A2-A1) sia per il bianco che per il campione. Sottrarre la differenza di assorbanza del bianco dalla differenza di assorbanza del campione, così da ottenere il valore di ΔA D-Mannitolo. Ciascuna replica per ciascuna soluzione viene analizzata una volta. Poiché le repliche saranno da 3 a 5, ciascuna misura sarà replicata da un minimo di 3 ad un massimo di 5 volte.

La concentrazione di D-Mannitolo viene calcolata come di seguito riportato:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad (\text{g/L})$$

dove:

V = volume finale della soluzione, in millilitri = 2,32 mL

MW = peso molecolare della sostanza da analizzare, in grammi/mole = 182,14 g/mol



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

ε = coefficiente di estinzione del NADH a 340 nm = 6300 l/mol/cm

d = cammino ottico della cuvetta, in centimetri = 1 cm

v = volume del campione, in millilitri = 0,1 mL

cioè:

$$c = \frac{2,32 \times 182,17}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A \text{ D-Mannitolo (g/L)}$$
$$= 0,6708 \times \Delta A \text{ D-Mannitolo (g/L)}$$

Se il campione è stato diluito durante la preparazione, il risultato dovrà essere moltiplicato per il fattore di diluizione F.

Il valore di delta della assorbanza (ΔA) del D-Mannitolo dovrà essere riportato con 3 cifre decimali dopo la virgola.

9. Parametri statistici

Per ogni soluzione vengono ottenute da tre a cinque misure, cioè una misura per ciascun replicato. Di conseguenza, sono presenti da tre a cinque replicati per ciascuna soluzione.

Riportare il risultato come media delle repliche effettuate, calcolando la relativa deviazione standard dalla media.

Il coefficiente di variazione può essere calcolato secondo la formula:

$$CV = (\text{scarto tipo} / \text{media}) \times 100$$

Il CV viene espresso in percentuale: conseguentemente, più basso è il coefficiente di variazione, più accurata risulta la determinazione.

La ripetibilità (r) stimata è pari a 0,34 mg/L.

Per garantire l'accuratezza del test, vengono esaminati attentamente anche i risultati ottenuti con entrambi i controlli positivi. Essendo infatti note le concentrazioni iniziali, viene effettuato un confronto con il valore ottenuto.

La ripetibilità stretta viene dimostrata nella tabella e nella figura seguenti:

Concentrazione di mannitolo rilevata in diversi campioni di filtrato di alghe

N. campione	Mannitolo (g/L)	Media (g/L)	g/L)	CV (%)
A 303450	6,84	6,809	0,042	0,615
	6,82			
	6,76			
A 312240	6,36	6,354	0,168	2,642



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

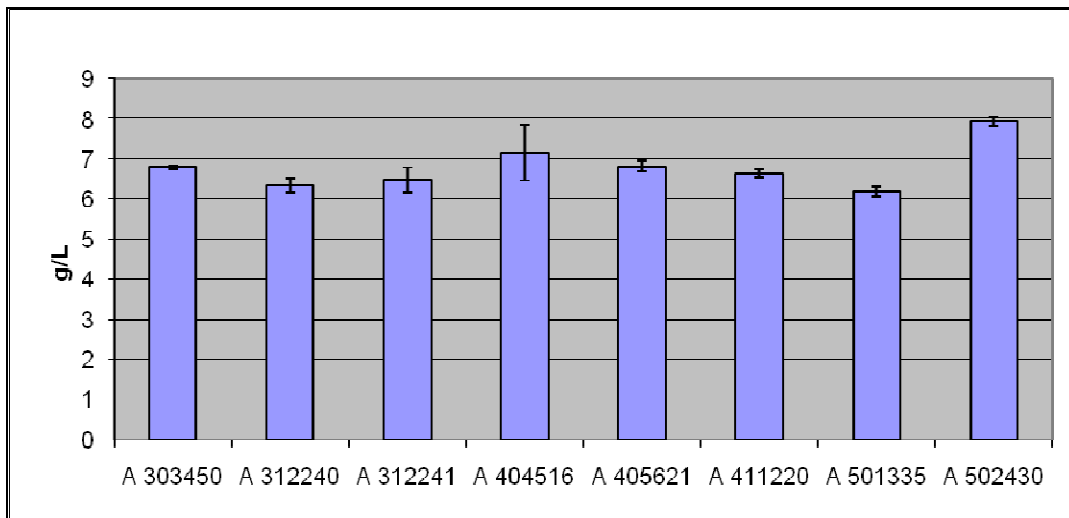
DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

	6,44			
	6,50			
	6,12			
A 312241	6,40	6,490	0,306	4,713
	6,34			
	6,28			
	6,94			
A 404516	7,37	7,164	0,691	9,652
	7,59			
	7,57			
	6,14			
A 405621	6,84	6,827	0,141	2,062
	6,84			
	6,98			
	6,64			
A 411220	6,64	6,646	0,104	1,571
	6,72			
	6,72			
	6,50			
A 501335	6,18	6,193	0,141	2,273
	6,22			
	6,36			
	6,02			
A 502430	7,81	7,953	0,115	1,452
	7,90			
	7,92			
	8,04			
	8,10			
Media	/	6,805	0,207	3,046



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI



Il saggio è lineare all'interno dell'intervallo 5-75 μ g di D-Mannitolo per campione testato.

Il limite di rilevabilità è 0,50 / 0,42 mg/L , derivante da una differenza di assorbanza di 0,015 con un volume massimo di campione pari a 2 mL.

La sensibilità del metodo ricade tra 0,1 e 0,7 mg/mL di campione liquido.

10. Note

La determinazione è ben riproducibile. Il valore di CV ottenuto è normalmente molto basso (<5%). Inoltre, la determinazione è anche riproducibile nel tempo: ciò significa che quando questa viene ripetuta in un giorno successivo al precedente, i risultati sono coerenti e la deviazione standard è molto bassa, come atteso per una sostanza *marker*. Inoltre, il metodo è rapido ed accurato. Poiché i singoli reagenti di kit diversi potrebbero presentare caratteristiche leggermente diverse tra loro (i.e., diverso pH, colore, contenuto in acidi grassi, ecc.), potrebbero essere necessari alcuni aggiustamenti così come specificato nelle istruzioni normalmente allegate ai kit d'analisi.

11. Riferimenti bibliografici

Methods of Enzymatic Analysis", Bergmeyer, H.U.(Ed.), 3rd edition, Vol VI, (Cambridge).



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

4 Metodo per la valutazione dell'attività biostimolante di prodotti a base di filtrato di crema di alghe

1. Oggetto

Il metodo descritto consiste in un biosaggio atto ad evidenziare gli effetti biostimolanti del prodotto "Filtrato di crema di alghe" sullo sviluppo di germogli di mais, mediante una prova in vaso a breve termine, in condizioni controllate.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile al filtrato di crema di alghe (CA) ed ai prodotti biostimolanti a base di estratto di alghe da *Ascophyllum nodosum*.

3. Principio

Il metodo si basa sulle proprietà biostimolanti del filtrato di crema di alghe *Ascophyllum nodosum*, in grado di influire sullo sviluppo della plantula mediante sostanze che migliorano l'assimilazione degli elementi nutritivi.

Esso consiste in una prova in vaso a breve termine (15 gg complessivi), relativa alla crescita di plantule di *Zea mais* L. utilizzando, quale substrato di crescita, la sabbia di quarzo ed aggiungendo al substrato un'aliquota stabilita di prodotto biostimolante, applicato a diluizioni elevate, sia in assenza che in presenza di soluzione nutritiva.

4. Reattivi

Durante la prova, se non è stato specificato altrimenti, usare solo reagenti di qualità analitica riconosciuta e acqua distillata o demineralizzata o di equivalente purezza.

4.1 Semi di *Zea mais* L., Classe 300;

4.2 Soluzione di CaSO_4 0,5 mM (PM = 136):

pesare 68 mg di CaSO_4 puro, solubilizzare con acqua distillata in un matraccio tarato da 1 L e portare a volume;

4.3 Soluzione di NaClO 5% v/v;

4.4 Sabbia di quarzo;

4.5 Alcool etilico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) sol. 90%;

4.6 Fosfato monopotassico (KH_2PO_4);

4.7 Nitrato di potassio (KNO_3);



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

4.8 Nitrato di calcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$];

4.9 Solfato di magnesio [$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$];

4.10 Soluzione nutritiva (NS) di Hoagland al 100% ed al 50%: preparare la soluzione nutritiva miscelando i reattivi nelle proporzioni di seguito riportate in 1 L di H_2O distillata:

<i>Hoagland solution (NS 50%)</i>	
	<i>(g/L)</i>
KH_2PO_4	0,068
KNO_3	0,253
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,590
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,246

AVVERTENZE: Alcuni reagenti usati in questa procedura sono pericolosi; osservare particolare cura durante il loro utilizzo. Evitare il contatto con la pelle ed occhi e l'inalazione dei vapori.

Si raccomanda all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

5. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

5.1 Beaker in polipropilene da 2L;

5.2 Vaschette in polipropilene di dimensioni 60 cm \times 40 cm;

5.3 Fogli di carta bibula;

5.4 Vasi in materiale plastico di diametro superiore di 6 cm;

5.5 Sottovasi in materiale plastico rigido di diametro di 12-15 cm;

5.6 Righello di almeno 20 cm, con suddivisione in mm;

5.7 Armadio termostatico, dotato di sistema di controllo del ciclo luce/buio e dell'umidità relativa;

5.8 Stufa termostatica a convezione naturale, in grado di mantenere la temperatura di prova costante entro ± 1 °C.

5.9 Bilancia analitica, con accuratezza della misura di 0,1 mg.

6. Procedimento

6.1 Preparazione delle soluzioni



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Il formulato “filtrato di crema di alghe” dovrà essere testato in assenza od in presenza di soluzione nutritiva a mezza forza:

- 0 % di soluzione nutritiva, H₂O (0% NS)
- Soluzione nutritiva al 50% in H₂O (50% NS)

Preparare le soluzioni da testare, diluendo il formulato “filtrato di crema di alghe” (CA) come di seguito riportato (concentrazioni crescenti di prodotto):

- H₂O (controllo)
- 1L_{CA} in 500 L H₂O = 2,0 mL_{CA} in 1 L H₂O
- 1L_{CA} in 300 L H₂O = 3,3 mL_{CA} in 1 L H₂O
- NS 50%
- 1L_{CA} in 500 L NS 50% = 2,0 mL_{CA} in 1 L NS 50%
- 1L_{CA} in 300 L NS 50% = 3,3 mL_{CA} in 1 L NS 50%

Ogni tesi viene replicata 3 volte. Ciascun vaso deve contenere 2 semi, perciò il numero di repliche per trattamento risulta pari 6.

Totale vasi: (6 trattamenti × 2 semi) × 3 repliche = 36 semi

6.2 Germinazione dei semi di Zea mais L. e selezione

Mettere i semi di mais in un beaker in polipropilene da 2 L (5.1) e porli sotto flusso di acqua corrente per 16 ore. Al termine del periodo di imbibizione, eliminare l'acqua e sterilizzare i semi aggiungendo circa 100 mL di soluzione NaClO 5% (4.3), agitando per qualche minuto (il lavaggio non deve superare i 5 minuti).

Porre sul fondo delle vasche in polipropilene (5.2), precedentemente pulite con alcool etilico (4.5), 3 fogli di carta bibula (5.3), e versare in ciascuna di esse un quantitativo di soluzione di CaSO₄ 0,5 mM (4.2), tale da garantire la completa imbibizione della carta, avendo l'accortezza di eliminare eventuali bolle di aria formatesi negli strati di carta bibula.

Procedere quindi alla messa *in loco* dei semi, avendo cura di non porre un numero di semi eccessivo nella vasca, tale da inibire la crescita della radichetta (mediamente, 100 semi/vasca).

Porre i contenitori così preparati, coperti da un foglio di carta di alluminio forata, in armadio termostatico (5.7) impostato a:

- temperatura: 28°C ± 0,5°C
- ciclo luce/buio: 0 ore/24 ore
- umidità relativa: 70%



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Al termine del periodo di incubazione (24-48 ore), selezionare plantule di due giorni di età per omogeneità di lunghezza radicale ($2,5 \pm 0,5$ cm), annotando la lunghezza della radice (L_i) e la relativa sigla di riconoscimento al momento del posizionamento in vaso.

6.3 Preparazione dei substrati, delle soluzioni e successiva messa in vaso delle plantule

Mettere sul fondo di ciascun vaso (5.4) un disco di carta bibula (5.3) del diametro poco superiore al fondo del vaso ed aggiungere in ogni vaso circa 120–130 mL di sabbia di quarzo (4.4). Imbibire quindi ogni substrato con una aliquota fissa (50 mL) delle soluzioni precedentemente preparate (trattamenti al punto 6).

Porre in ciascun vaso due delle plantule selezionate, annotando sul vaso stesso la lettera identificativa di ciascuna plantula. Ogni trattamento verrà replicato tre volte (2 plantule /vaso, perciò 6 plantule / trattamento).

Porre al di sotto di ciascun vaso un sottovaso di raccolta, ed aggiungere al sottovaso 100 mL della medesima soluzione utilizzata per ciascun trattamento (soluzione totale apportata per ogni vaso: 150 mL).

Per il trattamento “controllo”: aggiungere a ciascun sottovaso 150 mL di acqua distillata (4.6).

Posizionare i vasi in armadio termostatico (5.7) impostato a:

- temperatura: $28^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$
- ciclo di luce/buio: 12 ore /12 ore
- umidità relativa: 70%

verificando giornalmente lo stato idrico del sistema. Si consiglia un apporto idrico giornaliero di 50-70 mL di acqua distillata (4.6), da aggiungere direttamente al sottovaso al mattino.

Attendere 15 gg, quindi prelevare le plantule, rompendo il pane di substrato inerte. Lavare le radici mediante immersione in acqua distillata (4.6), per eliminare l'eventuale sabbia di quarzo in eccesso.

6.4 Rilevazioni

Dopo aver eliminato l'eccesso di acqua dalle radici mediante tamponamento con carta assorbente, effettuare le seguenti rilevazioni di lunghezza, mediante l'ausilio di un righello (5.6), e di peso, mediante bilancia analitica (5.10):

- lunghezza finale della radice principale (L , in cm), con la precisione di $\pm 0,1$;
- peso fresco radici, in g, con la precisione di $\pm 0,01$ g;
- altezza del germoglio di mais, con la precisione di $\pm 0,1$;
- peso fresco del germoglio, in g, con la precisione di $\pm 0,01$ g.

Porre quindi le radici ed i germogli in stufa (5.8) a 105°C per 18 ore; quindi effettuare nuovamente la rilevazione dei seguenti parametri:

- peso secco radici, in g, con la precisione di $\pm 0,01$ g;



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

- peso secco del germoglio, in g, con la precisione di $\pm 0,01$ g.

7. Espressione dei risultati

Calcolare l'allungamento radicale di ciascuna plantula, secondo la formula di seguito riportata:

$$\Delta R \text{ (cm)} = L_f - L_i$$

e registrare i parametri di peso fresco e secco della radice e del germoglio di mais.

Procedere alla elaborazione statistica dei risultati mediante ANOVA. Il prodotto mostra attività biostimolante allorquando si rilevino:

1. In assenza di soluzione nutritiva (0%NS):
 - una sostanziale uguaglianza o lieve decremento della lunghezza della radice;
 - un incremento dell'altezza del germoglio;
 - un incremento del peso fresco e secco del germoglio.
2. In presenza di soluzione nutritiva (50%NS):
 - una sostanziale uguaglianza della lunghezza della radice;
 - un tendenziale incremento del peso fresco e secco della radice;
 - un incremento della altezza e del peso fresco e secco del germoglio.

I parametri dovranno risultare statisticamente significativi rispetto al controllo ($P < 0,05$) per almeno una delle due diluizioni utilizzate (1:300 e 1:500).

8. Parametri statistici

	Unità di misura	n	s_r	r^*
Allungamento radicale (ΔR)	cm	6	1,5	4,2
Peso secco radice	g	6	0,020	0,06
Altezza germoglio	cm	6	1,7	4,8
Peso secco germoglio	g	6	0,025	0,07

* I valori riportati si riferiscono all'applicazione dell'equazione di Horwitz: $r = 2,8 s_r$

I dati statistici riportati fanno riferimento a prove eseguite su semi di *Zea mais* L, Classe 300, cultivar Suarta. Poiché le cultivar di mais vengono periodicamente rinnovate sul mercato è possibile che, pur effettuando i test su altro mais con Classe 300, si possano ottenere differenti valori di scarto tipo anche nelle medesime condizioni di prova.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

9. Note

Le differenti modalità di azione del prodotto “filtrato di crema di alghe”, in assenza od in presenza di soluzione nutritiva, rendono conto di un'attività biostimolante che determina un incremento dello sviluppo della parte aerea della plantula in condizioni di totale carenza di elementi nutritivi (0%NS), a fronte di un incremento dello sviluppo degli apparati radicali in presenza di elementi nutritivi (50%NS), al fine di migliorarne l'assorbimento.

Il metodo proposto è potenzialmente applicabile ai tutti i “Prodotti ad azione specifica – Biostimolanti” in forma fluida che contengono estratto di alghe da *Ascophyllum nodosum*, tenendo tuttavia presente che l'effetto biostimolante in tali prodotti (diversi dal filtrato di crema di alghe) si può esplicitare in maniera differente da formulato a formulato, potendo agire incrementando la lunghezza della radice principale, il relativo peso (incremento del calibro radicale), o promuovendo una crescita più rapida del germoglio di mais.

L'applicazione del metodo ad altri biostimolanti fluidi a base di alghe dovrà comunque prevedere una diluizione ad hoc che dovrà essere indicata in etichetta per il prodotto da controllare, quale “Dose di applicazione consigliata per prove analitiche”.

10. Riferimenti bibliografici

Rivera C.M., Salerno A., Trinchera A., Sequi P., Rea E.. (2010). Exploring biostimulant effect of Brassicacea plant extract: use of maize seedling development as reference bioassay. *Acta Hort. (ISHS)* 884:737-744.

Trinchera A., Rea E., Rivera C.M., Rinaldi S., Sequi P. (2009). Use of biostimulants to front nutrient deficiency. *Proceedings of 17th International Symposium of CIEC “Plant nutrient management under stress conditions”*, Cairo (Egypt), 24-27th November 2008 (El-Fouly et al, Eds.), pp. 567-573.

Trinchera A., Rivera C.M., Rinaldi S., Salerno A., Rea E., Sequi P. (2010). Granular size effect of clinoptilolite on maize seedlings growth. *Open Agriculture Journal*. Vol.4, pp. 23-30.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

5 Determinazione del contenuto in triacontanolo

1. Oggetto

Il presente prova documento fissa un metodo per la determinazione del triacontanolo nei fertilizzanti.

2. Campo di applicazione

Il metodo si applica ai fertilizzanti liquidi e solidi.

3. Principio

Il principio del metodo si basa sull'analisi gascromatografica del triacontanolo ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{28}\text{-CH}_2\text{OH}$), o alcol melissilico, con rivelatore FID previa derivatizzazione con una miscela silanizzante (trimetilclorosilano/esametildisilazano/piridina, 1:3:9).

4. Reattivi

4.1 1-Triacontanolo puro per analisi al 99,9%.

4.2 1-Eicosanolo puro per analisi al 99,9%.

4.3 Miscela silanizzante [trimetilclorosilano (TCS): esametildisilazano (HMDS) : piridina] = 1:3:9, tipo Sigma Sil A o equivalente.

4.4 Cloroformio per analisi.

4.5 Soluzione madre di triacontanolo 1000 mg/L: pesare 10 mg di triacontanolo (4.1), con l'approssimazione di 0,1 mg, solubilizzarli e portarli a volume con cloroformio (4.4) in matraccio da 10 mL.

AVVERTENZE: Alcuni reagenti usati in questa procedura sono pericolosi; osservare particolare cura durante il loro utilizzo. Evitare il contatto con la pelle e gli occhi e l'inalazione dei vapori.

Si raccomanda all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

5. Apparecchiature

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

5.1 Siringhe di precisione da 10 μL con divisioni da 0,1 μL .

5.2 Micropipette tarate da 200, 1000 e 5000 μL .



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

5.3 Imbuti separatori da 250 mL.

5.4 Gascromatografo con rivelatore FID, iniettore S/SL, equipaggiato con colonna capillare SPB-1 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm df.

5.5 Evaporatore rotante sotto vuoto a bagnomaria o altro apparecchio per evaporazione idoneo.

5.6 Omogeneizzatore Ultra-Turrax capace di raggiungere la velocità di 16000 rpm o altro dispositivo in grado di omogeneizzare adeguatamente solvente e campione (solo per fertilizzanti solidi).

5.7 Bilancia analitica con sensibilità 0,1 mg.

6 *Preparazione del campione*

Il campione deve essere preparato secondo quanto previsto dal metodo «Preparazione del campione per l'analisi» (UNI EN 1482-2).

7 *Procedimento*

7.1 Taratura del sistema di misura

Prima di procedere con l'estrazione e/o l'analisi dei campioni preparare una curva di taratura che sia composta da almeno 3 soluzioni di riferimento convenientemente scelte sulla base del contenuto presunto di triacontanolo nel campione da analizzare: ad esempio per una concentrazione di 50 mg/L preparare 3 soluzioni da 10 – 50 – 100 mg/L, o comunque in modo che il contenuto presunto di triacontanolo nel campione cada circa a metà della curva di taratura.

Ad ogni soluzione di lavoro aggiungere una quantità nota di 1-Eicosanolo scelto opportunamente in base della curva di taratura. L'eicosanolo (4.2) viene utilizzato come standard interno per la calibrazione del metodo. E' buona norma aggiungere una quantità di eicosanolo tale che la sua concentrazione sia circa al centro della curva di taratura.

Il limite inferiore del campo di misura della curva di taratura è pari a 10 mg/L. Se il contenuto di triacontanolo è presumibilmente inferiore a 10 mg/L o molto prossimo a questo valore o ancora se si desidera aumentare la sensibilità dell'analisi è necessario effettuare la silanizzazione con miscela silanizzante HMDS:TMCS:piridina, aggiungendo 50 µL per ogni mg presunto di triacontanolo.

Mettere su grafico il rapporto fra le aree del triacontanolo e dell'eicosanolo (*Area ratio*) in funzione della concentrazione di triacontanolo. Il coefficiente di correlazione della curva del triacontanolo deve essere superiore a 0,99.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Per valutare la risposta strumentale calcolare il fattore di risposta del rivelatore (Response Factor, RF) per ciascuna soluzione standard di triacontanolo preparata, come segue:

$$RF = \frac{A_s * P_{is}}{A_{is} * P_s}$$

A_s : area del picco del triacontanolo nello standard

A_{is} : area del picco dell'eicosanolo nello standard

P_{is} : peso dell'eicosanolo aggiunto allo standard, in mg

P_s : peso del triacontanolo presente nello standard, in mg

Calcolare la media dei valori ottenuti. La deviazione standard percentuale (RSD%) dell'RF non dovrebbe essere superiore al 20% del valor medio.

Dopo aver verificato la correttezza della curva di taratura come sopra descritto procedere con l'estrazione dei campioni.

7.2 Determinazione

7.2.1 Fertilizzanti solidi

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, una quantità di campione pari a 10 g su bilancia analitica (5.7) e trasferirla quantitativamente in un becher. Aggiungere cloroformio (4.4) in rapporto 5:1 con il peso del campione. Omogeneizzare con Ultra-turrax (5.6) ad almeno 12.000 rpm per 5 minuti, con pause di 15 secondi ad ogni minuto. Decantare il surnatante in un matraccio tarato da 100 mL. Ripetere l'estrazione una seconda volta con la stessa quantità di solvente e portare a volume in matraccio riunendo gli estratti. Aggiungere una quantità di 1-eicosanolo pari a quella utilizzata per la curva di taratura ed iniettare nel sistema GC.

7.2.2 Fertilizzanti liquidi

Il triacontanolo viene determinato per iniezione diretta della soluzione acquosa sulla colonna (5.4).

Il limite inferiore del campo di misura della curva di taratura è pari a 10 mg/L.

Se il contenuto di triacontanolo è presumibilmente inferiore a 10 mg/L o molto prossimo a questo valore o ancora se si desidera aumentare la sensibilità dell'analisi è necessario effettuare la silanizzazione con miscela silanizzante (4.3), aggiungendo 50 µL per ogni mg presunto di triacontanolo.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Porre in un imbuto separatore (5.3) un volume noto di campione, aggiungere un ugual volume di cloroformio (4.4) e agitare vigorosamente per almeno 2 minuti manualmente o 10 minuti mediante agitatore meccanico. Una volta decantate le fasi, trasferire quella acquosa sottostante in un secondo imbuto separatore e ripetere l'estrazione. Scartare la fase acquosa sottostante e riunire gli estratti in cloroformio. Far percolare gli estratti in beuta da 250 mL con collo a smeriglio attraverso un imbuto filtrante a setto poroso di tipo 2 o 3 riempito con sodio solfato anidro. Aggiungere lo standard interno di 1-eicosanolo in quantità nota (vedi punto 7.1). Evaporare su bagnomaria rotante a bassa pressione ad un massimo di 55 °C.

Nota 1. Il triacontanolo è sensibile al calore, pertanto è molto importante controllare la temperatura in questa fase.

Aggiungere al residuo formatosi sul fondo del pallone 50 µL di miscela silanizzante (4.3) per ogni mg di triacontanolo presunto. Un valore stimato si può ottenere calcolando il contenuto in mg di triacontanolo presenti nel volume di campione sottoposto ad estrazione.

Agitare leggermente la soluzione per sciogliere completamente il residuo, lasciar decantare e quindi iniettare nel sistema GC.

Nota 2. La soluzione di trimetilsilileteri che si è formata in questa fase dopo l'aggiunta della miscela può essere opalescente e causare la formazione di un leggero precipitato, tuttavia questo fenomeno non causa particolari problemi all'analisi GC.

Nota 3. I trimetilsilileteri sono notoriamente molto instabili e pertanto la soluzione così formata deve essere conservata in frigo fino al momento dell'analisi. Inoltre è necessario che una volta preparati siano analizzati nel più breve tempo possibile.

7.3 Condizioni Operative

INIETTORE: 250 °C

OVEN: 240 °C (hold 2 min) → rampa 5 °C/min → 310 °C (hold 15 min)

DETECTOR: base temp: 350 °C

H₂: 35 mL/min

Aria: 350 mL/min

Makeup: 50 mL/min (N₂)

CARRIER GAS He: 1.4 mL/min

Il tempo di ritenzione del triacontanolo è circa 13.9 min.

8. Espressione dei risultati



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Ricavare la concentrazione di triacontanolo dalla curva di taratura. Se il campione è un fertilizzante solido, ricavare il contenuto di triacontanolo come segue:

$$T \text{ (mg/kg)} = \frac{c * V}{P}$$

dove:

c: è la concentrazione del triacontanolo nell'estratto, in mg/L.

V: è il volume di estrazione in mL (se l'estratto è stato sottoposto ad evaporazione, considerare il volume finale dopo evaporazione).

P: è la massa del campione, in grammi.

Esprimere il risultato con una cifra decimale.

9. Ripetibilità

9.1 Ripetibilità stretta

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore di r riportato in tabella. Il valore r per la concentrazione di principio attivo nel campione pari a c, viene ricavata mediante la relazione:

$$r = 0,11 \times c + 1,96$$

9.2 Riproducibilità

Non sono disponibili dati di riproducibilità.

10. Limite di rivelabilità

La concentrazione di triacontanolo è rilevabile fino a concentrazione dello 0,1%.

11. Recupero

Il recupero per i differenti livelli di concentrazione è riportato in tabella:

Concentrazione (mg/Kg)	20	40	60	80	100
Recupero (%)	97,9	97,5	96,9	98,3	96,9

12. Riferimenti normativi



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

UNI EN 1482 – 2 Concimi e correttivi calcici e magnesiaci – Campionamento e preparazione del campione – Parte 2: preparazione del campione.

13. Riferimenti bibliografici

Determinazione del contenuto di alcoli alifatici mediante gascromatografia con colonna capillare - COI (Consiglio Oleicolo Internazionale).



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

6 Determinazione del contenuto in piombo nei fertilizzanti mediante spettrometria di emissione atomica a plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES)

AVVERTENZE: Alcuni reagenti usati in questa procedura sono pericolosi; osservare particolare cura durante il loro utilizzo. Evitare il contatto con la pelle ed occhi e l'inalazione dei vapori. Si raccomanda all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

1. *Oggetto*

Il presente metodo descrive un procedimento analitico per la determinazione del piombo estraibile in acqua regia nei fertilizzanti.

2. *Campo di applicazione*

Il metodo si applica a tutti i prodotti riportati nell'allegato 1, 2 e 3 del D.L.vo 75/2010 (concimi organici, organo-minerali, ammendanti e correttivi) per i quali occorre determinare il contenuto in piombo totale.

3. *Riferimenti normativi*

3.1 *Norme di legge*

3.1.2 D. Lgs 29 aprile 2010, n. 75 – Riordino e revisione della disciplina in materia di fertilizzanti, a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009, n. 88 - S.O. n. 106/L alla G.U.R.I. n. 121 del 26 maggio 2010;

3.1.3 DM 17 giugno 2002, Suppl. N° 7, GU n° 22 19/09/2002.

3.2 *Norme tecniche*

3.2.1 EN ISO 3696:1995, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods;

3.2.2 ISO 8466-1: Water quality-Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function;

3.2.3 ISO 11843: Capability of detection-Part 1: Terms and definition;

3.2.4 ISO 11843: Capability of detection-Part 2: Methodology in the linear calibration case;

3.2.5 CEN/TS 16319:2012-04 Fertilizers - Determination of trace elements – Determination of cadmium, chromium, lead and nickel by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) after aqua regia dissolution;



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

3.2.6 UNI EN 1482-2 - Concimi e correttivi calcici e magnesiaci — Campionamento e preparazione del campione — Parte 2: Preparazione del campione.

4. *Termini e definizioni*

Nel metodo sono impiegati solo termini largamente noti nei laboratori d'analisi dei fertilizzanti.

5. *Reazioni e interferenze*

A seconda dell'origine, le interferenze si distinguono in chimiche, fisiche, spettrali (del fondo o di riga). Le interferenze di riga si verificano per sovrapposizione (parziale o totale) tra la riga dell'elemento di interesse e la riga di un altro elemento. La sovrapposizione può essere "virtuale", in quanto dovuta a scarsa risoluzione dello spettrometro, o reale, ossia dovuta al fatto che la riga interferente cade entro la larghezza della riga di interesse. La correzione delle interferenze dovute a sovrapposizione di righe non è sempre possibile e comporta comunque un peggioramento della accuratezza della misura. Per tali motivi è sempre conveniente impiegare una riga di misura esente da interferenze.

È possibile mitigare l'effetto delle interferenze e migliorare la qualità del dato preparando le soluzioni standard di lavoro contenenti le stesse quantità degli acidi presenti nelle soluzioni delle aliquote di prova, o adottando equazioni per la correzione dell'elemento interferente, o utilizzando uno standard interno, o eseguendo il test della diluizione o il metodo delle aggiunte standard e prove di recupero.

6. *Principio*

Il metodo si basa sulle misure, mediante spettroscopia di emissione atomica al plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES), delle intensità di emissione, eseguite in maniera simultanea o in sequenza, delle radiazioni elettromagnetiche associate agli atomi/ioni contenuti nella soluzione ottenuta, con un processo di digestione acida, dall'aliquota di prova di un campione.

7. *Reattivi*

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. Le soluzioni devono essere preparate con acqua distillata o demineralizzata (grado 2 della norma UNI EN ISO 3696:1995).

7.1 Acido cloridrico (HCl) 37% p/p ($d_{20^{\circ}\text{C}} = 1,184$);

7.2 Acido nitrico (HNO₃) 65% p/p ($d_{20^{\circ}\text{C}} = 1,400$);

7.3 Acido nitrico (HNO₃) al 2% v/v

In un matraccio tarato da 1000 mL aggiungere 20 mL di HNO₃ (7.2) e portare a volume con acqua distillata.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

7.4 Soluzione standard di piombo (Pb) 1000 mg/L

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, in un matraccio da 1000 mL, 1,5985 g di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Aggiungere 10 mL del HNO_3 (7.2) e portare a volume con acqua distillata. In alternativa è possibile utilizzare delle soluzioni standard certificate.

7.5 Soluzione standard di lavoro di piombo (Pb) 10 mg/L

Prelevare con una pipetta (8.5) 5 mL della soluzione (7.4) e trasferirli in un matraccio da 500 mL. Portare a volume con HNO_3 (7.3).

7.6 Soluzioni di taratura

Prelevare, con una pipetta (8.5) 0, 1, 2, 5, 10 e 20 mL della soluzione standard di lavoro di Pb 10 mg/L (7.5) e trasferirli, rispettivamente, in sei matracci da 100 mL. Portare a volume con la soluzione di HNO_3 al 2% v/v (7.3). Le soluzioni così ottenute hanno una concentrazione in Pb rispettivamente di 0 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 mg/L. Le soluzioni di taratura se conservate in bottiglie di polietilene a +4°C sono stabili per un mese.

Le soluzioni di taratura dovranno avere una concentrazione in mg/L tale da ricadere all'interno dell'intervallo di linearità dello strumento.

8. *Apparecchiatura*

Normale attrezzatura di laboratorio, ed inoltre:

8.1 Setacci con maglie di 0,5 mm;

8.2 Recipienti di vetro da 250 mL a chiusura ermetica;

8.3 Bilancia analitica con unità di formato pari a 0,1 mg;

8.4 Piastra riscaldante;

8.5 Pipette tarate da 1 mL a 20 mL;

8.6 Filtri di carta senza ceneri; esempio Whatman di grado 589/2 o di qualità equivalente;

8.7 Refrigerante di Allhin;

8.8 Spettrometro di emissione ottica al plasma accoppiato induttivamente, ICP-AES.

9. *Preparazione del campione*

Il campione deve essere preparato secondo quanto previsto dal metodo «Preparazione del campione per l'analisi» (UNI EN 1482-2).



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

La totalità del prodotto macinato e setacciato è conservata in un recipiente di vetro (8.2) pulito. Prima della pesata di un'aliquota di prova, il contenuto del recipiente (8.2) deve essere accuratamente omogeneizzato.

10. *Procedimento*

10.1 Preparazione dell'aliquota di prova su piastra riscaldante

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 3 g di campione preparato secondo quanto riportato al punto 9 e trasferirli in una beuta con collo smerigliato della capacità di 250 mL. Aggiungere 1 mL di acqua e agitare. Aggiungere 21 mL di acido cloridrico (7.1), 7 mL di acido nitrico (7.2) e lasciare riposare la sospensione per circa 30 minuti, affinché si arresti la vivace reazione iniziale di effervescenza. Applicare alla beuta il refrigerante (8.7) e portare lentamente all'ebollizione mantenendo il riflusso per 2 ore. Assicurarsi che la zona di condensazione non superi 1/3 dell'altezza del condensatore. A mineralizzazione completata la soluzione deve risultare limpida. Lavare la canna del refrigerante (8.7) con 10 mL di acqua distillata che verrà aggiunta alla beuta contenente il campione.

Travasare quantitativamente la sospensione in un matraccio da 100 mL, raffreddare e portare a volume con acqua distillata.

Omogeneizzare accuratamente, filtrare su filtro a basso contenuto di ceneri scartando le prime frazioni filtrare e quindi sottoporre ad analisi la fase limpida.

Prelevare con una pipetta (8.5) un'aliquota della soluzione e diluire con HNO₃ al 2% v/v (7.3) fino a un volume tale che la concentrazione presunta dell'elemento comporti una risposta dello spettrometro (8.8) compresa entro l'intervallo di taratura. Filtrare le soluzioni da analizzare attraverso filtri (8.6) prima di procedere alla lettura con lo spettrometro.

10.2 Preparazione della soluzione del bianco analitico

La soluzione del bianco analitico è utilizzata per identificare possibili interferenze legate ai processi di estrazione e di filtrazione. Preparare, quindi, una soluzione contenente tutti i reattivi impiegati per la preparazione del campione in analisi aggiunti nelle medesime quantità.

10.3 Taratura del sistema di misura

Ottimizzare i parametri strumentali dello spettrometro (8.8) seguendo il manuale operativo dello strumento, iniziando a leggere quando esso è termicamente stabile utilizzando la lunghezza d'onda di 220,35 nm.

Costruire le rette di taratura verificando che i limiti di rivelabilità e gli intervalli di linearità strumentale, stabiliti, rispettivamente, seguendo ISO 11843-1,2 e ISO 8466-1, siano adeguati agli scopi descritti al punto 1. Leggere in sequenza le soluzioni di riferimento (7.6).

10.4 Determinazione



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Procedere in sequenza con la lettura della soluzione del bianco analitico e delle soluzioni preparate dalle aliquote di prova, precedentemente filtrate su filtro (8.6), avendo cura di fluxare il sistema di misura, fra due letture successive, con la soluzione di acido nitrico al 2% v/v (7.3) per circa un minuto. Ricavare le concentrazioni degli elementi di interesse, espresse in mg/L, dalle rette di taratura corrispondenti.

Effettuare il controllo sulla qualità dei dati prodotti, verificando le prestazioni strumentali attraverso l'analisi su materiali di riferimento.

11. *Calcolo ed espressione dei risultati*

Il contenuto di piombo totale si ricava dalla seguente espressione:

$$C = \frac{(A - B) \times V \times D}{P}$$

dove:

C: concentrazione del piombo nel fertilizzante espressa in mg/kg;

A: concentrazione [mg/L] dell'analita ricavata dalla retta di taratura nella soluzione del campione;

B: concentrazione [mg/L] dell'analita ricavata dalla retta di taratura nella soluzione del bianco analitico;

V: volume [L] di estratto;

D: fattore di diluizione;

P: massa [kg] dell'aliquota di prova.

12. *Parametri statistici*

I dati disponibili sulla ripetibilità (r) e riproducibilità (R) del metodo riportati in Tabella 1 riguardano prove interlaboratorio citate nel documento CEN/TS 16319:2012-04.

Tabella 1. Valore medio, limiti di ripetibilità e riproducibilità nella determinazione del piombo.

Campione	\bar{x} mg/kg	r mg/kg	R mg/kg
Superfosfato triplo	4,5	1,0	6,7
Roccia fosfatica	17,7	2,8	10,2



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

7 Determinazione dell'acido δ -amminolevulinico nei concimi mediante HPLC a fase inversa

1. Oggetto

Il metodo permette la quantificazione dell'acido δ -amminolevulinico contenuto nei concimi.

2. Campo di applicazione

Il metodo si applica ai concimi fogliari solidi e liquidi. Il campo di misura è compreso tra 0,02 e 0,2 % di acido δ -amminolevulinico nel campione.

3. Principio

Il metodo si basa sulla derivatizzazione pre-colonna dell'acido δ -amminolevulinico con acetilacetone e formaldeide, con formazione di un derivato misurabile con rivelatore a fluorescenza, dopo separazione in colonna HPLC a fase inversa.

4. Reazioni e interferenze

L'azoto ureico può interferire sulla misura. Il metodo è applicabile a campioni aventi un pH maggiore di 3,0.

5. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

5.1 Acido δ -amminolevulinico ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}\cdot\text{HCl}$) di seguito scritto come δ -ALA

5.2 Acetilacetone RPE

5.3 Alcool etilico assoluto RPE

5.4 Sodio cloruro RPE

5.5 Aldeide formica, soluzione al 37 % v/v

5.6 Alcool metilico per HPLC

5.7 Acido acetico, soluzione 1,5% v/v

Introdurre 15 mL di acido acetico glaciale in un matraccio da 1000 mL e portare a volume con acqua.

5.8 Soluzione A per la preparazione del derivato

Mescolare 15 mL di acetilacetone con 10 mL di alcool etilico, aggiungere circa 50 mL di acqua e 0,4 g di sodio cloruro. Mescolare accuratamente e portare a 100 mL con acqua.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

5.9 Soluzione B per la preparazione del derivato

Prelevare 9 mL di soluzione di formaldeide e porre in un matraccio tarato da 100 mL portando a volume con acqua.

5.10 Soluzione standard 500 mg/L di δ -ALA

Pesare 50 mg, con l'approssimazione di 0,1 mg, di δ -ALA (5.1) in un matraccio da 100 mL. Solubilizzare e portare a volume con acqua.

5.11 Soluzioni di riferimento per la taratura

Trasferire, con pipetta di precisione, in una serie di matracci tarati da 100 mL rispettivamente 0, 1, 2, 3, e 4 mL di soluzione standard di δ -ALA (5.10) e portare a volume con acqua.

Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 0, 5, 10, 15, e 20 mg/L di δ -ALA.

5.12 Soluzione eluente (fase mobile per HPLC)

In un matraccio da 1000 mL introdurre 400 mL di alcool metilico (5.6) e 600 mL della soluzione acquosa di acido acetico (5.7).

AVVERTENZE: Alcuni reagenti usati in questa procedura sono pericolosi; osservare particolare cura durante il loro utilizzo. Evitare il contatto con la pelle ed occhi e l'inalazione dei vapori.

Si raccomanda all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

6. *Apparecchiatura*

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

6.1 Provette in vetro da 10 mL dotate di tappo a vite

6.2 Apparecchiatura HPLC con rivelatore a fluorescenza

6.3 Colonna per HPLC Inertsil ODS-2, 4,6x150 mm "reversed phase"

7. *Preparazione del campione*

Il campione deve essere preparato secondo quanto previsto dal metodo «Preparazione del campione per l'analisi» (UNI EN 1482-2).

8. *Procedimento*

8.1 Preparazione della soluzione



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Pesare 1 g, con l'approssimazione di 0,001 g, di campione in un matraccio da 100 mL, sciogliere e portare a volume con acqua.

8.2 Preparazione del derivato

Trasferire nelle provette in vetro (6.1) 50 μ L del campione diluito o 50 μ L delle soluzioni di riferimento contenenti 0, 5, 10, 15 e 20 mg/L di δ -ALA. Aggiungere 3,5 mL di soluzione A (5.8) e 0,45 mL di soluzione B (5.9). Tappare le provette e posizionarle in bagnomaria bollente per 30 minuti. Trasferirle quindi velocemente in un bagno di ghiaccio. Dopo 5 minuti di raffreddamento sottoporre la soluzione ad analisi.

8.3 Condizioni operative

Fase mobile: soluzione eluente (5.12)

Velocità di flusso: 1,0 mL/min

Volume di iniezione: 10 μ L

Temperatura della colonna: 40°C

Lunghezza d'onda di rilevazione: λ di eccitazione a 363 nm e λ di emissione a 473 nm

8.4 Taratura del sistema di misura e determinazione

Tarare lo strumento con le soluzioni derivatizzate contenenti 0, 5, 10, 15 e 20 mg/L di δ -ALA. Analizzare le soluzioni derivatizzate del campione.

9. Espressione dei risultati

La concentrazione di δ -ALA nel campione in esame sarà data da:

$$\delta\text{-ALA}\% = \frac{C * 0,01}{p}$$

dove:

C: concentrazione, espressa in mg/L, di δ -ALA nella soluzione derivatizzata del campione

p: peso, espresso in grammi, del campione di concime.

Nota. Poiché tutte le soluzioni in esame (soluzioni di riferimento e soluzioni del campione) sono sottoposte al procedimento di derivatizzazione in condizioni fisse e costanti di diluizione (50 μ L diluiti a 4 mL finali), non è necessario considerare tale passaggio per la preparazione della retta di calibrazione.

10. Parametri statistici

10.1 Ripetibilità stretta



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore di r . Il valore di r , per un contenuto di δ -ALA nel campione pari a 0,1% m/m, è pari a 0,031% m/m.

10.2 Riproducibilità

Non sono disponibili dati di riproducibilità.

11. Recupero

Il recupero per i livelli di concentrazione dell'0,01% è 101%.

12. Riferimenti normativi

UNI EN 1482-2 - Concimi e correttivi calcici e magnesiaci — Campionamento e preparazione del campione — Parte 2: Preparazione del campione

13. Riferimenti bibliografici

A. Okayama, S. Fujll, R. Miura “Optimized Fluorometric Determination of Urinary δ -aminolevulinic Acid by Using Pre-Column Derivatization, and identification of the Derivative”, *clinical Chemistry*, vol. 36, n° 8, 1990.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

8 Determinazione del tasso di respirazione di ammendanti e substrati di coltivazione

1. Oggetto

Il presente documento descrive un metodo biologico (respirometrico) per la determinazione dell'attività biologica (stabilità) della sostanza organica di origine biologica in ammendanti, matrici organiche, concimi organici.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli ammendanti, con l'esclusione del letame artificiale, e ai substrati di coltivazione, vagliati ad 8-10 mm Ø; il metodo permette di analizzare una quantità di campione pari a 2 g di solidi volatili.

3. Principio

Il materiale da analizzare viene sospeso in acqua, in un contenitore a chiusura ermetica. Il tasso di respirazione viene determinato tramite la misurazione della variazione di pressione nello spazio di testa del contenitore. La CO₂ prodotta viene intrappolata da un idoneo materiale adsorbente. La misura viene condotta in condizioni definite.

In letteratura sono riportati molti metodi per la misurazione della stabilità della sostanza organica, che generalmente è definita come la sua capacità di resistere alla degradazione microbica in ambiente aerobico. La stabilità può essere determinata attraverso i) la produzione di CO₂, ii) la misurazione del consumo di O₂ oppure iii) la produzione di calore.

A maggiori livelli di stabilità corrispondono minori livelli di degradazione; la degradazione della sostanza organica (C_aH_bO_cN_d) può essere rappresentata dalla seguente equazione (ignorando i coefficienti stechiometrici):



Dove: ΔH è la produzione di calore (kJ), e X rappresenta la biomassa microbica.

La stechiometria della reazione dipende dal tipo di substrato, per il glucosio (C₆H₁₂O₆) questi sono:

- Consumo di Ossigeno: 1,07 kg di O₂ kg⁻¹ solidi volatili (SV) del substrato;
- Produzione di CO₂: 1,47 kg di CO₂ kg⁻¹ SV;
- Produzione di H₂O: 0,6 kg H₂O kg⁻¹ SV;
- Produzione di calore: 16 MJ kg⁻¹ SV.

L'equazione (1) dimostra come sia possibile desumere la degradabilità (o stabilità) dalla misura del consumo di O₂, produzione di CO₂ o di calore.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

La stabilità della sostanza organica può essere determinata solamente quando sono fornite le condizioni ottimali per la degradazione da parte della popolazione batterica e quando la stabilità della sostanza organica stessa è il solo fattore limitante l'attività respiratoria. Queste condizioni sono soddisfatte quando:

- L'intera superficie è coinvolta dall'attacco microbico, condizione soddisfatta con il campione sospeso in acqua;
- La disponibilità degli elementi nutritivi non deve essere limitante: vengono quindi forniti macro e microelementi;
- Il pH della soluzione deve essere ottimale e stabile, e viene quindi tamponato;
- Altre vie di consumo di O_2 devono essere soppresse: la nitrificazione, che rappresenta il processo più importante, viene inibito tramite l'impiego di N-allitiourea;
- Il trasferimento di massa dell' O_2 dalla fase gassosa a quella liquida non deve essere limitante (Rudrum, 2005).

Nelle mineralizzazioni condotte in suolo i principali svantaggi sono:

- la superficie non è sempre completamente esposta all'attacco microbico in quanto vi è la presenza di aggregati; inoltre vi è una forte influenza dell'umidità e della densità del sistema;
- le condizioni sopra elencate portano spesso ad una riduzione della diffusione dell'ossigeno; in questo caso, non si raggiunge il massimo dell'*oxygen uptake rate* (OUR);
- in una matrice solida risultano più problematiche le addizioni di elementi nutritivi ed altri composti.

Queste considerazioni portano alla conclusione che la determinazione in ambiente liquido permette l'aggiunta di tutti gli elementi necessari a massimizzare la risposta batterica; inoltre questo porta a ridurre in maniera considerevole i tempi necessari per l'incubazione.

4. Reattivi

4.1 Acqua distillata

4.2 Soluzione di macronutrienti contenente: NH_4Cl (4,31 g L^{-1}), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5,39 g L^{-1}), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (4,31 g L^{-1}), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,03 g L^{-1}).

4.3 Soluzione di micronutrienti contenente: $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ (2000 mg L^{-1}), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (2000 mg L^{-1}), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (500 mg L^{-1}), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (30 mg L^{-1}), $ZnCl_2$ (50 mg L^{-1}), H_3BO_3 (50 mg L^{-1}), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (90 mg L^{-1}), $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ (100 mg L^{-1}), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (50 mg L^{-1}), EDTA (1000 mg L^{-1}); od in alternativa una soluzione di micronutrienti contenente: 5,0 g L^{-1} EDDHA 6%



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

iron chelate, 1,4 g L⁻¹ MnSO₄, g L⁻¹ ZnSO₄, 4,2 g L⁻¹ Na₂B₄O₇, 0,2 g L⁻¹ CaSO₄, 0,13 g L⁻¹ Na₂MoO₄, 1 mL L⁻¹ HCl (36%).

4.4 Tampone fosfato pH 7,0. Preparare una soluzione di KH₂PO₄ 86 g L⁻¹ ed una di Na₂HPO₄·2H₂O 89 g L⁻¹, mescolarle in rapporto 1:1 per ottenere un pH = 7,0; la soluzione è stabile per 2 mesi a 3 ± 2°C.

4.5 N-alliltiourea ATU (C₄H₈N₂S) (preparare una soluzione madre contenente 4 g L⁻¹).

4.6 Soda-lime con indicatore.

4.7 NaOH (0,5 M).

4.8 HCl (0,5 M).

5. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

5.1 Bottiglie tipo Schott® da 1000-2500 mL.

5.2 Contenitore per Soda-lime (trappola CO₂) del tipo in Teflon® poroso (vedi nota 8.1) provvisto di ghiera con guarnizione per la connessione al sensore di pressione (5.4).

5.3 Ghiera forata tipo Schott GL 45.

5.4 Sensori manometrici tramite sensore di pressione provvisti di adattatore per bottiglie Schott® (Tipo OxiTop® WTW, Germany):

intervallo di lettura pressione: 500 - 1350 hPa;

accuratezza: ±1 hPa;

capacità di registrare dati ogni 2-4 ore in funzione del settaggio.

5.5 Controller e data logger dei sensori manometrici completo di cavetto di collegamento al computer per il trasferimento dei dati (Tipo Controller OC100®, WTW Germany).

5.6 Software per il trasferimento dei dati dal controller al computer.

5.7 Frigotermostato con tolleranza di ± 0,1 °C.

5.8 Agitatore orbitale regolabile.

5.9 Pipette automatiche (tipo Gilson) da 1mL a 10 mL.

5.10 Computer con un programma di calcolo (es. Excel) o calcolatrice scientifica con possibilità di calcolare l'equazione di una retta di regressione.

5.11 Bilancia elettronica con precisione almeno di 0,001 g.

5.12 Stufa da laboratorio (105 °C).



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

5.13 Muffola.

5.14 Setaccio da 8-10 mm.

5.15 Crogiuoli di quarzo.

5.16 Vetreria ed apparecchiature di laboratorio di uso comune.

6. Procedimento

6.1 Preparazione del campione

Il campione fresco va analizzato per il contenuto in Umidità e Solidi Volatili.

Porre 5-10 g di campione fresco vagliato ad 8-10 mm in crogioli di quarzo e su questi determinare l'umidità a 105 °C per 48 h. Successivamente, sullo stesso campione, determinare il contenuto in solidi volatili in muffola a 550 °C per 4 ore. Eseguire le analisi in triplo.

Una volta ottenuti i dati relativi ai SV, calcolare la quantità di campione fresco corrispondente ad un massimo di 2 g di SV e porli in una bottiglia tipo Schott da 1 litro.

6.2 Addizione delle soluzioni al campione

Al campione posto nella bottiglia aggiungere in sequenza:

- 180 mL di H₂O distillata;
- mL di soluzione tampone;
- mL di soluzione nutritiva (Macronutrienti);
- 0,2 mL di soluzione nutritiva (Micronutrienti);
- 2,5 mL di soluzione di ATU (4 g L⁻¹) per raggiungere una concentrazione finale pari a 50 mg L⁻¹.

6.3 Preparazione dell'incubazione

Una volta addizionati tutti i reagenti ed il campione si deve procedere al controllo del pH della soluzione che deve essere attorno a 7. In caso contrario, questo va aggiustato con piccole quantità di NaOH (4.7) o HCl (4.8) . Si può poi procedere alla chiusura ermetica del contenitore. Porre la trappola per la CO₂ contenente la Soda-lime all'imboccatura della bottiglia ed assicurarla con la ghiera Schott G42.

Applicare la testina OxiTop® alla trappola per la CO₂. Una volta eseguite queste operazioni attivare le testine OxiTop®, queste inizieranno a raccogliere i dati di pressione all'interno della bottiglia.

Una volta richiuse le bottiglie, l'analisi può considerarsi iniziata (Vedi Nota 9.1). Quest'ultima è standardizzata nella durata di 7 giorni.

6.4 Trasferimento dei dati



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Dopo una settimana di incubazione, i dati possono essere raccolti dalle testine OxiTop® tramite il Controller (5.5) dotato di porta ad infrarossi e trasferiti ad un computer tramite il cavetto di collegamento. Qui possono essere convertiti in un file tipo Excel tramite l'utilizzo del programma di cui al punto 5.6 e preparati per le successive fasi di calcolo.

7. Espressione di risultati

La misura della stabilità del campione avviene calcolando il COU (cumulative oxygen uptake – consumo totale di ossigeno in mmol O₂ kg⁻¹ SV) sfruttando la l'equazione di stato dei gas perfetti

$$pV = nRT$$

dove p = pressione del gas;

V = volume occupato dal gas;

n = numero di moli del gas;

R = costante universale dei gas (il cui valore varia in funzione delle unità di misura adottate per esprimere le altre grandezze nell'equazione);

T = temperatura espressa in kelvin.

Il COU (consumo totale di ossigeno, in mmol O₂ kg⁻¹ SV) viene calcolato in base alla seguente equazione:

$$\text{COU} = \frac{\Delta p}{R \cdot (273,13 + T)} \cdot \frac{V_{\text{gas}} \cdot 10000}{M \cdot \text{ST} \cdot \text{SV}}$$

dove:

COU = Cumulative Oxygen Uptake (o consumo totale di ossigeno, in mmol O₂ kg⁻¹ SV);

Δp = differenza di pressione del gas all'interno della bottiglia (mbar ovvero hPa);

R = costante universale dei gas; (83,14 L hPa K⁻¹ mol⁻¹)

T = temperatura dell'incubazione (°C);

V_{gas} = volume del gas (mL);

M = massa del campione (kg);

ST = solidi totali (% peso);

SV = solidi volatili (% peso).

Il volume del gas (V_{gas} , in mL) può essere calcolato secondo la seguente equazione:



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

$$V_{\text{gas}} = V_{\text{bottiglia}} - \frac{M \cdot ST \cdot 10000}{\rho} - V_{\text{liquido}}$$

dove:

$V_{\text{bottiglia}}$ = Volume totale della bottiglia (mL);

V_{liquido} = somma dei volumi di tutti i liquidi, in mL (acqua, soluzioni nutritive, soluzione tampone, ATU);

ρ = densità (kg m^{-3});

$$\rho = \frac{1}{\frac{SV/100}{1550} + \frac{(100-SV)/100}{2650}}$$

L'OUR (Oxygen Uptake Rate o Tasso di respirazione in $\text{mmol kg}^{-1} \text{SV h}^{-1}$) può essere calcolato dalla pendenza della retta nella regione in cui la degradazione è costante (vedi nota 9.2), in accordo con la seguente equazione:

$$OUR = \frac{COU(\Delta t)}{\Delta t}$$

o

$$\text{Tasso di respirazione} = \frac{\text{Consumo Totale di Ossigeno } (\Delta t)}{\Delta t}$$

oppure tramite il calcolo della pendenza della retta di regressione lineare, utilizzando un programma di calcolo tipo Excel.

8. Ripetibilità dei risultati

L'errore sul consumo di ossigeno per unità di tempo, valutato dalla dispersione dei dati con misure ripetute su campioni organici noti per produrre lievi interferenze e standardizzati per granulometria, è stimato in $\pm 10\%$.

9. Note

9.1 Le trappole per la CO_2 fornite dalla casa madre non sono adatte ad incubazioni con una quantità di sostanza organica così elevata (≈ 2 grammi), che producono un notevole rilascio di CO_2 . Si rende quindi necessaria l'adozione di trappole in Teflon® poroso del tipo 812S porous caps (lunghezza 62 mm; diametro 27/21.88) fornite dalla ditta Polyfluor Plastics BV www.polyfluor.nl



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

9.2 Tipicamente le incubazioni condotte con questo metodo presentano 4 fasi con riflessi sull'andamento della pressione nel sistema:

la prima fase consiste in una variazione della pressione interna dovuta alla differenza di temperatura tra il laboratorio e l'incubatore. Per evitare questo inconveniente si consiglia di porre le bottiglie ad agitare (120 giri/minuto) sull'agitatore orbitale posto all'interno dell'incubatore termostato a 25 °C, lasciarle 60-120 minuti per permettere al liquido di equilibrarsi con la temperatura dell'incubatore. Dopo questo periodo, aprire le bottiglie per qualche secondo per favorire il riequilibrio della pressione del gas presente nello spazio di testa variata a seguito della variazione della temperatura tra il laboratorio e l'incubatore.

La seconda fase consiste in un periodo di adattamento al nuovo ambiente rappresentato dall'incubazione. Tipicamente tutti i microrganismi presentano questa caratteristica, in questa fase il fattore limitante alla degradazione della sostanza organica è la crescita microbica; questo periodo può essere accorciato tramite l'impiego di un inoculo.

La terza fase è rappresentata dalla degradazione della sostanza organica del campione in cui la sua stabilità è l'unico fattore limitante; il tasso di respirazione è determinato dalla regressione lineare del COU in questo periodo.

La quarta fase, quella finale è determinata dalla possibile carenza di ossigeno nel sistema che potrebbe diventare fattore limitante alla velocità di degradazione. La quantità di ossigeno nello spazio di testa è limitata e definita dalle dimensioni della bottiglia. Ne consegue che, per evitare il raggiungimento di un ambiente anaerobico che sarebbe limitante alla degradazione, la quantità di ossigeno deve sempre essere mantenuta ad almeno il 10%.

9.3 Tipicamente 2 g SV possono essere impiegati nell'analisi: se però nei primi 3 giorni di incubazione la diminuzione di pressione risulta inferiore a 20 hPa si può aumentare la quantità di campione fino ad un massimo di 20 g di ST. Al contrario lo si può diminuire fino ad 1 g nel caso in cui nello stesso arco di tempo la diminuzione di pressione sia superiore a 50 hPa.

9.4 Molte sono le interferenze possibili con la misura del consumo di ossigeno durante l'incubazione. La più importante, quella dovuta alla possibile domanda chimica di O₂ per un eventuale processo di nitrificazione è inibita tramite l'impiego dell'inibitore specifico (ATU). Sono possibili interferenze dovute all'ossidazione di composti ridotti del Ferro e dello Zolfo, a cui per ora non è possibile fare fronte. Si sconsiglia quindi l'impiego di questa metodica a campioni che abbiano un elevato contenuto di questi composti come possono essere tipicamente i fertilizzanti organici i quali possono anche essere addizionati di composti a base di Fe e S.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

10. Riferimenti normativi

UNI EN 1687-1 - Ammendanti e substrati di coltivazione - Determinazione dell'attività biologica aerobica. Parte 1: Tasso di assorbimento dell'ossigeno (OUR)

11. Riferimenti bibliografici

American Public Health Association (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 5210 - Biochemical Oxygen Demand (BOD).

Rudrum, D.P. (2005) Innovations in composting pig manure. PhD thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, pp. 170.

Grigatti M., Dios Pérez M., Blok W.J., Ciavatta C. and Veeken A. (2007). A standardized method for the determination of the intrinsic carbon and nitrogen mineralization rates of natural organic matter sources. Soil Biol Biochem. 39(7): 1493-1503.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

9 Determinazione del rapporto isotopico del carbonio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e dell'azoto ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

1. Oggetto

Il presente documento descrive un metodo per la determinazione del rapporto isotopico del carbonio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e dell'azoto ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) nei fertilizzanti. Il metodo serve a caratterizzare il fertilizzante e/o la/e matrice/i e contribuire alla tracciabilità.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo si può applicare a tutti i fertilizzanti, solidi e fluidi.

3. Termini e definizioni

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$; $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$: rapporto isotopico di carbonio 13 e carbonio 12 o azoto 15 e azoto 14 per un dato campione. Questo valore è definito anche come R.

$\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$: contenuto in ^{13}C o ^{15}N espresso in parti per 1000 (‰) rispetto allo standard universale di riferimento.

V-PDB; $\text{N}_{2\text{air}}$: Vienna-Pee-Dee-Belemnite (PDB) e N_2 atmosferico sono i due standard universali di riferimento per le misure di rapporto isotopico del C e dell'N rispettivamente e tutte le misure vengono espresse in riferimento a questi standard. Per quanto riguarda il C questo standard è un carbonato di calcio di una belemnite Cretacea proveniente dalla formazione Pee Dee in South Carolina (USA), R_{PDB} è 0,0112372. Per quanto riguarda l'N, lo standard universale di riferimento è l' N_2 atmosferico che ha una composizione isotopica sempre costante, $R_{\text{air}} = 0,003676$.

Materiali di riferimento calibrati sugli standard universali sono disponibili all'International Agency of Atomic Energy (IAEA) di Vienna (Austria).

4. Principio

Gli isotopi di un elemento presentano piccole differenze nelle loro proprietà fisiche e chimiche a causa delle loro differenze di massa. Per gli elementi che hanno basso numero atomico, queste differenze di massa sono sufficientemente ampie da far sì che reazioni termodinamiche o processi biologici possano portare a *frazionamenti isotopici*, cioè possano cambiare la proporzione relativa dei diversi isotopi dello stesso elemento nei vari composti (reagenti e prodotti della reazione). I frazionamenti isotopici possono avvenire in sistemi all'equilibrio (equilibrium effects) e consistono in uno scambio di isotopi tra ciascuna delle due specie molecolari o fasi che partecipano ad una reazione. La reazione può essere un semplice cambio di stato o una trasformazione chimica.

I frazionamenti isotopici avvengono anche a seguito di processi incompleti e unidirezionali, quali ad esempio evaporazione, reazioni di dissociazione, diffusione e reazioni biochimiche. Questo tipo di reazioni unidirezionali (nonequilibrium effect) porta generalmente ad un arricchimento



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

preferenziale in isotopo leggero nei prodotti della reazione. In particolare, gli organismi viventi, attraverso le loro attività metaboliche producono sempre frazionamenti isotopici unidirezionali (nonequilibrium effects). Il frazionamento isotopico dovuto all'attività metabolica, comunque, può anche essere la risultante di entrambi i tipi di frazionamento dovuti a sistemi in equilibrio e reazioni unidirezionali. La composizione isotopica di una sostanza, quindi è il risultato della composizione isotopica del materiale originario e delle trasformazioni di carattere fisico, chimico e biochimico che questa subisce nel tempo.

Il contenuto in ^{13}C è misurato nel gas CO_2 che si forma in seguito a completa combustione del campione. Le principali masse di isotopomeri 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$) e 46 ($^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$) vengono ionizzate all'ingresso dello spettrometro, accelerate da un campo elettrico che produce una corrente di ioni che viene deviata da un campo magnetico. La deviazione è funzione del diverso rapporto massa/carica (m/z) delle molecole ionizzate. La corrente fornita dagli ioni di ciascun isotopomero, proporzionale all'abbondanza degli stessi, viene misurata da tre distinte Faraday cup. Il rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ è determinato dal rapporto delle intensità di m/z = 45 e m/z = 44 dopo le correzioni per la specie isobarica $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, il cui contributo può essere calcolato in funzione dell'intensità della corrente misurata per m/z = 46 e dell'abbondanza relativa di ^{18}O e ^{17}O (correzione di Craig). Analogamente il contenuto in ^{15}N è misurato nel gas N_2 che deriva da completa combustione del campione e riduzione degli ossidi di N ad N_2 . Gli isotopomeri di interesse nel caso dell'N hanno massa 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$), 29 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$). Il rapporto isotopico $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ è determinato dal rapporto delle intensità di m/z = 29 e m/z = 28. Il confronto con standard di laboratorio calibrati sugli standard universali di riferimento consente di calcolare ed esprimere il contenuto di ^{13}C e ^{15}N di un campione in termini di unità δ (‰).

5. Reagenti

I materiali e i consumabili dipendono dall'apparecchiatura utilizzata dal laboratorio. I sistemi utilizzati per la combustione del campione sono in genere basati su analizzatori elementari. Tali sistemi possono essere predisposti per l'introduzione di campioni posti in capsule metalliche sigillate o per l'iniezione di campioni liquidi.

In base al tipo di strumentazione utilizzata, si possono usare i seguenti materiali di riferimento, reagenti e consumabili:

5.1 Materiali di riferimento disponibili presso l'IAEA (a titolo indicativo):

Nome	Materiale	$\delta^{13}\text{C}$ rispetto a V-PDB	$\delta^{15}\text{N}$ rispetto a Air
IAEA-CH-6	saccarosio	- 10,4 ‰	
IAEA-Acetanilide	Acetanilide	- 29,66 ‰	



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

IAEA-GA	acido glutammico	- 20,85 ‰	- 6,07 ‰
USGS40	acido L-glutammico	-26,39 ‰	-4,5 ‰
IAEA-N1	Solfato di ammonio		0,43 ‰
IAEA-N2	Solfato di ammonio		20,32 ‰
IAEA-NO-3	Nitrato di potassio		4,7 ‰

5.2 Standard di lavoro

5.2.1 Biossido di carbonio (CO₂) di idonea purezza, come gas di riferimento secondario per la misurazione del $\delta^{13}\text{C}$.

5.2.2 Azoto (N₂) di idonea purezza, come gas di riferimento secondario per la misurazione del $\delta^{15}\text{N}$.

5.2.3 Standard di lavoro e di controllo interni con valori di riferimento di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ calibrati rispetto ai materiali di riferimento internazionali.

5.3 Materiali di consumo

Di seguito si riporta un elenco indicativo relativo ai consumabili per i sistemi a flusso continuo.

5.3.1 Rame ossido (CuO) per microanalisi, granulare.

5.3.2 Rame ridotto (Cu) per microanalisi, in spire o fili.

5.3.3 Ossido di cromo (III) per microanalisi, granulare.

5.3.4 Magnesio perclorato (Mg(ClO₄)₂) per microanalisi, granulare.

5.3.5 Ossigeno (O₂) gassoso con purezza minima pari a 99,995%.

5.3.6 Elio (He) gassoso con purezza minima pari a 99,999%.

5.3.7 Capsule di stagno monouso, dimensione 5 (i.d.) x 8 (h) mm o simili.

5.3.8 Lana di quarzo.

5.3.9 Chromosorb (materiale assorbente inerte per la determinazione su campioni fluidi).

5.3.10 Spatolina a cucchiaino.

5.3.11 Pinzette.

5.3.12 Pipetta Pasteur.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Nota: il laboratorio può utilizzare differenti materiali e/o reagenti, in funzione della propria strumentazione, purché siano garantite le prestazioni minime richieste dal presente metodo.

6. Apparecchiatura

6.1 Spettrometro di massa per la determinazione dei rapporti isotopici (IRMS).

Lo spettrometro di massa isotopico consente la determinazione dei contenuti relativi di ^{13}C della CO_2 e ^{15}N dell' N_2 con una accuratezza interna, espressa come scarto tipo di 10 misure dello stesso campione di gas standard, non superiore a 0,08 ‰.

Lo strumento deve essere equipaggiato con un sistema di flusso continuo che trasferisca nello spettrometro di massa la CO_2 e/o l' N_2 provenienti dalla combustione dei campioni e degli standard di lavoro.

6.2 Analizzatore elementare

L'analizzatore elementare, attraverso una combustione a secco in presenza di ossigeno, consente di convertire quantitativamente il C e l'N del campione in CO_2 ed N_2 , di eliminare gli altri prodotti della combustione compresa l'acqua e di separare i due gas formati.

L'analizzatore a sua volta può essere configurato con un autocampionatore per solidi o per liquidi, il primo è comunque preferibile in quanto consente l'analisi di entrambe le tipologie di campioni, solidi e liquidi.

6.3 Bilancia di precisione con unità di formato minima di 10 µg.

7. Preparazione del campione

7.1 Preparazione del campione solido

Pesare sulla bilancia di precisione (6.3) un'aliquota di campione seccato all'aria e finemente macinato (< 250 micron) nelle capsule di stagno (5.3.7).

Chiudere la capsula con le pinzette (5.3.11) avendo cura di non romperla e di non toccarla con le mani.

Prendere il peso quando la capsula è chiusa.

7.2 Preparazione del campione fluido

Mettere nella capsula di stagno un po' di Chromosorb (5.3.9) in modo da avere sul fondo della capsula uno strato di materiale inerte. Fare la tara della capsula con il Chromosorb. Con la pipetta Pasteur o analoga mettere una piccola aliquota di campione fluido nella capsula.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Chiudere la capsula con le pinzette (5.3.11) avendo cura di non romperla e di non toccarla con le mani.

Nota: La quantità di campione da pesare varia in genere da poche centinaia di microgrammi a pochi milligrammi a seconda del contenuto presunto di C e/o di N del campione. Può essere utile a questo fine fare qualche analisi di prova per definire la quantità ottimale di campione da pesare in modo che il segnale della CO₂ o dell'N₂ nello spettrometro sia il più possibile simile a quello del gas standard di riferimento.

E' possibile iniettare il campione con siringhe, eventualmente tramite autocampionatore per liquidi, rispettando i criteri sopra riportati.

7.3 Pulizia degli strumenti da lavoro

Lavare accuratamente le pinzette e la spatolina tra un campione e l'altro con acqua distillata ed etanolo.

7.4 Preparazione del bianco

Il bianco è costituito da una capsula vuota.

7.5 Preparazione dello standard

Pesare sulla bilancia di precisione un adeguato numero di capsule contenenti lo standard di lavoro e di controllo interni (5.2.3), in modo da avere una quantità di C e/o N dello standard tale da fornire un segnale il più possibile simile a quello del campione.

8. Procedura di analisi

8.1 Verifiche strumentali

- Per una combustione ottimale del campione, regolare la temperatura dei forni dell'analizzatore elementare e i flussi di elio e ossigeno gassosi.
- Avviare una sequenza di analisi di almeno 9/10 iniezioni di gas CO₂ o N₂ standard di lavoro. Lo scarto tipo essere inferiore a 0,15 ‰;
- Verificare anche l'efficacia del flash di combustione dell'analizzatore, mediante l'analisi di una capsula vuota;
- Prima di iniziare le misurazioni sui campioni, verificare il sistema servendosi dei materiali di lavoro e di controllo interni.

8.2 Preparazione della sequenza



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

La procedura di analisi è gestita da software. La sequenza di campioni da analizzare viene impostata sul software di gestione dello spettrometro di massa isotopico secondo il criterio che prevede, nell'ordine, un bianco iniziale, almeno due standard, i campioni e almeno altri due standard alla fine della sequenza. Di ogni campione vengono analizzate almeno 3 repliche.

9. Accuratezza della misura ed espressione dei risultati

9.1 Accuratezza della misura

Tenuto conto che, durante la misurazione in linea, si possono verificare piccoli scostamenti dovuti alla variazione delle condizioni strumentali, il laboratorio predispone adeguate procedure di analisi per assicurare l'accuratezza della misura e la riferibilità agli standard di riferimento internazionale, anche attraverso l'utilizzo degli standard di lavoro interni e di controllo.

Nota: A titolo esemplificativo si riporta la seguente procedura. I valori sperimentali di $\delta^{13}\text{C}$ o $\delta^{15}\text{N}$ dei campioni devono essere corretti in base alla differenza tra il valore dello standard di lavoro e il suo valore reale, precedentemente tarati rispetto al V-PDB per confronto con uno dei materiali di riferimento internazionali. In tal caso, la correzione da apportare ai campioni varia in maniera lineare rispetto allo scostamento del valore dei due standard di lavoro che precedono e seguono i campioni stessi. Occorre misurare il riferimento di lavoro all'inizio e alla fine di ogni serie di campioni. Si può poi calcolare una correzione per ogni campione tramite un'interpolazione lineare tra i due valori (la differenza tra il valore assegnato allo standard di lavoro e le misure dei valori ottenuti).

9.2 Espressione dei risultati

Il valore dei rapporti isotopici, calcolato dal software, ed eventualmente corretto come sopra indicato, viene espresso come unità delta per mille (δ ‰).

Nel caso del C:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰} = [(R_{\text{campione}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$$

R_{campione} e R_{standard} è il rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ rispettivamente del campione e dello standard. Lo standard universale di riferimento per il C è la Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB).

Nel caso dell'N:

$$\delta^{15}\text{N} \text{ ‰} = [(R_{\text{campione}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$$

Lo standard universale di riferimento per l'N è l' N_2 atmosferico (N-air).

Verificare, per ogni campione, che siano soddisfatti i requisiti di ripetibilità (10). Il risultato finale di un dato campione è il valore medio delle 3 repliche.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Nei calcoli i valori grezzi di δ vengono impiegati con le tre cifre decimali fornite dallo strumento, mentre il risultato finale viene espresso con una cifra decimale.

10. Ripetibilità

La ripetibilità delle misure, espressa come differenza assoluta tra due singoli risultati sullo stesso materiale di prova da un operatore utilizzando la stessa apparecchiatura nell'intervallo di tempo più breve possibile, non deve essere maggiore del valore di r , di seguito riportato:

$$r = 0,3\text{‰ per il } \delta^{13}\text{C}$$

$$r = 0,5\text{‰ per il } \delta^{15}\text{N}$$

Nota: il laboratorio tiene conto dei valori di ripetibilità sopra definiti, nel valutare la precisione ottenuta, per ciascun campione, a seguito della ripetizione delle tre repliche. Il confronto può essere effettuato attraverso il test F di Fisher o altro test statistico equivalente.

11. Bibliografia

T. B. Coplen (1994). Reporting of stable hydrogen, carbon and oxygen isotopic abundances. *Pure Applied Chemistry* **66**: 272-276.

Francioso O., Montecchio D., Gioacchini P. and Ciavatta C. (2005). Thermal analysis (TG-DTA) and isotopic characterization (^{13}C - ^{15}N) of humic acids from different origins. *Applied Geochemistry* **20**: 537-544.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

10 Determinazione del comportamento termico di un composto mediante analisi termogravimetrica (TG) e termica-differenziale (DTA)

1. Oggetto

Il presente documento descrive il metodo per valutare il comportamento termico di fertilizzanti a base organica mediante l'analisi termogravimetrica (TG) e termica-differenziale (DTA). Il metodo serve a caratterizzare il fertilizzante e/o la/e matrice/i e contribuire alla tracciabilità.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo si applica ai fertilizzanti a base organica di cui al D.Lgs. 29 aprile 2010, n. 75 (Allegati 1, 2, 3, 4, 5, e 6).

3. Principio

Durante analisi simultanea TG-DTA il campione viene riscaldato in atmosfera controllata (aria dinamica) fino a 800 °C. Tutte le variazioni ponderali e relative variazioni delle proprietà termiche del materiale vengono registrate. L'analisi termica differenziale misura la differenza di temperatura T che si instaura tra un campione ed un riferimento inerte, al variare della temperatura nel tempo. Si ottiene quindi una curva riportando la differenza di temperatura sulle ordinate e la temperatura sulle ascisse. In corrispondenza di una trasformazione chimico-fisica nel campione si registra un picco. La DTA è in grado di fornire informazioni qualitative sui processi chimico-fisici che hanno luogo nel campione: temperatura alla quale avvengono eventi termici e relativa natura dell'evento termico (endotermico o esotermico). La TG è in grado di fornire informazioni quantitative sui processi chimico-fisici che hanno luogo nel campione durante il riscaldamento.

4. Apparecchiatura

4.1 Crogiuoli in allumina

4.2 Bilancia di precisione con accuratezza della misura di 0,1 mg

4.3 Spatolina a cucchiaio

4.4 Pinzette

4.5 Materiale di riferimento (es. caolino calcinato)

4.6 Strumento TG-DTA simultaneo

5. Preparazione del campione

5.1 Preparazione del campione



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Pesare sulla bilancia di precisione (4.2) un'aliquota di campione seccato all'aria e finemente macinato ($< 250 \mu\text{m}$) nel crogiuolo di allumina (4.1). La quantità di campione da pesare varia in genere da pochi milligrammi (2 -10 mg) fino a 30 mg circa a seconda del contenuto presunto di C organico del campione (quando è maggiore il contenuto di sostanza organica, risulta maggiore la variazione di entalpia della reazione esotermica tra 200 e 600 °C).

Non toccare con le mani i crogiuoli.

5.2 Preparazione del materiale di riferimento

Pesare un'aliquota di caolino calcinato circa uguale a quella del campione in un crogiuolo e posizionarlo nella posizione di riferimento nella bilancia dello strumento.

6. Procedura di analisi

6.1 Preparazione dell'analisi

La procedura di analisi è gestita da software. Importante è inserire i valori precisi della pesata del campione fatta precedentemente su bilancia di precisione. Parametri da inserire: intervallo di temperatura di riscaldamento ($30\div 800^\circ\text{C}$), velocità di riscaldamento ($10^\circ\text{C min}^{-1}$), atmosfera controllata (aria 8 L h^{-1}).

7. Espressione dei risultati

Il valore della perdita di peso del campione durante il riscaldamento calcolato dal software, viene espresso come variazione di peso percentuale in funzione del tempo.

Il tracciato DTA viene registrato in $\mu\text{V s mg}^{-1}$.

Tmax = Temperatura massima del picco.

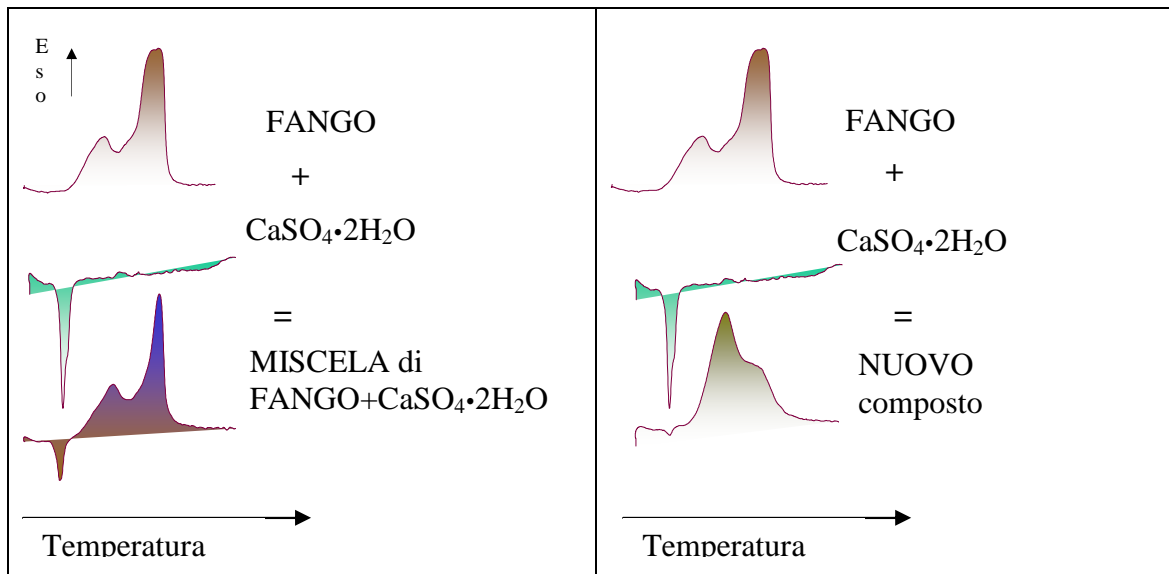
Esempio:

Miscela	Reazione
composti organici + composti inorganici	composti organici + composti inorganici



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI



8. Ripetibilità

Lo scarto tipo di ripetibilità stretta dell'analisi DTA è di ± 1 °C, mentre per i dati TG è di $\pm 0,01$ mg.

E' opportuno sottolineare che la ripetibilità dell'analisi è strettamente correlata all'omogeneità del campione analizzato. Pertanto deve essere posta grande attenzione alla fase di prelevamento e di preparazione del campione prima dell'analisi strumentale.

9. Riferimenti bibliografici

Francioso O., D. Montecchio, P. Gioacchini and C. Ciavatta. 2005. Thermal analysis (TG-DTA) and isotopic characterization (¹³C-¹⁵N) of humic acids from different origins. Applied Geochemistry 20: 537-544.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

11 Determinazione della Capacità di Scambio Cationico (CSC) di fertilizzanti a base di zeolite

1. Oggetto

Il presente metodo stabilisce il procedimento da seguire per definire la capacità di scambio cationico (CSC) di fertilizzanti a prevalente (> 50%) contenuto in zeolite (zeolititi).

2. Campo di applicazione

Il presente metodo, di consolidato e diffuso utilizzo in campo mineralogico, è idoneo per definire la reale capacità di scambio cationico (CSC) di fertilizzanti minerali a prevalente (> 50%) contenuto in zeolite (zeolititi) al fine di poterne valutare le potenzialità ammendanti nei confronti di suoli e substrati di coltivazione.

3. Termini e definizioni

Zeolite: allumo-silicato idrato di elementi alcalini (essenzialmente Na e K) e alcalino-terrosi (essenzialmente Ca e Mg), strutturalmente appartenente ai tetrosilicati.

Zeolitite: roccia a prevalente (> 50%) contenuto in zeolite derivante dalla diagenesi di piroclastiti (tufi, ignimbriti) attraverso un processo di dissoluzione dell'originario vetro vulcanico e precipitazione delle fasi zeolitiche.

4. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'esecuzione del processo di scambio cationico utilizzando come catione scambiatore l' NH_4^+ , catione a spiccata selettività per le zeoliti e non presente nella zeolite allo stato naturale. Il valore di CSC espresso in meq/100g o cmol/Kg viene calcolato dalla quantità di cationi (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+) ceduti dalla zeolite per scambio con l' NH_4^+ della soluzione a contatto.

Le diverse fasi in cui si articola il metodo sono:

- preparazione di un campione rappresentativo del fertilizzante;
- eluizione di un'aliquota del campione da parte di soluzione di NH_4^+ 1N;
- determinazione della concentrazione (mg/L) di Na, K, Ca e Mg nel liquido eluito;
- calcolo della CSC sulla base delle quantità totali (mg/L) di cationi ceduti durante l'eluizione.

AVVERTENZE - Le persone incaricate di eseguire questo metodo di prova devono avere familiarità con la normale pratica di laboratorio chimico. Questo metodo non affronta i problemi di sicurezza associati al suo impiego in quanto inesistenti. Resta a carico dell'utilizzatore stabilire buone pratiche per la sicurezza, per la salute e per garantire la conformità alla legislazione italiana.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

5. *Reattivi*

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua deionizzata e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

5.1 NH_4Cl ad elevato grado di purezza (ACS – RPE)

6. *Apparecchiature*

6.1 Spettrofotometro ad assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma (FAAS) operante alle seguenti condizioni sperimentali: fiamma aria-acetilene. Ca: $\lambda = 422,7$ nm; fenditura: 0,7 nm; range di concentrazione scala: 0,5 –9,0 ppm. Mg: $\lambda = 285,2$ nm; fenditura: 0,7 nm; range di concentrazione scala: 0,3 –3,0 ppm. K: $\lambda = 769,9$ nm; fenditura: 0,7 nm; range di concentrazione scala: 0,5 –10,0 ppm. Na in emissione: $\lambda = 589,0$ nm; fenditura: 0,2 nm; range di concentrazione scala: 0,5 –10,0 ppm.

Per tutti gli elementi le scale sono state ottenute per diluizione da soluzioni standard a titolo garantito (1000 mg/L) per assorbimento atomico con aggiunta di 1% di HNO_3 e, per Ca e Mg, di 10% di soluzione di Esaboruro di Lantanio (316 g in 1l di acqua deionizzata) e per Na e K di 10% di soluzione di CsCl (13 g in 1L di acqua deionizzata). Il controllo viene effettuato mediante gli standard internazionali utilizzati GH e GA [1]

6.2 Gooch con setto poroso a porosità 2

6.3 Bilancia microanalitica con precisione alla quinta cifra decimale relativa al grammo

7. *Preparazione del campione*

Frantumare manualmente o meccanicamente il campione fino ad ottenere un campione rappresentativo di granulometria compresa fra 0,20 e 0,125 mm.

8. *Procedimento*

Pesare 1 g di campione di granulometria compresa fra 0,20 e 0,125 mm con la precisione di 0,1 mg, porlo in un Gooch (6.2), e eluirlo con una soluzione 1N di NH_4^+ ottenuta da acqua deionizzata e NH_4Cl (5.1) (53,5 g in 1L di acqua deionizzata) con portata di 1L/h. Su ogni litro di liquido eluito viene determinata la concentrazione (mg/L) di Na, K, Ca, Mg mediante spettrofotometro ad assorbimento atomico (AAS) (6.1). Continuare l'eluizione sino a quando la concentrazione dei singoli cationi (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+) nell'ultima frazione di litro non è inferiore a 0,5 mg/L. La capacità di scambio cationico (CSC) espressa in meq/100g o $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$ è data dalla sommatoria dei mg di singoli cationi (Ca, Mg, K, Na) rapportati al loro peso equivalente ceduti e misurati nei successivi litri eluiti (1° L, 2° L, ecc.):



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

$$\left[\frac{\sum \text{mg Ca } 1^{\circ}\text{L}+2^{\circ}\text{L}+\dots}{20.04} + \frac{\sum \text{mg Mg } 1^{\circ}\text{L}+2^{\circ}\text{L}+\dots}{12.16} + \frac{\sum \text{mg K } 1^{\circ}\text{L}+2^{\circ}\text{L}+\dots}{39.1} + \frac{\sum \text{mg Na } 1^{\circ}\text{L}+2^{\circ}\text{L}+\dots}{22.991} \right] \times 100$$

9. Limite di rivelabilità e quantificazione

Limite minimo 15 cmol₍₊₎/kg; limite di quantificazione 30 cmol₍₊₎/kg.

10. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore di r riportato in tabella.

Tabella. Valori medi, limiti di ripetibilità

\bar{x} (%)	r (%)
162,3	8,6
183,5	10,2
204,3	15,2

11. Riferimenti bibliografici

[1] Geostandards Newsletter. Special Issue of Geostandards Newsletter. Vol. XVIII, July 1994, Vandoeuvre-les-Nancy, France (K. Govindaraju, ed.), 1-1581.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

**12 Determinazione quali- quantitativa del contenuto in fasi cristalline ed amorfe di zeolititi
mediante metodo RIETVELD**

1. Oggetto

Il presente metodo stabilisce il procedimento da seguire per determinare il contenuto quali-quantitativo delle fasi cristalline, e delle eventuali fasi amorfe associate (vetro), nei fertilizzanti a prevalente (> 50%) contenuto in zeolite (zeolititi).

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione della reale concentrazione percentuale delle fasi cristalline ed amorfe di fertilizzanti prodotti a partire dalle rocce in generale e, nel caso specifico, di quelle a prevalente contenuto in zeolite (zeolititi).

3. Riferimenti normativi

UNI EN 13925-1, -2, -3

4. Termini e definizioni

Zeolite: allumo-silicato idrato di elementi alcalini (essenzialmente Na e K) e alcalino-terrosi (essenzialmente Ca e Mg), strutturalmente appartenente ai tetrasilicati.

Zeolitite: roccia a prevalente (> 50%) contenuto in zeolite derivante dalla diagenesi di piroclastiti (tufi, ignimbriti) attraverso un processo di dissoluzione dell'originario vetro vulcanico e precipitazione delle fasi zeolitiche.

5. Principio del metodo

Il metodo Rietveld consiste nella simulazione del diffrattogramma da materiale policristallino ("polvere") misurato attraverso quello calcolato a partire da: i) modello strutturale per ciascuna delle fasi cristalline presenti nella miscela (posizione ed intensità dei picchi di diffrazione); ii) funzioni di profilo per descrivere il contributo dato dalla microstruttura del campione e dallo strumento all'allargamento dei picchi; iii) funzioni analitiche per descrivere l'intensità del fondo. Il miglior accordo tra diffrattogramma calcolato e misurato viene ottenuto attraverso tecniche di raffinamento ai minimi quadrati. In particolare, nell'analisi quantitativa modale delle fasi tramite metodo Rietveld (QPA-Rietveld) le frazioni in peso delle diverse fasi presenti in una miscela polifasica sono ricavate dal fattore di scala raffinato per ciascuna di esse, con l'assunzione che tutte le fasi siano cristalline e descrivibili con un modello strutturale appropriato. Tale approccio consente di valutare in modo altamente attendibile la concentrazione modale delle fasi nelle rocce senza aggiunta di uno standard interno. Nel caso in cui la roccia contenga una frazione amorfa ai



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

raggi X (o non descrivibile da un modello appropriato), il metodo Rietveld può essere applicato con successo aggiungendo alla miscela una quantità nota di standard interno. In questo modo è possibile determinare anche il contenuto della stessa fase amorfa.

Le diverse fasi in cui si articola il metodo sono:

1. frantumazione manuale o meccanica del campione di fertilizzante a base di zeolite sino ad ottenere una polvere impalpabile ($< 50 \mu\text{m}$) ed inserimento dello standard interno;
2. esecuzione di un diffrattogramma di polveri;
3. interpretazione qualitativa del diffrattogramma di polveri;
4. analisi quantitativa modale delle fasi cristalline tramite simulazione del diffrattogramma di polveri attraverso specifico programma di calcolo.

I principi generali della diffrattometria a raggi X da materiale policristallino (polveri), le procedure e la strumentazione sono oggetto della norma UNI EN 13925-1, -2, -3.

AVVERTENZE - Le persone incaricate di eseguire questo metodo di prova devono avere familiarità con la normale pratica di laboratorio chimico, con le nozioni di cristallografia strutturale e con le tecniche diffrattometriche ai raggi X. Questo metodo non affronta i problemi di sicurezza associati al suo impiego in quanto inesistenti. Resta a carico dell'utilizzatore stabilire buone pratiche per la sicurezza, per la salute e per garantire la conformità alla legislazione italiana.

6. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua deionizzata e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

6.1 Corindone ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$; SRM 640 NIST) da utilizzare come standard interno.

7. Apparecchiature

7.1 Portacampioni di plexiglass o alluminio.

7.2 Diffrattometro ai raggi X per polveri (XRPD) dotato di rivelatore allo stato solido.

7.3 Schede per le fasi cristalline del database Powder Diffraction File (PDF-2).

7.4 Programma di calcolo TOPAS-Academic [1] o GSAS [2] con risultati indipendenti dal programma utilizzato.

8. Preparazione del campione

Macinare manualmente o meccanicamente il campione fino ad ottenere una polvere impalpabile ($< 50 \mu\text{m}$).



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

9. Procedimento

Un'aliquota del campione addizionata con corindone in quantità pari al 20% in peso, viene inserita – preferibilmente con la tecnica di caricamento laterale per evitare orientazione preferenziale dei cristalliti – in un portacampioni di plexiglass o alluminio (7.1) successivamente introdotto nell'apposito vano portacampioni di un diffrattometro automatico a raggi X per polveri dotato di un rivelatore allo stato solido o gas-proporzionale o a scintillazione o altro. I risultati sono indipendenti dal tipo di rivelatore utilizzato [3].

Le condizioni operative per l'esecuzione del diffrattogramma di polveri possono variare a seconda della strumentazione specifica utilizzata. Condizioni tipiche sono le seguenti: radiazione $\text{CuK}\alpha_{1,2}$; fenditure 1.0/1.0/0.2 mm; intervallo angolare 2θ da 5 a 80-130°; step size 0.02°; time/step 5-12 s.

10. Calcolo ed espressione dei risultati

L'interpretazione qualitativa del diffrattogramma di polveri viene condotta tramite confronto con le schede per le fasi cristalline del database PDF-2 (ICDD). L'analisi modale delle fasi con metodo Rietveld (QPA-Rietveld) può essere eseguita attraverso uno dei numerosi programmi di calcolo disponibili per il raffinamento Rietveld di miscele polifasiche. Ne esistono sia di commerciali (X'Pert High Score Plus [4]) che ad uso accademico (TOPAS-Academic [1] o pacchetto GSAS [2]). I modelli strutturali delle fasi cristalline identificate nell'analisi qualitativa del diffrattogramma possono essere ricavati dal database ICSD o dalla letteratura di riferimento. Durante la procedura di fit del profilo, oltre ai termini del fondo, vengono raffinati i parametri di cella, i fattori di scala, i coefficienti delle funzioni di profilo (dimensioni dei cristalli) e, se necessario, alcuni fattori correttivi (orientazione preferenziale, microassorbimento, estinzione, ecc.).

I risultati dell'analisi quantitativa Rietveld sono espressi in percentuali in peso delle fasi cristalline e della fase amorfa con le relative deviazioni standard ricalcolate sulla base del contenuto originale della roccia (senza standard interno aggiunto).

11. Limite di rivelabilità

Il limite di rivelabilità delle fasi cristalline presenti in fertilizzanti tipo zeolititi varia a seconda delle condizioni di misura (quantità campione, intensità fascio incidente, fenditure, tempi di acquisizione, ecc.) e delle caratteristiche effettive della miscela. Una stima può essere ricavata attraverso una relazione del tipo:

$$\text{LLD}_\alpha = 3w_\alpha I_{bg}^{0.5} / I_{pk}$$

dove:



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

LLD_{α} = limite di rivelabilità per la fase α definito come la più bassa concentrazione determinabile come statisticamente diversa dal bianco (3σ)

w_{α} = frazione in peso nota di α in una miscela artificiale

I_{bk} e I_{pk} = intensità in c/s del fondo e del picco caratteristico della fase α

12. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore di r riportato in tabella.

Tabella. Valori medi, limiti di ripetibilità

\bar{x} (%)	r (%)
57,4	2,5
63,8	2,4
70,7	3,4

13. Riferimenti bibliografici

[1] Coelho Software (2007).- Topas-Academic V. 4.1. Brisbane, Australia.

[2] A.C. Larson and R.B. Von Dreele (2004).- General Structure Analysis System (GSAS). Los Alamos National Laboratory Report LAUR 86-748.

[3] L. Leòn-Reina, A. G. De la Torre, J. M. Porras-Vazquez, M. Cruz, L. M. Ordonez, X. Alcobe, F. Gispert-Guirado, A. Larranaga-Varga, M. Paul, T. Fuellmann, R. Schmidt and M. A. G. Aranda (2009).- Round robin on Rietveld quantitative phase analysis of Portland cements. J. Appl. Cryst. 42, 906–916.

[4] PANalytical B.V. (2001).- X'Pert HighScore Plus V. 3.0d. Almelo, The Netherlands.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

13 Determinazione della composizione chimica delle zeolititi mediante spettrometria di fluorescenza a raggi X

1. Oggetto

Il presente metodo stabilisce il procedimento da seguire per la caratterizzazione chimica di fertilizzanti a prevalente (> 50%) contenuto in zeolite (zeolititi). La spettrometria di fluorescenza a raggi X permette infatti di fare analisi chimiche qualitative e quantitative degli elementi maggiori (Na, Mg, Al, Si, P, K, Ca, Ti, Mn e Fe) e in tracce (S, Cl, Cu, Zn, As, Pb, V, Cr, Co, Ni, Ba, Ce, Nb, Zr, Sr, Y e La) con numero atomico maggiore di 5.

2. Scopo e campo di applicazione

Il metodo si applica a campioni solidi in quantità da 2 a 3 grammi di materiale in polvere impalpabile (< 50 μ m). La matrice deve essere di composizione simile a quella degli standard utilizzati per la taratura dello strumento.

3. Termini e definizioni

Zeolite: allumo-silicato idrato di elementi alcalini (essenzialmente Na e K) e alcalino-terrosi (essenzialmente Ca e Mg), strutturalmente appartenente ai tetosilicati.

Zeolitite: roccia a prevalente (> 50%) contenuto in zeolite derivante dalla diagenesi di piroclastiti (tufi, ignimbriti) attraverso un processo di dissoluzione dell'originario vetro vulcanico e precipitazione delle fasi zeolitiche.

4. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'interazione di un fascio di raggi X su un campione e conseguente produzione di raggi X di lunghezze d'onda caratteristiche degli elementi di cui è costituito il campione, in intensità proporzionali alle concentrazioni dei singoli elementi.

Un tubo a raggi X produce radiazioni dello spettro continuo e caratteristico del materiale di cui è costituito l'anodo (per esempio W, Sc, Mo, Cr, Au). Gli atomi del campione colpiti dai raggi X vengono eccitati e nel passaggio allo stato naturale emettono a loro volta radiazioni X caratteristiche degli elementi di cui è composto il campione. Uno spettrometro è in grado di selezionare le radiazioni X relative ad una sola riga dello spettro e un contatore conta la quantità di radiazione relativa ad un singolo elemento. Sulla base di adeguate scale di taratura, misurate su standard con diverse concentrazioni e con matrici il più possibile simili al campione, è possibile convertire le misure di intensità dei singoli elementi in concentrazioni, espresse in percentuali per gli elementi maggiori e in p.p.m. per gli elementi in tracce. Gli standard di taratura sono riportati nella letteratura corrente, come riferimento bibliografico qui citato [1].



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Avvertenze - Le persone incaricate di eseguire questo metodo di prova devono avere familiarità con la normale pratica di laboratorio chimico. Questo metodo non affronta i problemi di sicurezza associati al suo impiego in quanto inesistenti. Resta a carico dell'utilizzatore stabilire buone pratiche per la sicurezza, per la salute e per garantire la conformità alla legislazione italiana.

5. Reazioni e interferenze

Possibili problemi nella misura di alcuni elementi possono sorgere dalle eventuali interferenze delle righe caratteristiche della radiazione X incidente (relative all'elemento di cui è costituito l'anodo) con le righe degli elementi da misurare ed eventuali interferenze di righe caratteristiche di diversi elementi presenti nel campione. Per ovviare a questo si opera una scelta adeguata del materiale dell'anodo del tubo a raggi X, della riga caratteristica dell'elemento da misurare e, nel caso di interferenze non eliminabili, si applica un fattore di correzione.

6. Reattivi e materiali

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua deionizzata e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

6.1 Acido borico puro per analisi (titolo minimo 99.8%).

6.2 Standard di taratura internazionali certificati: GA, GH, JG-1, JG-2, JG-3 come da riferimento bibliografico [1].

6.3 Collante organico Mowiol (titolo non specificato).

7. Apparecchiature

7.1 Pasticcatrice di 5 cm di diametro.

7.2 Spettrometro in dispersione di lunghezza d'onda corredato da cristalli analizzatori, rivelatori a scintillazione o contatori a flusso di gas, con una accuratezza compresa fra 0,1 e 0,3 %.

7.3 Bilancia tecnica con precisione alla seconda cifra decimale.

7.4 Pressa idraulica con PMAX di 10 ton.

7.5 Essiccatore.

8. Preparazione del campione

Frantumare manualmente o meccanicamente il campione fino ad ottenere una polvere impalpabile (< 50 µm). Essiccare a 110° C per 12 ore il materiale. Lasciare raffreddare il materiale fino a temperatura ambiente in un essiccatore mantenuto sotto vuoto per evitare la reidratazione.

9. Procedimento



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

9.1 Preparazione delle aliquote di prova

Pesare circa 3,00 grammi di campione preparato seguendo quanto descritto al paragrafo 8, con la precisione di 0,1 mg. Impastare il campione con quattro gocce di collante organico (6.3), sistemarlo nella pasticcatrice (7.1), ricoprire con 5 cucchiaini di acido borico (6.1) e pressare a 7 tonnellate per 10 minuti ottenendo una pasticca di 5 cm di diametro e di 5 o 6 mm di spessore. Conservare le pasticche in essiccatore fino al momento della misurazione con lo spettrometro.

9.2 Preparazione di un bianco

Preparare una pasticca composta da solo acido borico (6.1) pressando il materiale a 7 tonnellate per 10 minuti.

9.3 Taratura del sistema di misura

Preparare con la stessa procedura descritta per i campioni la serie di standard internazionali certificati di matrice simile al campione e con composizioni distribuite in un intervallo intorno al valore presunto del campione.

9.4 Misura

Eseguire le misure sugli standard di riferimento nelle stesse condizioni analitiche utilizzate per la misura del campione.

10. Calcolo ed espressione dei risultati

Il calcolo della concentrazione degli elementi avviene mediante la seguente formula [2, 3]:

$$C_i = I_i \sum_{j=1}^N K_{i,j} C_j$$

Dove:

C_i : concentrazioni costituenti la roccia;

N : il numero degli elementi;

I_i : intensità della riga caratteristica misurata;

$K_{i,j}$: coefficienti che tengono conto degli effetti di matrice;

C_j : concentrazione dell'elemento j .

I risultati espressi in percentuali degli ossidi degli elementi per le concentrazioni degli elementi maggiori (fino alla seconda cifra decimale) e in p.p.m. per le concentrazioni degli elementi in tracce (senza cifre decimali) vengono normalizzati a 100% con la perdita di H₂O determinata su aliquota del campione rappresentativo mediante calcinazione a 1000°C.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

11. Limite di rivelabilità

I limiti di rivelabilità variano in funzione del numero atomico dell'elemento analizzato, della matrice e della quantità di materiale su cui si effettua la misura. I valori dei limiti di rivelabilità relativi agli elementi maggiori sono riportati nella sottostante tabella, quelli per gli elementi minori sono dell'ordine delle parti per milione (p.p.m.).

Na ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	TiO ₂	MnO	Fe ₂ O ₃
0.30	0.40	0.30	0.20	0.10	0.01	0.09	0.04	0.10	0.06

Tabella - Limiti di rivelabilità (% in peso) degli elementi maggiori espressi in ossidi.

Non ci sono limiti nella concentrazione massima degli elementi misurati.

12. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il valore di r riportato in tabella.

Tabella. Valori medi, limiti di ripetibilità per tre differenti campioni di zeolite

campione	dati	SiO ₂	Al ₂ O ₃	P ₂ O ₅	TiO ₂	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O
Z1	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	\bar{x} (%)	51,91	16,51	0,17	0,52	3,43	0,12	1,77	5,46	0,64	5,47
	r %	1,23	1,00	0,05	0,10	0,24	0,04	0,09	0,37	0,09	0,83
Z2	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	\bar{x} (%)	48,90	16,89	0,12	0,57	4,18	0,13	1,47	4,80	0,85	6,47
	r %	1,27	0,94	0,04	0,06	0,10	0,03	0,10	0,21	0,11	0,25
Z3	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	\bar{x} (%)	52,07	16,42	0,05	0,45	3,19	0,13	0,95	4,55	0,89	6,23
	r %	1,67	0,67	0,04	0,11	0,32	0,05	0,14	0,25	0,14	0,35

13. Controllo della qualità

Fare delle misure di standard internazionali (GA, GH, JG-1, JG-2, JG-3 come da riferimento bibliografico [1]) nelle stesse condizioni sperimentali del campione in esame.

14. Riferimenti bibliografici



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

- [1] Geostandards Newsletter. Special Issue of Geostandards Newsletter. Vol. XVIII, July 1994, Vandoeuvre-les-Nancy, France ((K. Govindaraju, ed.), 1-1581.
- [2] Franzini M., Leoni L. e Saitta M.: Revisione di una metodologia analitica per fluorescenza – X, basata sulla correzione completa degli effetti di matrice. Rend. Soc. It. Min. Petr., 31(2), 365-378, 1975.
- [3] Leoni L. e Saitta M.: X-ray fluorescence analysis of 29 trace elements in rock and mineral standards. Rend. Soc. It. Min. Petr., 32(2), 497-519, 1976.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

14 Metodo per l'enumerazione di *Escherichia coli*

AVVERTENZE

Le persone incaricate di eseguire questo metodo di prova devono avere familiarità con la normale pratica di laboratorio. Questo metodo non affronta i problemi di sicurezza associati al suo impiego, se mai esistessero. Resta a carico dell'utilizzatore stabilire buone pratiche per la sicurezza, per la salute e per garantire la conformità alla legislazione italiana.

Introduzione

Escherichia coli (*E.coli*) sono batteri gram-negativi, presenti nel tratto intestinale degli esseri umani ed animali. Pertanto vi è il rischio, per quanto ridotto, che la contaminazione con materiali fecali contenenti il batterio possa causare epidemie attraverso la trasmissione di questi organismi alla catena alimentare quando sono presenti *E. coli* patogeni, quali *E. coli* O157. Per questa ragione vi è la necessità di monitorare e controllare i livelli di *E.coli* negli ammendanti compostati, in relazione alle loro dosi di applicazione ai terreni agricoli. La determinazione della densità di *E.coli* rappresenta un test microbiologico routinario e uno strumento sensibile per valutare la rimozione del patogeno dall'ammendante in vista del suo utilizzo nel terreno agrario e per dimostrare la conformità del prodotto con gli standard regolatori. Il significato di *E.coli* è descritto in maggiore dettaglio in letteratura.

Gli utilizzatori di questo metodo sono tenuti a verificare i risultati nelle proprie condizioni di laboratorio, utilizzando gli strumenti di verifica descritti più avanti in dettaglio.

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per l'enumerazione di *Escherichia coli* nei concimi organici, negli ammendanti e nelle matrici organiche utilizzate per la loro produzione.

2. Campo di applicazione

Il metodo, che è un esempio di tecnica di rilevamento del numero di microrganismi su substrato definito, è adatto per l'esame di concimi organici, ammendanti e delle materie utilizzate (in particolare fanghi) per la loro produzione di cui al DLgs n.75 del 29 aprile 2010, inclusi i fanghi non trattati (ad esempio da lagunaggio, ispessiti e digeriti anaerobicamente) e trattati (ad esempio pastorizzati, da digestione termofila e stabilizzati con limo). A seconda della natura della matrice da analizzare, possono essere necessarie tecniche diverse di preparazione del campione, alcune delle quali sono descritte più avanti.

3. Riferimenti normativi



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

I riferimenti ad alcune normative nazionali inglesi sono riportati in bibliografia in fondo al testo.

4. Termini e definizioni

- 4.1 I substrati microbiologici definiti sono formulazioni di substrati chimici specifici atti al rilevamento di attività enzimatiche diagnostiche associate ad un gruppo particolare di microrganismi.
- 4.2 Nel contesto di questo metodo, gli organismi sono considerati E.coli se producono l'enzima β -glucuronidasi a 37.0 ± 1.0 °C. L'attività β -glucuronidasica è dimostrata dalla produzione di una fluorescenza blu-bianca (all'illuminazione ultra-violetta ad alta lunghezza d'onda) come risultato della rottura enzimatica del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG).
- 4.3 Storicamente, nell'esame di acque e materiali assimilabili, E.coli sono stati ricompresi tra i membri della Famiglia delle Enterobacteriaceae che fermentano il lattosio o il mannitolo a 44°C con la produzione di acido entro le 24 ore, e che producono indolo dal triptofano. La maggior parte dei ceppi di E.coli produce β -glucuronidasi.

5. Principio del metodo

- 5.1 Un campione del compost è inizialmente omogeneizzato, come specificato in dettaglio nel successivo punto 10.1, e diluito serialmente con acqua distillata o deionizzata. Dopo incubazione in un mezzo liquido definito contenente substrati specifici per il rilevamento delle attività enzimatiche β -galattosidasica e β -glucuronidasica, gli organismi vengono enumerati.
- 5.2 Il mezzo disidratato viene sciolto in un volume stabilito di acqua deionizzata sterile alla quale viene addizionato il campione di compost diluito. La sospensione viene poi trasferita ad un contenitore con una piastra di reazione dotata di pozzetti multipli di volume fisso. Questo contenitore agisce come un sistema MPN (Most Probable Number, cioè numero più probabile) di tubi multipli, dove il numero di pozzetti che mostrano crescita microbica nel mezzo dipenderà dal numero e distribuzione degli organismi nel campione diluito. Il contenitore viene chiuso ed incubato in condizioni di tempo e temperatura stabilite. Se nel contenitore alcuni, ma non tutti, i pozzetti esibiscono crescita nel mezzo di coltura, il numero più probabile di organismi nel campione diluito può essere stimato dalle tavole di probabilità, un esempio delle quali è riportato in Tab.1 in Appendice.

6. Reazioni e interferenze

Il diluente di recupero sterile di cui al paragrafo successivo deve essere conservato a temperatura ambiente al riparo dalla luce ed utilizzato entro un mese.

Durante la determinazione, non dovrebbero essere utilizzate soluzioni tampone, in quanto suscettibili di dare reazioni avverse.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Durante la determinazione, evitare l'esposizione diretta alla luce del sole delle bottiglie poiché ciò potrebbe causare l'idrolisi dei substrati specifici, dando origine a falsi-positivi. Si raccomanda di non utilizzare bottiglie di vetro, per evitare la formazione di pressioni gassose potenzialmente infiammabili.

7. Reagenti e materiali

Sono disponibili formulazioni commerciali di questi mezzi colturali. Le prestazioni di tutti i mezzi e dei reagenti dovrebbero essere verificata prima dell'uso.

A meno che non sia diversamente indicato, i costituenti chimici dovrebbero essere aggiunti come sale anidro.

7.1 *Mezzo Colilert® 18*. Questo mezzo è un esempio di una formulazione commercialmente disponibile in sacchetti ed è adatta per l'analisi di singoli campioni. Il mezzo è una formulazione chimicamente definita con nutrienti minimi e substrati specifici per il rilevamento degli enzimi β -galattosidasi e β -glucuronidasi.

7.2 Diluente di recupero

- peptone batteriologico: 1,0 g
- sodio cloruro (NaCl): 8,5 g
- acqua distillata o demineralizzata di qualità equivalente: 1 L

Sciogliere gli ingredienti nell'acqua e aggiustare il pH a $7,0 \pm 0,2$. Frazionare la soluzione in bottiglie con tappo a vite e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Dopo autoclavaggio verificare che il pH sia rimasto a $7,0 \pm 0,2$. Il diluente sterile deve essere conservato a temperatura ambiente al riparo dalla luce ed utilizzato entro un mese.

8. Apparecchiature

Possono essere utilizzate apparecchiature standard di laboratorio microbiologico che siano conformi ai criteri descritti (3). Un esempio di metodologia per questo tipo di tecnica del numero più probabile è di seguito descritta ed è basata su sistemi commercialmente disponibili. Alcuni degli strumenti elencati sono specifici per questo sistema. Essi comprendono:

8.1 Incubatore capace di mantenere una temperatura di $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

8.2 Navicelle in materiale plastico sterile (6 cm x 6 cm).

8.3 Bottiglie di plastica sterili da 100 mL contenenti un agente anti-schiuma, del tipo di quelle fornite dal produttore del sistema test, o equivalenti.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

8.4 Sacchetti di reazione MPN come forniti dal produttore (per esempio un sistema a 51 pozzetti che dà un intervallo contabile fino a 200 organismi, oppure un sistema a 97 pozzetti che dà un intervallo enumerabile fino a 2419 organismi) e i relativi dispositivi per saldatura a caldo.

8.5 Lampada ultra-violetto ad alta lunghezza d'onda (365-366 nm) e un visualizzatore.

8.6 Comparatore a colore e a fluorescenza, come fornito dal produttore.

9. Procedimento

9.1 Preparazione delle aliquote di prova

Preparare un diluizione iniziale di 1:10 del campione originale pesando 10 grammi del compost, in maniera asettica, in una navicella in materiale sterile. Aggiungere 90 mL del diluente di recupero (o quantità diversa, rispettando comunque il rapporto di 1:10 tra campione e diluente) ed omogeneizzare il campione diluito. Vengono quindi preparate diluizioni seriali, tipicamente 1:100, del campione diluito ed omogeneizzato, in acqua sterile deionizzata o distillata. Le diluizioni vengono preparate in modo che i pozzetti contenenti il mezzo di crescita definito esibiscano in alcuni casi la crescita, in altri l'assenza di crescita dei microrganismi.

9.2 Eventuale preparazione di un bianco

Preparare un bianco, da trattare in parallelo alla prova, utilizzando la stessa procedura e gli stessi reagenti; il bianco conterrà un campione di fertilizzante previamente sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti.

9.3 Determinazione

Preparare un'adeguata diluizione del campione, prelevando 1 mL di del campione e ponendolo in una bottiglia sterile contenente l'agente anti-schiuma e 99 mL di acqua distillata o deionizzata sterile. Non dovrebbero essere utilizzate soluzioni tampone, in quanto suscettibili di dare reazioni avverse. Seguendo le istruzioni del produttore, trasferire asetticamente il contenuto di un sacchetto di mezzo (reazione) nella bottiglia. Dopo averla chiusa, agitare la bottiglia per assicurare la dissoluzione del mezzo. La bottiglia viene posta a riposo per alcuni minuti per consentire la dispersione di bolle d'aria. Il contenuto della bottiglia viene quindi trasferito al contenitore MPN che viene sigillato. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole poiché ciò potrebbe causare l'idrolisi dei substrati specifici, dando origine a falsi-positivi. Il tempo che intercorre tra l'inoculo del sacchetto di reazione e l'inizio dell'incubazione deve essere il più breve possibile e non superiore a 2 ore. I sacchetti MPN sigillati vengono incubati a $37,0 \pm 1,0$ °C per non meno di 18 ore e non più di 22 ore.

9.4 Lettura dei risultati



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Dopo incubazione, il sacchetto di reazione viene esaminato e viene annotato il numero di pozzetti che esibiscono una fluorescenza blu-bianco sotto la luce ultravioletta (365 nm). Il livello di fluorescenza dei campioni viene paragonato con scale d'intensità fornite dal produttore, per assicurare la corretta interpretazione del dato. In alcuni casi, può essere rilevante annotare il numero di pozzetti che mostrano colore giallo dovuto all'idrolisi enzimatica dell'orto-nitrofenil-β-D-galattopiranoside (ONPG), che indica la presenza di β-galattosidasi.

9.5 Test di conferma

Il metodo riportato è altamente specifico per *E.coli*, come dimostrato dalla produzione di fluorescenza blu-bianco, che risulta dalla rottura enzimatica del 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG). Non sono, pertanto, normalmente richiesti test di conferma.

10. Calcolo ed espressione dei risultati

10.1 Il numero di pozzetti che mostrano reazione positiva (cioè fluorescenza blu-bianca, con o senza colorazione gialla nel mezzo di coltura) viene contato e annotato. Il MPN di *E.coli* viene determinato con riferimento alle appropriate tabelle di probabilità, come riportato in Tabella 1. Per esempio, utilizzando il contenitore a 51 pozzetti, se ci sono 15 pozzetti che mostrano fluorescenza blu-bianco, dalla tabella si desume che il MPN di *E.coli* è di 18 per 100 mL di soluzione.

Il valore di MPN di *E.coli* nel compost può essere espresso sulla base del peso fresco (umido) o secco. Il calcolo prende in considerazione il volume e le diluizioni utilizzate e, per il numero di *E.coli* per grammo di peso secco, anche la percentuale di peso secco (7). Per il valore di MPN relativo al peso fresco, espresso in grammi di compost tal quale, utilizzare la seguente formula:

$$C_w (g) = \frac{N \times b \times d}{a}$$

dove

C_w è il numero di *E.coli* in un grammo di compost (peso umido)

N è il MPN di *E.coli* ottenuto dalle tabelle di probabilità (per 100 mL esaminati)

a è il volume del campione diluito (tipicamente 1 mL)

b è il fattore iniziale di diluizione per il fertilizzante nel diluente (in questo caso 10)

d è il fattore di diluizione per le diluizioni seriali in acqua deionizzata o distillata



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Per esempio, se 10 grammi di fertilizzante (umido) originale viene inizialmente diluito 10 volte, e viene fatta una diluizione seriale di 5 mL a 10 mL, cioè 2 volte, e 1 mL della diluizione finale viene preso per l'aggiunta al mezzo di coltura, e 15 pozzetti sono contati come fluorescenti in blu-bianco, allora

$$C_w = \frac{18 \times 10 \times 2}{1} = 360$$

10.2. Il MPN di *E.coli* presenti nel fertilizzante viene espresso come numero di *E.coli* su peso umido.

11. Precisione

Il metodo di stima è riferito alla tabella di probabilità denominate MPN (*Most Probable Number*, Numero Più Probabile) elaborata con calcolo probabilistico e riportata in Appendice.

12. Recupero

Non si applica.

13. Limiti di rivelabilità

Il limite di rilevabilità è dato dalla seguente formula:

$$C_w = \frac{1 \times b \times d}{a}$$

dove:

C_w è il numero di *E.coli* in un grammo di compost (peso umido)

a è il volume del campione diluito (tipicamente 1 mL)

b è il fattore iniziale di diluizione per il fertilizzante nel diluente

d è il fattore di diluizione per le diluizioni seriali in acqua deionizzata o distillata

14. Controllo della qualità

Nuovi batches dei mezzi di coltura e dei reagenti dovrebbero essere testati con l'appropriato ceppo batterico target di riferimento (ad esempio *E.coli*) e di ceppi batterici non-target (ad esempio *Pseudomonas aeruginosa*). Per ulteriori dettagli si rimanda alla letteratura. Per numeri elevati di campioni, o per il monitoraggio di routine, può essere appropriato esaminare uno o più campioni in duplicato, valutando comparativamente i numeri ottenuti.

15. Rapporto di prova



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Vengono riportati i numeri più probabili di cellule vitali coltivabili di *E.coli* presenti nel campione tal quale (1 g).

16. Appendice

Tab.1 - MPN e intervalli di confidenza al 95% per 100 mL riferiti ad un contenitore con una piastra a 51 pozzetti contenenti un mezzo di reazione definito.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Tabella MPN Quanti-Tray* a 51 pozzetti

N° di pozzetti positivi in un campione da 100 ml	Numero piú probabile	Limiti fiduciali del 95% Inferiore	Limiti fiduciali del 95% Superiore
0	<1	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.7
25	34.4	23.3	51.2
26	36.4	24.7	53.9
27	38.4	26.4	56.6
28	40.6	28.0	59.5
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0
32	50.4	35.4	72.5
33	53.1	37.5	76.2
34	56.0	39.7	80.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	195.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	135.8	387.6
51	> 200.5	146.1	Infinito



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

17. Riferimenti bibliografici

Standing Committee of Analysts, The Microbiology of Drinking Water (2002) - Part 1 - Water Quality and Public Health, *Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*, in this series, Environment Agency.

Standing Committee of Analysts, The Microbiology of Sewage Sludge (2003) - Part 2 - Practices and procedures for sampling and sample preparation, *Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*, in this series, Environment Agency.

Standing Committee of Analysts, The Microbiology of Drinking Water (2002) - Part 3 - Practices and procedures for laboratories. *Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*, in this series, Environment Agency.

This text is based on Resolution 74 by CEN TC 292 - Wastes - Working Group 5, the agreed text of which was adopted by CEN TC 308 - Characterisation of sludges - for the section on "General Hazards" associated with sludge material and waste.

IDEXX Laboratories, Milton Court, Churchfield Road, Chalfont St Peter, Buckinghamshire, SL9 9EW

Standing Committee of Analysts, The Microbiology of Drinking Water (2002) - Part 4 - Methods for the isolation and enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* including *E. coli* O157:H7. *Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*, in this series, Environment Agency.

Standing Committee of Analysts, The Conditionability, Filterability, Settleability and Solids Content of Sludges (1984) A Compendium of Methods and Tests, *Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*, in this series, ISBN 0117517879.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

15 Metodo orizzontale per la ricerca di *Salmonella* spp.

AVVERTENZE

Le persone incaricate di eseguire questo metodo di prova devono avere familiarità con la normale pratica di laboratorio. Resta a carico dell'utilizzatore stabilire buone pratiche per la sicurezza, per la salute e per garantire la conformità alla legislazione italiana. Al fine di salvaguardare la salute del personale di laboratorio è essenziale che le prove per la ricerca di *Salmonella* spp. siano eseguite esclusivamente in laboratori adeguatamente equipaggiati, sotto il controllo di un microbiologo specializzato, e che sia prestata un'estrema attenzione nello smaltimento di tutti i materiali incubati.

1. Introduzione

Il presente metodo orizzontale può non essere idoneo in ogni dettaglio per determinati prodotti derivati o materie prime usate per la fabbricazione. Alcune di queste opzioni sono riportate in Appendice D per certe matrici definite.

Se assolutamente necessario per motivi tecnici giustificati, si possono utilizzare metodi diversi per prodotti derivati o materie prime utilizzate per la fabbricazione. Tali metodi dovranno essere specificati in ogni dettaglio alla presentazione del rapporto di prova.

Gli utilizzatori di questo metodo sono tenuti a verificare i risultati nelle proprie condizioni di laboratorio, utilizzando gli strumenti di verifica descritti più avanti in dettaglio.

2. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la ricerca della *Salmonella* spp. nei concimi organici, negli ammendanti e nelle matrici organiche utilizzate per la loro produzione.

3. Scopo e campo di applicazione

3.1 La presente norma specifica è un metodo orizzontale per la ricerca di cellule coltivabili di *Salmonella* spp., compresi *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*. Il metodo non recupera le cellule vitali non coltivabili e può non recuperare tutti i *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*.

3.2 Questo metodo, tenuto conto delle limitazioni specificate nell'introduzione, che è un esempio di tecnica di rilevamento del numero di microrganismi su substrato definito, è adatto per l'esame di concimi organici, ammendanti e delle materie utilizzate per la loro produzione di cui al DLgs n.75 del 29 aprile 2010, inclusi i fanghi non trattati (ad esempio da lagunaggio, ispessiti e digeriti per via anaerobica) e trattati (ad esempio pastorizzati, da digestione termofila e stabilizzati con limo). A seconda della natura della matrice da analizzare, possono essere necessarie tecniche diverse di preparazione del campione, alcune delle quali sono descritte più avanti.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

4. Riferimenti normativi

I documenti richiamati di seguito sono indispensabili per l'applicazione del presente documento. Per quanto riguarda i riferimenti datati, si applica esclusivamente l'edizione citata. Per i riferimenti non datati vale l'ultima edizione del documento a cui si fa riferimento (compresi gli aggiornamenti).

ISO 6887-1 Microbiology of food and feeding stuffs – 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 7218:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations.

ISO 8261 Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examinations.

ISO/TS 11133-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.

ISO/TS 11133-2:2003 Microbiology of food and feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.

ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Microbiology of food and feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.- Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* in animal faeces and environmental samples from the primary production stage.

5. Termini e definizioni

Ai fini della presente norma, si applicano i termini e le definizioni seguenti.

5.1 *Salmonella* spp.: batterio che forma colonie tipiche o meno tipiche su terreni selettivi solidi e che presenta le caratteristiche biochimiche e sierologiche descritte quando le prove sono effettuate in conformità alla presente norma.

5.2 Ricerca di *Salmonella* spp.: determinazione della presenza o assenza di *Salmonella* spp. (punto 5.1), in una particolare massa o volume di prodotto, quando le prove sono effettuate in conformità alla presente norma.

6. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'arricchimento di una sottopopolazione rispetto ad una popolazione poli-microbica presente nel campione.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

6.1 Generalità

La ricerca di *Salmonella* spp. necessita di quattro stadi successivi (vedi anche Appendice A). *Salmonella* spp. può essere presente in densità moderate ed è spesso accompagnata da quantità considerevolmente più elevate di altri microorganismi appartenenti alla Famiglia delle *Enterobacteriaceae* o ad altre Famiglie. Inoltre è spesso necessario un pre-arricchimento per consentire la ricerca di bassi numeri di *Salmonella* spp. o di cellule danneggiate di *Salmonella* spp.

6.2 Pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo

Inoculare l'aliquota di prova in acqua peptonata a temperatura ambiente, quindi procedere all'incubazione a $37, ^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per 18 ore \pm 2 ore.

Per alcune matrici può essere necessario utilizzare procedimenti di pre-arricchimento diversi (vedi punto 9.1.2).

Per le grandi quantità, l'acqua peptonata tamponata dovrebbe essere riscaldata a $37 ^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ prima d'inoculare l'aliquota di prova.

6.3 Arricchimento in terreno liquido selettivo

Inoculare a coltura ottenuta come da punto 6.2 in terreno di Rappaport-Vassiliadis con soia (brodo RVS) e in brodo Muller-Kauffmann al tetrionato-novobiocina (brodo MKTTn).

Il brodo RVS è incubato a $41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore \pm 3 ore e il brodo MKTTn è incubato a $37 ^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore \pm 3 ore.

6.4 Isolamento e identificazione

Inoculare le colture ottenute come nel punto 6.3 in due terreni selettivi solidi:

1. Agar XLD (Xilosio Lisina Desossicolato);
2. Qualsiasi altro terreno solido complementare all'agar XLD e in particolare appropriato per l'isolamento dei ceppi di *Salmonella* spp., *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi* lattosio-positivi; il laboratorio può scegliere quale terreno utilizzare. A titolo di esempio, potrebbero essere utilizzati come secondo terreno d'isolamento agar al verde brillante (BGA, Brilliant Green Agar), agar al bismuto-solfito ecc.

L'agar XLD è incubato a $37 ^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ed esaminato dopo 24 ore \pm 3 ore. Il secondo agar selettivo è incubato in base alle raccomandazioni del fabbricante.

6.5 Conferma



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Subcolture delle colonie di presunto *Salmonella*, isolate secondo quanto descritto nel punto 6.4 e conferma mediante prove biochimiche e sierologiche appropriate.

7. Terreni di coltura, reagenti e sieri

7.1 Generalità

Per le pratiche di laboratorio correnti, vedere ISO 7218

7.2 Terreni di coltura e reagenti

A causa del gran numero di terreni di coltura e reagenti, per chiarezza espositiva si indica la loro composizione e preparazione nell'Appendice B.

7.2.1 Terreno di arricchimento non selettivo: Acqua peptonata tamponata

Vedere punto B.1

7.2.2 Primo terreno di arricchimento selettivo: Terreno di Rappaport-Vassiliadis con soia (RVS)

Vedere punto B.2

7.2.3 Secondo terreno di arricchimento selettivo: Brodo di Muller-Kauffmann al tetrionato-novobiocina (brodo MKTTn)

Vedere punto B.3

7.2.4 Terreni selettivi solidi d'isolamento

7.2.4.1 Primo terreno: Agar XLD (Xilosio Lisina Desossicolato)

Vedere punto B.4

7.2.4.2 Secondo terreno

La scelta del secondo terreno appropriato è lasciata a discrezione del laboratorio di prova. Si dovrebbero seguire con precisione le istruzioni del fabbricante riguardo la sua preparazione ed uso.

7.2.5 Agar nutritivo

Vedere punto B.5



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

7.2.6 Agar addizionato con tre zuccheri e ferro (TSI, Triple Sugars Iron)

Vedere punto B.6

7.2.7 Agar addizionato con urea (Agar di Christensen)

Vedere punto B.7

7.2.8 Terreno per la decarbossilazione della L-lisina

Vedere punto B.8

7.2.9 Reagente per la ricerca della β -galattosidasi (o dischi di carta preparati, utilizzati in conformità alle istruzioni del fabbricante)

Vedere punto B.9

7.2.10 Reagenti per la reazione di Voges-Proskauer (reazione VP)

Vedere punto B.10

7.2.11 Reagenti per la reazione dell'indolo

Vedere punto B.11

7.2.12 Agar nutritivo semi-solido

Vedere punto B.12

7.2.13 Soluzione salina fisiologica

Vedere punto B.13

7.3 Sieri

In commercio sono disponibili diversi tipi di sieri agglutinanti contenenti anticorpi per uno o più antigeni, per esempio gli antisieri contenenti uno o più gruppi "O" (detti sieri anti-O mono- o polivalenti), gli antisieri anti-Vi e quelli contenenti anticorpi per uno o più fattori H (detti sieri anti-H mono- o polivalenti).

Si dovrebbe assicurare che gli antisieri utilizzati siano adeguati alla ricerca di tutti i sierotipi di *Salmonella* spp. Questo obiettivo può essere raggiunto più facilmente mediante l'impiego di



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

antisieri preparati da un fornitore (ad esempio un ente di diritto pubblico appropriato), la cui competenza sia nota.

8. Apparecchiatura e vetreria

L'apparecchiatura usa e getta, purché dotata di specifiche adeguate, costituisce un'alternativa accettabile alla vetreria riutilizzabile. La normale apparecchiatura di un laboratorio di microbiologia (vedi ISO 7218) è sufficiente; in particolare essa comprende:

8.1 Apparecchiatura per sterilizzazione a secco (forno) o per sterilizzazione ad umido (autoclave)
Vedi ISO 7218.

8.2 Essiccatoio o forno, ventilato mediante convezione, in grado di funzionare a temperature comprese tra 37 °C e 55 °C.

8.3 Incubatore, in grado di funzionare a 37 °C ± 1°C.

8.4 Bagnomaria, oppure incubatore, in grado di funzionare a 41,5 °C ± 1°C.

8.5 Bagnomaria, in grado di funzionare da 44 °C a 47 °C.

8.6 Bagnomaria, in grado di funzionare a 37 °C ± 1°C.

Si raccomanda di utilizzare bagnomaria (vedi punti 8.4, 8.5 e 8.6) contenenti un agente antibatterico a causa della bassa dose infettiva di *Salmonella*.

8.7 Anse per batteriologia sterili, con diametro di circa 3 mm o 10 µL e pipette sterili.

8.8 Misuratore di pH, dotato di accuratezza di taratura di ± 0,1 unità di pH da 20 a 25°C.

8.9 Provette o matracci, di capacità appropriata.

8.10 Pipette graduate o pipette automatiche, della capacità nominale di 10 mL e 1 mL, graduate rispettivamente con intervalli di 0,5 e 0,1 mL.

8.11 Piastre Petri di piccole dimensioni (diametro da 90 a 100 mm) e/o di grandi dimensioni (diametro 140 mm).



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

8.12 Apparecchio per omogeneizzazione, estrazione batterica, preparazione di campioni solidi e semisolidi (del tipo "Stomacher"®).

9. Preparazione del campione di prova

Preparare il campione di prova in conformità alla norma internazionale o nazionale specifica che tratta il prodotto o la materia prima usata per la preparazione del prodotto.

10. Procedimento (vedere lo schema nell'Appendice A)

10.1 Preparazione delle aliquote di prova e sospensione iniziale

Vedere ISO6887-1 e la norma internazionale o nazionale specifica che tratta il prodotto al quale si fa riferimento, o la materia prima necessaria per la sua fabbricazione, ad esempio la norma nazionale per la numerazione di *Escherichia coli* nei fertilizzanti (ammendanti) come segue.

Preparare un diluizione iniziale di 1:10 del campione originale pesando 10,0 g del fertilizzante, in maniera asettica, in un appropriato contenitore. Aggiungere 90 mL (o quantità diversa rispettando sempre il rapporto di 1:10 tra campione e diluente) del diluente ed omogeneizzare il campione diluito con apparecchio stomacher per 2 minuti a bassa velocità. Per la preparazione della sospensione iniziale, in generale utilizzare come diluente il terreno di pre-arricchimento specificato nel punto 7.2.1 e punto 6.2 (acqua peptonata tamponata).

Se la massa specificata dell'aliquota di prova è diversa da 25,0 g, utilizzare la quantità necessaria del terreno di pre-arricchimento per ottenere una diluizione di 1:10.

Per ridurre il carico di lavoro in sede di prova, quando si deve sottoporre a prova più di un'aliquota da 25 g per uno specifico gruppo di campioni e quando è dimostrabile che le aliquote di prova composite (messe in comune) non inficiano i risultati relativi a quella particolare matrice, le aliquote di prova possono essere composite. Per esempio, se devono essere esaminate 10 aliquote di prova da 25 g, combinare le 10 unità e formare un'aliquota di prova composta da 250 g e quindi aggiungere 2,25 L di brodo di pre-arricchimento. Alternativamente, le aliquote di prova dei brodi di pre-arricchimento da 0,1 mL (in 10 mL di brodo RVS) e da 1 mL (in 10 mL di brodo MKTTn) relative alle 10 aliquote separate (vedere punto 10.3.1) possono essere composte per l'arricchimento in 100 mL di terreno di arricchimento selettivo.

10.1.1 Preparazione di un bianco

Si può allestire un bianco, da trattare in parallelo con la prova, mediante la stessa procedura e gli stessi reagenti, che contiene un campione di fertilizzante previamente sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti.

10.2 Pre-arricchimento non selettivo



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Incubare la sospensione iniziale (punto 10.1) a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 18 ore \pm 2 ore

10.3 Arricchimento selettivo

10.3.1 Trasferire 0,1 mL della coltura ottenuta secondo il punto 10.2 in una provetta contenente 10 mL del brodo RVS (punto 7.5.2); trasferire 1 mL della coltura ottenuta come nel punto 10.2 in una provetta contenente 10 mL del brodo MKTTn (punto 7.2.3)

10.3.2 Incubare il brodo RVS inoculato (punto 10.3.1) a $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore \pm 3 ore e il brodo MKTTn inoculato a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore \pm 3 ore. Si dovrebbe fare attenzione che non sia superata la temperatura massima d'incubazione consentita ($42,5\text{ °C}$).

10.4 Isolamento e identificazione

10.4.1 Utilizzando la coltura ottenuta nel brodo RVS (punto 10.3.2), dopo un'incubazione di 24 ore \pm 3 ore, inoculare con un'ansa per batteriologia (punto 8.7) la superficie di una piastra Petri di grandi dimensioni (punto 8.11) contenente il primo terreno selettivo d'isolamento (agar XLD, vedere punto 7.2.4.1), in modo tale da ottenere delle colonie ben isolate.

In mancanza di piastre di grandi dimensioni, utilizzare due piastre piccole, una dopo l'altra, utilizzando la stessa ansa per batteriologia.

10.4.2 Utilizzando la coltura ottenuta nel brodo MKTTn (punto 10.3.2) dopo 24 ore \pm 3 ore d'incubazione, ripetere il procedimento descritto nel punto 10.4.1 con i due terreni selettivi d'isolamento.

10.4.3 Capovolgere le piastre (punto 10.4.1 e punto 10.4.2) in modo che il fondo si trovi verso l'alto e collocarle nell'incubatore (punto 8.3) impostato a $37,0\text{ °C}$ per il primo terreno d'isolamento (punto 7.2.4.1).

Si devono seguire le istruzioni del fabbricante per il secondo terreno d'isolamento (punto 7.2.4.2).

10.4.4 Dopo un'incubazione di 24 ore \pm 3 ore, esaminare le piastre (punto 10.4.3.) ricercando la presenza di colonie tipiche di *Salmonella* e di colonie atipiche che possono essere *Salmonella* (vedere Nota). Marcare la loro posizione sul fondo della piastra.

Le colonie tipiche di *Salmonella* cresciute su agar XLD hanno un centro nero e una zona leggermente trasparente di colore rossiccio a causa del viraggio di colore dell'indicatore.

Nota: Le varianti di *Salmonella* negative per la produzione di H_2S (ad esempio *Salmonella paratyphi* A) che crescono sull'agar XLD sono di colore rosa, con un centro rosa più scuro. *Salmonella* spp. lattosio-positivo cresciuta su agar XLD è gialla con o senza annerimento centrale.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Incubare il secondo terreno selettivo solido alla temperatura appropriata ed esaminarlo dopo un periodo adeguato per verificare la presenza di colonie che, per le loro caratteristiche, siano considerate presunte colonie di *Salmonella*.

10.5 Conferma

10.5.1 Se si sono dimostrati affidabili, possono essere utilizzati i kit d'identificazione attualmente disponibili in commercio per l'esame biochimico di *Salmonella*. L'utilizzo di kit d'identificazione concerne la conferma biochimica delle colonie. I kit dovrebbero essere utilizzati seguendo le istruzioni del fabbricante.

Nota: L'identificazione delle colonie di *Salmonella* è in gran parte una questione di esperienza e il loro aspetto può variare in qualche modo non solo da specie a specie ma anche da un lotto di terreno di coltura selettivo all'altro.

10.5.2 Selezione delle colonie per la conferma

Per la conferma, prelevare da ciascuna piastra (due piastre di piccole dimensioni o una piastra di grandi dimensioni) di ciascun terreno selettivo (vedere punto 10.4) almeno una colonia considerata tipica o sospetta e altre quattro colonie se la prima è negativa.

Nel caso degli studi epidemiologici, si raccomanda di identificare almeno cinque colonie. Se su una piastra sono presenti colonie tipiche o sospette in quantità minore di cinque, prelevare tutte le colonie tipiche o sospette per la conferma.

Eseguire uno striscio delle colonie selezionate sulla superficie di piastre di agar nutritivo pre-essiccate (punto 7.2.5), in modo da consentire lo sviluppo di colonie ben isolate. Incubare le piastre inoculate (punto 10.4.3) a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore \pm 3 ore.

Per la conferma biochimica e sierologica, utilizzare colture pure.

10.5.3 Conferma biochimica

10.5.3.1 Generalità

Con un ago per inoculo, inoculare ciascuna delle colture ottenute dalle colonie selezionate come nel punto 10.5.2 nei terreni di coltura specificati dal punto 10.5.3.2 al punto 10.5.3.7.

10.5.3.2 Agar TSI (punto 7.2.6)

Strisciare la superficie a becco di clarino dell'agar ed inoculare il fondo mediante infissione. Incubare a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore \pm 3 ore.

Interpretare i cambiamenti del terreno di coltura come segue:



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

a) fondo

giallo	positivo per il glucosio (glucosio utilizzato)
rosso o invariato	negativo per il glucosio (glucosio non utilizzato)
nero	formazione di solfuro d'idrogeno
bolle o fratture	formazione di gas a partire dal glucosio

b) superficie inclinata

giallo	positivo per il lattosio e/o saccarosio (lattosio e/o saccarosio utilizzati)
rosso invariato	negativo per il lattosio e il saccarosio (né lattosio né saccarosio utilizzati)

Le colture tipiche di *Salmonella* mostrano superfici inclinate alcaline (rosse) con formazione di gas e fondo acido (giallo) con formazione, nel 90% circa dei casi, di solfuro d'idrogeno, che annerisce l'agar.

Quando si isola una coltura di *Salmonella* lattosio-positiva (vedere punto 6.4) la superficie del TSI inclinata è gialla. Pertanto, la conferma preliminare delle colture di *Salmonella* non deve essere basata solamente sui risultati della prova su agar TSI (vedere punto 10.5.3).

10.5.3.3 Agar addizionato con urea (punto 7.2.7)

Strisciare la superficie a becco di clarino dell'agar. Incubare a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore \pm 3 ore ed esaminare ad intervalli.

Se la reazione è positiva, la decomposizione dell'urea libera ammoniaca, la quale provoca il cambiamento del rosso fenolo dapprima in rosa e poi in un rosso ciliegia scuro. Spesso la reazione diviene visibile dopo un periodo di tempo da 2 a 4 ore.

10.5.3.4 Terreno per la decarbossilazione della L-lisina (punto 7.2.8)

Inoculare appena al di sotto della superficie del terreno liquido. Incubare a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore \pm 3 ore.

La comparsa di torbidità e di un colore purpureo dopo l'incubazione indicano una reazione positiva. Un colore giallo indica una reazione negativa.

10.5.3.5 Ricerca della β -galattosidasi (punto 7.2.9)

Mettere in sospensione l'intero contenuto di un'ansa per batteriologia comprendente la colonia sospetta in una provetta contenente 0,25 mL di soluzione salina (punto 7.2.13).



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Aggiungere una goccia di toluene ed agitare la provetta. Mettere la provetta nel bagnomaria (punto 8.6) a 37,0 °C e attendere circa 5 minuti. Aggiungere 0,25 mL del reagente per la ricerca della β -galattosidasi e mescolare.

Mettere la provetta nel bagnomaria a 37,0 °C e lasciar trascorrere 24 ore \pm 3 ore esaminando la provetta ad intervalli.

Un colore giallo indica una reazione positiva. Spesso la reazione diventa visibile dopo 20 minuti. Se si usano dischi di carta preparati (punto 7.2.9), seguire le istruzioni del fabbricante.

10.5.3.6 Terreno per la reazione di Voges-Proskauer (reazione VP) (punto 7.2.10)

Mettere in sospensione l'intero contenuto di un'ansa per batteriologia comprendente la colonia sospetta in una provetta sterile contenente 3 ml del terreno VP.

Incubare a 37 °C \pm 1°C per 24 ore \pm 3 ore.

Dopo l'incubazione, aggiungere due gocce della soluzione alla creatina, tre gocce della soluzione etanolica di 1-naftolo e quindi due gocce della soluzione di idrossido di potassio; agitare dopo l'aggiunta di ciascun reagente.

La formazione di un colore dal rosa al rosso vivace entro 15 minuti indica una reazione positiva.

10.5.3.7 Terreno addizionato per la reazione all'indolo (punto 7.2.11)

Inoculare la colonia sospetta in una provetta contenente 5 mL del terreno al triptone e triptofano.

Incubare a 37,0 °C \pm 1,0°C per 24 ore \pm 3 ore. Dopo l'incubazione aggiungere 1 mL di reagente di Kovacs.

La formazione di un anello rosso indica una reazione positiva. Un anello giallo-marrone indica una reazione negativa.

10.5.3.8 Interpretazione delle prove biochimiche

In linea generale, *Salmonella* spp. mostra le reazioni indicate nella Tabella 1

Tabella 1 – Interpretazione delle prove biochimiche

Prova ^a (dal punto 8.5.3.2 al punto 8.5.3.7)	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>S. paratyphi C</i>		Altri ceppi	
	reazione	% ^{b)}	reazione	% ^{b)}	reazione	% ^{c)}	reazione	% ^{c)}	reazione	% ^{b)}
Acido in TSI da glucosio	+	100	+	100	+		+		+	100
Gas in TSI da glucosio	- ^{d)}	0	+	100	+		+		+	92
Acido in TSI da lattosio	-	2	-	0	-		-		-	1
Acido in TSI da saccarosio	-	0	-	10	-		-		-	1
Produzione H ₂ S in TSI	+	97	-	0	+		+		+	92



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Idrolisi dell'urea	-	0	-	0	-	-	-	-	1
Decarbossilazione lisina	-	98	-	0	+	+	+	+	95
Reazione β -galattosidasi	-	0	-	0	-	-	-	-	2 ^e)
Reazione Voges-Proskauer	-	0	-	0	-	-	-	-	0
Produzione di indolo	-	0	-	0	-	-	-	-	1

a) dal riferimento (5)
b) queste percentuali indicano solamente che non tutti i sierotipi di *Salmonella* spp. isolati mostrano le reazioni marcate con + oppure -. Tali percentuali possono variare da paese a paese, tra i sierotipi causa di avvelenamento alimentare e all'interno di essi.
c) le percentuali non sono note dalla letteratura disponibile
d) *Salmonella typhi* è anossigenica
e) la sottospecie *Salmonella arizonae* di *Salmonella enterica* dà reazioni positive o negative al lattosio, ma sempre β -galattosidasi positiva. Per lo studio dei ceppi, può essere utile effettuare delle prove complementari.

10.5.4 Conferma sierologica e siero-tipizzazione

10.5.4.1 Generalità

La ricerca della presenza di antigeni O,Vi ed H di *Salmonella* spp. è sottoposta a prova mediante agglutinazione su vetrino con i sieri appropriati, a partire da colonie pure (punto 10.5.2) e dopo eliminazione di ceppi auto-agglutinanti. Utilizzare gli antisieri in conformità alle istruzioni del fabbricante se diversi dalla descrizione seguente.

10.5.4.2 Eliminazione dei ceppi auto-agglutinanti

Porre una goccia della soluzione salina (punto 7.2.13) su un vetrino pulito con cura. Nella goccia disperdere, per mezzo di un'ansa per batteriologia (punto 8.7), parte della colonia da sottoporre a prova, in modo da ottenere una sospensione torbida ed omogenea.

Nota: E' anche possibile disperdere parte della colonia da sottoporre a prova in una goccia d'acqua e quindi mescolare tale soluzione con una goccia di soluzione salina (punto 7.2.13).

Scuotere delicatamente il vetrino per un periodo di tempo compreso tra 30 e 60 secondi. Osservare il risultato contro uno sfondo nero, preferibilmente con l'aiuto di una lente d'ingrandimento.

Se i batteri hanno agglutinato in unità più o meno distinte, il ceppo si considera auto-agglutinante e non deve essere sottoposto alle prove successive poiché la ricerca degli antigeni è impossibile.

10.5.4.3 Prova per la ricerca degli antigeni O

Utilizzando una colonia pura, riconosciuta non auto-agglutinante, procedere secondo il punto 10.5.4.2, utilizzando una goccia del siero anti-O (punto 7.3) anziché la soluzione salina (punto 7.2.13).



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Se l'agglutinazione avviene, la reazione è considerata positiva.
Utilizzare i sieri poli- e monovalenti l'uno dopo l'altro.

10.5.4.4 Prova per la ricerca degli antigeni Vi

Procedere secondo il punto 10.5.4.2, ma utilizzando una goccia del siero anti-Vi (punto 7.3) anziché la soluzione salina.
Se l'agglutinazione avviene, la reazione è considerata positiva.

10.5.4.5 Prova per la ricerca degli antigeni H

Inoculare una colonia pura non auto-agglutinante nell'agar nutritivo semi-solido (punto 7.2.12).
Incubare il terreno di coltura a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore \pm 3 ore.
Utilizzare questa coltura per la ricerca degli antigeni H, procedendo secondo il punto 10.5.4.2, utilizzando una goccia del siero anti-H (punto 7.3) anziché la soluzione salina (punto 7.2.13).
Se l'agglutinazione avviene, la reazione è considerata positiva.

10.5.5 Interpretazione delle reazioni biochimiche e sierologiche

La Tabella 2 indica l'interpretazione delle prove di conferma (punto 10.5.3 e 10.5.4) sulle colonie utilizzate (punto 10.5.2).

Tabella 2 – Interpretazione delle prove di conferma

Reazioni biochimiche	Auto-agglutinazione	Reazioni sierologiche	Interpretazione
Tipica	no	Positivo antigene O, Vi o H	Ceppi ritenuti appartenenti al genere <i>Salmonella</i>
Tipica	no	Tutte le reazioni sono negative	Può trattarsi di <i>Salmonella</i> spp.
Tipica	sì	Non sottoposto a prova (vedere 8.5.4.2)	
Nessuna reazione tipica	no/sì	Positivo antigene O, Vi o H	
Nessuna reazione tipica	no/sì	Tutte le reazioni sono negative	Non ritenuti appartenenti al genere <i>Salmonella</i>

10.5.6 Conferma definitiva



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

I ceppi che sono ritenuti appartenenti al genere *Salmonella*, o che possono essere *Salmonella* (vedere Tabella 2), devono essere inviati ad un centro di riferimento riconosciuto per *Salmonella* per la loro tipizzazione definitiva.

L'invio deve essere corredato da tutte le informazioni possibili riguardanti il(i) ceppo(i) e se esso(i) è(sono) un focolaio o in una matrice della catena alimentare.

11. Espressione dei risultati

In conformità ai risultati dell'interpretazione, indicare la presenza o l'assenza di *Salmonella* spp. in un'aliquota di prova di x g o di x mL di prodotto (vedi ISO 7218).

Vedere Appendice C per i dati di precisione ottenuti dalla prova di interlaboratorio.

12. Rapporto di prova

Il rapporto di prova deve specificare:

3. il metodo di campionamento utilizzato;
4. qualsiasi scostamento nei terreni di arricchimento o nelle condizioni di incubazione;
5. tutte le condizioni operative non specificate nella presente norma oppure considerate facoltative, oltre ai particolari riguardanti eventuali incidenti che possono avere influenzato i risultati;
6. i risultati ottenuti.

Il rapporto di prova deve inoltre indicare se si è ottenuto un risultato positivo solo utilizzando un terreno d'isolamento (punto 7.2.4) non specificato nella presente norma.

13. Recupero

Non si applica

14. Limiti di rilevabilità

Presenza di *Salmonella* spp. in 10 g di campione, se i metodi ed i terreni di coltura descritti nella presente norma sono adottati scrupolosamente.

15. Assicurazione di qualità

Per verificare la capacità del laboratorio di individuare *Salmonella* spp. con i metodi ed i terreni di coltura descritti nella presente norma, introdurre dei campioni di riferimento all'interno di matracci di controllo contenenti il terreno di pre-arricchimento (vedere punto 7.2.1). Procedere con i matracci di controllo come per le colture da sottoporre a prova.

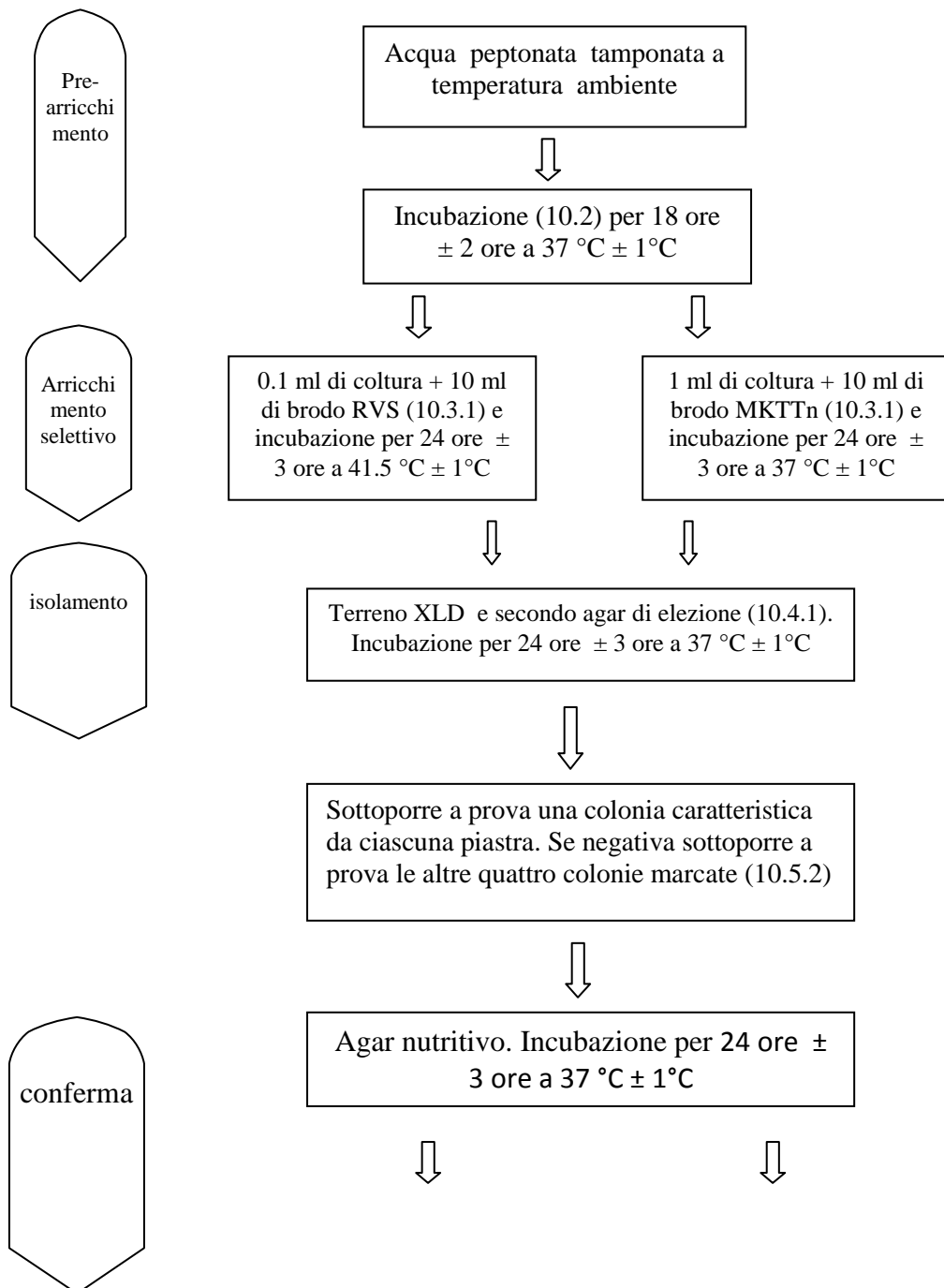


*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

16. APPENDICI al metodo 15

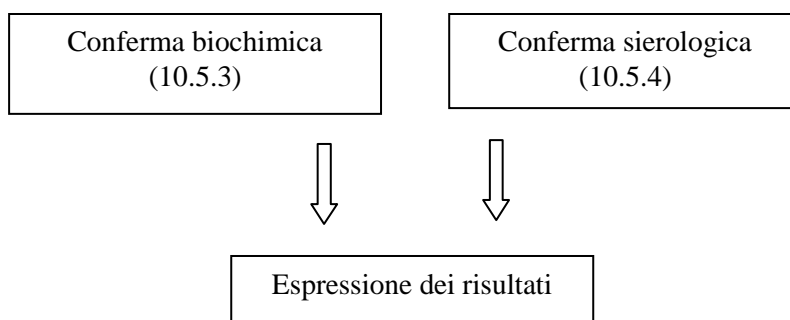
16.1 APPENDICE A – SCHEMA DI PROCEDIMENTO





*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI



16.2 APPENDICE B – COMPOSIZIONE E PREPARAZIONE DEI TERRENI DI COLTURA E DEI REAGENTI

B.1 Acqua peptonata tamponata

B.1.1 Composizione

idrolisato di caseina	10,0 g
cloruro di sodio	5,0 g
fosfato bisodico idrogenato dodecaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
fosfato diidrogenato di potassio (KH_2PO_4)	1,5 g
acqua distillata	1000 mL

B.1.2 Preparazione

Sciogliere i componenti nell'acqua distillata, se necessario mediante riscaldamento. Regolare il pH, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .

Distribuire il terreno in matracci (punto 8.9 di capacità adeguata per ottenere le aliquote di prova necessarie.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^\circ\text{C}$.

B.2 Terreno di Rappaport-Vassiliadis con soia (brodo RVS)

B.2.1 Soluzione A

B.2.1.1 Composizione



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

digerito enzimatico di soia	5,0 g
cloruro di sodio	8,0 g
fosfato diidrogenato di potassio (KH ₂ PO ₄)	1,4 g
fosfato idrogenato bi-potassico (K ₂ HPO ₄)	0,2 g
acqua	1000 mL

B.2.1.2 Preparazione

Sciogliere i componenti nell'acqua mediante riscaldamento a circa 70,0 °C. La soluzione deve essere preparata lo stesso giorno in cui è preparato il terreno completo RVS.

B.2.2 Soluzione B

B.2.2.1 Composizione

cloruro di magnesio esaidrato (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	400,0 g
acqua	1000 mL

B.2.2.2 Preparazione

Sciogliere il cloruro di magnesio nell'acqua.

Poiché questo sale è molto igroscopico, è consigliabile sciogliere l'intero contenuto di MgCl₂ x 6 H₂O, prelevato da un recipiente appena aperto, secondo la formula. Per esempio, 250 g di MgCl₂ x 6 H₂O sono aggiunti a 625 di acqua, formando una soluzione del volume totale di 788 mL ed una concentrazione di massa di circa 31,7 g per 100 mL di MgCl₂ x 6 H₂O.

La soluzione può essere conservata in una bottiglia di vetro scuro con tappo a chiusura ermetica a temperatura ambiente per almeno 2 anni.

B.2.3 Soluzione C

B.2.3.1 Composizione

ossalato di verde malachite	0,4 g
acqua	100 mL

B.2.3.2 Preparazione

Sciogliere l'ossalato di verde malachite nell'acqua.

La soluzione può essere conservata in una bottiglia di vetro scuro a temperatura ambiente per almeno 8 mesi.

B.2.4 Terreno completo



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

B.2.4.1 Composizione

soluzione A (punto B.2.1)	1000 mL
soluzione B (punto B.2.2)	100 mL
soluzione C (punto B.2.3)	10 mL

B.2.4.2 Preparazione

Aggiungere a 1000 mL di soluzione A, 100 mL di soluzione B e 10 mL di soluzione C.

Regolare il pH, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia $5,2 \pm 0,2$.

Prima dell'uso, distribuire in provette (punto 8.9) in quantità di 10 mL.

Sterilizzazione per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $115 \text{ }^\circ\text{C}$.

Conservare il terreno così preparato a $3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Utilizzare il terreno il giorno della sua preparazione.

Nota: La composizione del terreno finale è: digerito enzimatico di soia 4,5 g/L; cloruro di sodio 7,2 g/L; fosfato diidrogenato di potassio (KH_2PO_4) 1,44 g/L; cloruro di magnesio anidro (MgCl_2) 13,4 g/L o cloruro di magnesio esaidrato ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) 28,6 g/L; ossalato di verde malachite 0,036 g/L.

B.3 Brodo di Muller-Kauffmann al tetrionato-novobiocina (brodo MKTTn) (7)

B.3.1 Terreno di base

B.3.1.1 Composizione

estratto di carne	4,3 g
digerito enzimatico di caseina	8,6 g
cloruro di sodio (NaCl)	2,6 g
carbonato di calcio CaCO_3	38,7 g
tiosolfato di sodio pentaidrato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	47,8 g
bile di bue per batteriologia	4,78 g
verde brillante	9,6 mg
acqua	1000 mL

B.3.1.2 Preparazione

Sciogliere i componenti di base disidratati o il terreno completo disidratato nell'acqua mediante ebollizione per 5 minuti.

Regolare il pH, se necessario, in modo tale che sia $8,0 \pm 0,2$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Mescolare con cura il terreno.

Il terreno di base può essere conservato per 4 settimane a $3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

B.3.2 Soluzione iodio-ioduro

B.3.2.1 Composizione

iodio	20,0 g
ioduro di potassio (KI)	25,0 g
acqua	100 mL

B.3.2.2 Preparazione

Sciogliere completamente lo ioduro di potassio in 10 mL d'acqua, quindi aggiungere lo iodio e diluire fino a 100 mL con acqua sterile. Non riscaldare.

Conservare la soluzione preparata al buio a temperatura ambiente in un contenitore chiuso ermeticamente.

B.3.3 Soluzione di novobiocina

B.3.3.1 Composizione

Sale sodico di novobiocina 0,04 g
Acqua 5 mL

B.3.3.2 Preparazione

Sciogliere il sale sodico di novobiocina in acqua e sterilizzare mediante filtrazione. Conservare fino a 4 settimane a $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.3.4 Terreno completo

B.3.4.1 Composizione

terreno di base (punto B.3.1)	1000 mL
soluzione iodio-ioduro (punto B.3.2)	20 mL
soluzione di novobiocina (punto B.3.3)	5 mL

B.3.4.2 Preparazione

Aggiungere in condizioni sterili 5 mL della soluzione di novobiocina (punto B.3.3) a 1000 mL di terreno di base (punto B.3.1). Mescolare, quindi aggiungere 20 mL della soluzione iodo-ioduro (punto B.3.2). Mescolare con cura.

Distribuire il terreno in condizioni sterili in matracci (punto 8.9) sterili di capacità adeguata per ottenere le aliquote di prova necessarie.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Il terreno completo deve essere utilizzato lo stesso giorno della sua preparazione.

B.4 Agar XLD (Xilosio Lisina Desossicolato) (7)

B.4.1 Terreno di base

B.4.1.1 Composizione

estratto di lievito in polvere	3,0 g
cloruro di sodio (NaCl)	5,0 g
xilosio	3,5 g
lattosio	7,5 g
saccarosio	7,5 g
cloruro monoidrato di Lisina	5,0 g
tiosolfato di sodio	6,8 g
citrato di ferro (III) ammoniacale	0,8 g
rosso fenolo	0,08 g
sodio desossicolato	2,5 g
agar	da 9 a 18 g ¹⁾
acqua	1000 mL

¹⁾ secondo il potere gelificante dell'agar

B.4.1.2 Preparazione

Sciogliere i componenti di base disidratati o il terreno completo di base disidratato nell'acqua, mediante riscaldamento con frequente agitazione fino ad ebollizione del terreno. Evitare il surriscaldamento.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $7,4 \pm 0,2$ a 25°C.

Versare il terreno di base in provette o matracci (punto 6.9) di capacità appropriata.

Riscaldare con frequente agitazione fino all'ebollizione del terreno e allo scioglimento dell'agar.

Non surriscaldare.

B.4.2 Preparazione delle piastre di agar

Trasferire immediatamente nel bagnomaria (punto 8.5) da 44 °C a 47 °C, agitare e versare nelle piastre. Lasciare solidificare.

Immediatamente prima dell'uso, essiccare accuratamente le piastre di agar (preferibilmente senza coperchi e con la superficie dell'agar rivolta verso il basso) nel forno (punto 8.2) impostato ad una temperatura tra 37°C e 55 °C fino a quando la superficie dell'agar è asciutta.

Conservare le piastre fino a 5 giorni a $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

B.5 Agar nutritivo

B.5.1 Composizione

estratto di carne	3,0 g
peptone	5,0 g
agar	da 9 a 18 g ¹⁾
acqua	1000 mL

¹⁾ secondo il potere gelificante dell'agar

B.5.2 Preparazione

Sciogliere i componenti o il terreno completo disidratato nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $7,0 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.

Distribuire il terreno di coltura in provette o bottiglie (punto 8.9) di capacità adeguata.

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^{\circ}\text{C}$.

B.5.3 Preparazione delle piastre di agar nutritivo

Trasferire circa 15 mL del terreno fuso in piastre Petri piccole (punto 8.11) sterili e procedere come nel punto B.4.2.

B.6 Agar addizionato con tre zuccheri e ferro (Agar TSI)

B.6.1 Composizione

estratto di carne	3,0 g
estratto di lievito	3,0 g
peptone	20,0 g
cloruro di sodio (NaCl)	5,0 g
lattosio	10,0 g
saccarosio	10,0 g
glucosio	1,0 g
citrato di ferro (III)	0,3 g
tiosolfato di sodio	0,3 g
rosso fenolo	0,024 g
agar	da 9 a 18 g ¹⁾
acqua	1000 mL

¹⁾ secondo il potere gelificante dell'agar



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

B.6.2 Preparazione

Sciogliere i componenti o il terreno completo di base disidratato nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $7,4 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.

Distribuire il terreno in quantità di 10 mL nelle provette o nelle piastre di prova.

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^{\circ}\text{C}$.

Lasciare sedimentare in posizione inclinata per produrre un fondo dello spessore da 2,5 cm a circa 5 cm.

B.7 Agar addizionato con urea (Agar di Christensen)

B.7.1 Terreno di base

B.7.1.1 Composizione

peptone	1,0 g
glucosio	1,0 g
cloruro di sodio (NaCl)	5,0 g
fosfato diidrogenato di potassio (KH ₂ PO ₄)	2,0 g
rosso fenolo	0,012 g
agar	da 9 a 18 g ¹⁾
acqua	1000 mL

¹⁾ secondo il potere gelificante dell'agar

B.7.1.2 Preparazione

Sciogliere i componenti o il terreno completo di base disidratato nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $6,8 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^{\circ}\text{C}$.

B.7.2 Soluzione di urea

B.7.2.1 Composizione

Urea	400 g
Acqua, a un volume finale di	1000 mL



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

B.7.2.2 Preparazione

Sciogliere l'urea nell'acqua. Sterilizzare mediante filtrazione e verificare la sterilità. Vedere punto 9.3.2 della ISO 7218:1996.

B.7.3 Terreno completo

B.7.3.1 Composizione

terreno di base (punto B.7.1)	950 mL
soluzione di urea (punto B.7.2)	50 mL

B.7.3.2 Preparazione

In condizioni sterili, aggiungere la soluzione di urea al terreno di base, precedentemente fuso e raffreddato ad una temperatura compresa tra 44 °C e 47 °C.

Distribuire il terreno completo in quantità di 10 mL nette nelle provette sterili (punto 8.9).

Lasciare sedimentare in posizione inclinata.

B.8 Terreno per la decarbossilazione della L-Lisina

B.8.1 Composizione

cloruro monoidrato di L-lisina	5,0 g
estratto di lievito	3,0 g
glucosio	1,0 g
bromo cresolo porpora	0,015 g
acqua	1000 mL

B.8.2 Preparazione

Sciogliere i componenti nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $6,8 \pm 0,2$ a 25,0°C.

Distribuire il terreno in quantità da 2 mL a 5 mL in provette di coltura strette (punto 8.9) con tappi a vite.

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a 121,0 °C.

B.9 Reagente per la produzione di β -galattosidasi

B.9.1 Soluzione tampone

B.9.1.1 Composizione

fosfato diidrogenato di sodio (NaH_2PO_4)	6,9 g
---	-------



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

idrossido di sodio, soluzione da 10 mol/L	circa 3 mL
acqua, a un volume finale di	50 mL

B.9.1.2 Preparazione

Sciogliere il fosfato diidrogenato di sodio in circa 45 ml di acqua in un matraccio volumetrico.
Con la soluzione di idrossido di sodio, regolare il pH fino a portarlo a $7,0 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.
Aggiungere acqua fino ad ottenere un volume finale di 50 mL.

B.9.2 Soluzione di ONPG

B.9.2.1 Composizione

o-nitrofenil-beta-D-galattopiranoside (ONPG)	0,08 g
acqua	15 mL

B.9.2.2 Preparazione

Sciogliere l'ONPG nell'acqua a 50°C circa.
Raffreddare la soluzione.

B.9.3 Reagente completo

B.9.3.1 Composizione

Soluzione tampone (punto B.9.1)	5 mL
Soluzione di ONPG (punto B.9.2)	15 mL

B.9.3.2 Preparazione

Aggiungere la soluzione tampone alla soluzione di ONPG,

B.10 Reagenti per la reazione di Voges-Proskauer (reazione VP)

B.10.1 Terreno di VP

B.10.1.1 Composizione

peptone	7,0 g
glucosio	5,0 g
fosfato idrogenato bipotassico (K_2HPO_4)	5,0 g
acqua	1000 mL

B.10.1.2 Preparazione



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Sciogliere i componenti nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $6,9 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.

Distribuire 3 mL del terreno in ciascuna delle provette (punto 8.9).

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^{\circ}\text{C}$.

B.10.2 Soluzione di creatina (N-amidinosarcosina)

B.10.2.1 Composizione

creatina monoidrato	0,5 g
acqua	100 mL

B.10.2.2 Preparazione

Sciogliere la creatina monoidrato nell'acqua.

B.10.3 Soluzione etanolica di 1-naftolo

B.10.3.1 Composizione

1-naftolo	8,0 g
etanolo al 96% (V/V)	100 mL

B.10.3.2 Preparazione

Sciogliere l'1-naftolo nell'etanolo.

B.10.4 Soluzione di idrossido di potassio

B.10.4.1 Composizione

idrossido di potassio	40,0 g
acqua	100 mL

B.10.4.2 Preparazione

Sciogliere l'idrossido di potassio nell'acqua.

B.11 Reagenti per la produzione dell'indolo

B.11.1 Terreno al triptone e triptofano

B.11.1.1 Composizione



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

triptone	10,0 g
cloruro di sodio	5,0 g
DL-triptofano	1,0 g
acqua	1000 mL

B.11.1.2 Preparazione

Sciogliere i componenti nell'acqua in ebollizione.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $7,5 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.

Distribuire 5 mL del terreno in ciascuna delle provette (punto 8.9).

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^{\circ}\text{C}$.

B.11.2 Reagente di Kovacs

B.11.2.1 Composizione

4-dimetilammobenzaldeide	5,0 g
acido cloridrico, $\rho =$ da 1.18 a 1.19 g/mL	25 mL
2-metilbutano-2-olo	75 mL

B.11.2.2 Preparazione

Mescolare i componenti.

B.12 Agar nutritivo semi-solido

B.12.1 Composizione

estratto di carne	3,0 g
peptone	5,0 g
agar	da 4 a 9 g ¹⁾
acqua	1000 mL

¹⁾ secondo il potere gelificante dell'agar

B.12.2 Preparazione

Sciogliere i componenti nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $7,0 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.

Distribuire il terreno di coltura in matracci (punto 8.9) di capacità adeguata.

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^{\circ}\text{C}$.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

B.12.3 Preparazione delle piastre di agar

Porre circa 15 mL del terreno di coltura (punto 8.11), preparato di recente, in piastre Petri piccole sterili. Non fare essiccare le piastre.

B.13 Soluzione salina fisiologica

B.13.1 Composizione

cloruro di sodio (NaCl)	8,5 g
acqua	1000 mL

B.13.2 Preparazione

Sciogliere il cloruro di sodio nell'acqua.

Regolare il pH se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a $7,0 \pm 0,2$ a $25,0^{\circ}\text{C}$.

Distribuire la soluzione in matracci o provette (punto 8.9) in modo tale che esse contengano da 90 mL a 100 mL di soluzione dopo la sterilizzazione.

Sterilizzare per 15 minuti nell'autoclave (punto 8.1) impostata a $121,0^{\circ}\text{C}$.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

16.3 APPENDICE C (informativa)

RISULTATI DELLA PROVA DI INTER-LABORATORIO

Nel 2000 è stata organizzata una prova inter-laboratorio internazionale da AFSSA Ploufragan in Europa e da BioControl Systems negli Stati Uniti, nell'ambito del progetto europeo SMT CT 96 2098. La prova ha interessato 11 laboratori in 9 Paesi d'Europa e 10 laboratori negli Stati Uniti. I risultati sono consultabili nella norma internazionale UNI EN ISO 6579 del settembre 2008, nella versione italiana del marzo 2010, all'Appendice C.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

16.4 APPENDICE D (normativa)

RICERCA DI *SALMONELLA* SPP. IN FECI ANIMALI E IN CAMPIONI AMBIENTALI DALLO STADIO DI PRODUZIONE PRIMARIA

D.1 INTRODUZIONE

Il metodo indicato nel corpo principale della presente norma non è sempre idoneo per l'isolamento di *Salmonella* spp. da tutte le matrici indicate di fertilizzanti (ammendanti) e di materie prime usate per la loro fabbricazione.

In particolare, la presente Appendice è applicabile alla ricerca di *Salmonella* spp. in :

7. feci animali (per esempio di pollame, suini, bovini) e
8. campioni ambientali dello stadio di produzione primaria (quale per esempio polvere)

Il metodo nella presente Appendice si basa sul punto 10, con un terreno di arricchimento selettivo diverso. Pertanto, ove possibile, si fa riferimento al punto 10.

Il terreno di arricchimento selettivo descritto nella presente Appendice (terreno semi-solido di Rappaport-Vassiliadis modificato: MRSV) è previsto per la ricerca di *Salmonella* spp. mobili e non è appropriato per la ricerca di *Salmonella* spp. immobili.

Nota: I biovar di *Salmonella* immobili di *Salmonella gallinarum* (biovar *gallinarum* di *Salmonella gallinarum* e biovar *pullorum* di *Salmonella pullorum*) non sembrano sopravvivere a lungo nei campioni ambientali e sono pertanto ricercati raramente in campioni di feci o campioni ambientali (quale ad esempio la polvere), indipendentemente dal metodo. Il numero di altri serovar di *Salmonella* spp. immobile in campioni fecali sembra essere generalmente basso. Per esempio nel riferimento bibliografico (7) in cui sono stati analizzati circa 1000 campioni fecali di pollame e circa 900 campioni fecali di polli da carne, meno dell'1% del numero totale di campioni è risultato positivo in un brodo selettivo e allo stesso tempo negativo nel MSR (e probabilmente immobile). Risultati simili sono stati ottenuti in uno studio olandese con circa 3200 campioni fecali di suini (dati non pubblicati). D'altra parte, nel caso dello studio di cui al riferimento (7), non sarebbero stati rilevati quasi il 40 % dei campioni positivi (cioè falsi negativi) se fosse stato utilizzato solo un brodo selettivo (in questo caso Rappaport-Vassiliadis) invece di un terreno semisolido.

D.2 PRINCIPIO

D.2.1 Generalità



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

La ricerca di *Salmonella* in feci animali e in campioni dello stadio di produzione primaria prevede quattro fasi.

D.2.2 Pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo

Inoculare l'aliquota di prova in acqua peptonata tamponata (Buffered Peptone Water, BPW) a temperatura ambiente, quindi procedere all'incubazione a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 18 ore ± 2 ore.

D.2.3 Arricchimento in terreno semisolido selettivo

Inoculare le piastre di agar MSR/V (terreno Rappaport-Vassiliadis semisolido modificato) con la coltura ottenuta come nel punto D.2.2.

Procedere all'incubazione del MSR/V a $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore ± 3 ore. Se una piastra è negativa dopo 24 ore, è incubata per altre 24 ore ± 3 ore.

D.2.4 Isolamento selettivo e identificazione

Inoculare le colture ottenute come nel punto D.2.3 in due terreni solidi selettivi:

- agar XLD (Xilosio Lisina Desossicolato);
- qualsiasi altro terreno selettivo solido complementare all'agar XLD (vedere punto 6.4).

L'agar XLD è incubato a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ed esaminato dopo 24 ore ± 3 ore. Il secondo terreno selettivo è incubato in conformità alle istruzioni del fabbricante.

D.2.5 Conferma d'identità

Subcolture delle colonie presunte di *Salmonella*, isolate secondo quanto descritto nel punto D.2.4, e conferma della loro identità mediante prove biochimiche e sierologiche appropriate.

D.3 TERRENI DI COLTURA, REAGENTI E SIERI

D.3.1 Generalità

Per le pratiche di laboratorio correnti, vedere la ISO 7218.

Tutti i terreni ed i reagenti necessari per la presente appendice sono descritti nell'Appendice B, eccetto il terreno MRSV (terreno Rappaport-Vassiliadis semisolido modificato) che è descritto nel punto D.3.2. In alternativa, possono essere utilizzati terreni completi disidratati o diluenti. Seguire, in tal caso, le istruzioni del fabbricante.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Nota: La composizione del MRSV descritta nel riferimento bibliografico (8), conteneva 20 mg/L di novobiocina. Tuttavia, da un punto di vista scientifico, si preferiscono 10mg/L di novobiocina. In studi condotti presso il CRL-Salmonella, sono stati ottenuti più risultati positivi a *Salmonella* spp. in campioni di feci suine quando sottoposti a prova con MRSV contenente 10 mg/L rispetto a MRSV contenente 20 mg/L di novobiocina (vedere riferimento 9). Inoltre, quando sono state sottoposte a prova feci di animali diversi (suini, pollame, bovini) e polvere contaminata naturalmente, le zone di migrazione nell'MSRV contenente 10 mg/L di novobiocina sono state (molto) più grandi rispetto a quelle nel MRSV contenente 10 mg/L di novobiocina (riferimento 9). L'influenza della novobiocina sulla mobilità batterica è stata descritta precedentemente nel riferimento (10).

Per la preparazione dei terreni agarizzati di isolamento selettivo (vedere B.4, agar XLD), si possono utilizzare piastre Petri di dimensioni normalizzate (90 o 100 mm) invece di piastre Petri di grandi dimensioni (140 mm).

D.3.2 Terreno MSR/V (terreno Rappaport-Vassiliadis semi-solido modificato)

D.3.2.1 Terreno di base

D.3.2.1.1 Composizione

digerito enzimatico di tessuto animale e vegetale	4,6 g
idrolisato acido di caseina	4,6 g
cloruro di sodio (NaCl)	7,3 g
ortofosfato monopotassico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
cloruro di magnesio anidro (MgCl ₂)	10,9 g
ossalato di verde malachite	0,04 g
agar	2,7 g
acqua	1000 mL

D.3.2.1.2 Preparazione

Mettere in sospensione gli ingredienti nell'acqua.

Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione. **Non sterilizzare in autoclave.**

Non tenere il terreno a temperature elevate più a lungo del necessario.

Raffreddare il terreno a 47 °C - 50 °C.

D.3.2.2 Soluzione di novobiocina



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

D.3.2.2.1 Composizione

sale sodico dinovobiocina	0,05 g
acqua	10 mL

D.3.2.2.2 Preparazione

Sciogliere il sale sodico di novobiocina in acqua.

Sterilizzare mediante filtrazione attraverso un filtro con dimensioni dei pori di 0,22 µm.

La soluzione può essere conservata fino a 4 settimane a 5 °C ± 3 °C o in piccole porzioni (per esempio di 2 mL) a -20°C per un periodo massimo di un anno.

D.3.2.3 Terreno completo

D.3.2.3.1 Composizione

Terreno di base (punto D.3.2.1)	1000 mL
Soluzione di novobiocina (punto D.3.2.2)	2 mL

D.3.2.3.2 Preparazione

Aggiungere in condizioni sterili 2 mL della soluzione di novobiocina (punto D.3.2.2) a 1000 mL di terreno di base (punto D.3.2.1) ad una temperatura compresa tra 47 °C e 50 °C. Mescolare con cura.

Il pH finale deve essere 5.2 (da 5.1 a 5.4) a una temperatura compresa tra 20 °C e 25 °C.

Versare in piastre Petri con diametro di 90 mm fino ad un volume da 15 a 20 mL.

Lasciare che il terreno solidifichi prima di spostare e maneggiare con attenzione.

Conservare le piastre, **con la superficie rivolta verso l'alto**, fino a 2 settimane a 5 °C ± 3 °C al buio.

Non capovolgere le piastre perché l'agar semisolido è troppo liquido per consentirlo.

Non deve essere utilizzata alcuna piastra in cui l'agar semisolido si sia liquefatto o frammentato.

Immediatamente prima dell'uso, e solo se necessario, essiccare accuratamente la superficie delle piastre di agar, per esempio collocandole senza coperchio e con la superficie dell'agar **rivolta verso l'alto** in una cappa microbiologica a flusso d'aria laminare. Fare attenzione a non essiccare eccessivamente il terreno.

D.4 APPARECCHIATURA E VETRERIA



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Utilizzare l'apparecchiatura elencata al punto 8 e la seguente.

D.4.1 Anse per batteriologia sterili di 1 μ L.

D.5 CAMPIONAMENTO

Vedere il metodo di campionamento.

D.6 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI PROVA

Vedere il punto 9.

In generale, una quantità di campione è aggiunta una quantità di acqua peptonata tamponata per ottenere una diluizione di 1/10 (per esempio 25 g di campione aggiunti a 225 mL di acqua peptonata tamponata). Tuttavia, per alcuni tipi di campione può essere necessario utilizzare un altro rapporto.

D.7 PROCEDIMENTO

D.7.1 Pre-arricchimento non selettivo

Pre-riscaldare l'acqua peptonata tamponata a temperatura ambiente prima dell'utilizzo.

Miscelare bene i campioni con il mezzo più idoneo per il tipo di campione.

Pesare il campione e aggiungerlo alla quantità appropriata di acqua peptonata tamponata (vedere punto D.6). Incubare i vasi a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 18 ore \pm 2 ore.

D.7.2 Arricchimento selettivo

Portare le piastre di MRSV a temperatura ambiente se sono state conservate ad una temperatura minore.

Inoculare le piastre di MRSV con 3 gocce di coltura di acqua peptonata tamponata incubata. Le 3 gocce dovrebbero pesare complessivamente 0.1 ml e dovrebbero essere collocate separatamente e alla stessa distanza sulla superficie del terreno.

Quando si prende una subcoltura dall'acqua peptonata tamponata, è molto importante non agitare i campioni di particolato. Pertanto, i contenitori dovrebbero essere spostati con cautela e non miscelati, agitati o mescolati. L'obiettivo è estrarre un inoculo dal volume più grande di fluido libero, il più vicino all'interfaccia tra il contenitore e la superficie di coltura, ma è consigliabile andare più a fondo in presenza di particolati galleggianti sulla superficie.

Incubare le piastre di MSRVS inoculate a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 24 ore \pm 3 ore.

Non capovolgere le piastre.



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITÀ E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Le piastre positive mostrano una zona torbida, grigio bianca che si estende dalla goccia inoculata. La zona torbida è caratterizzata da un alone bianco con un bordo chiaramente definito. Se le piastre sono negative dopo 24 ore, incubare nuovamente per ulteriori 24 ore \pm 3 ore.

D.7.3 Isolamento selettivo

Portare le piastre di agar XLD (Xilosio Lisina Desossicolato) e il secondo terreno d'isolamento selettivo (vedere punto 7.2.4.2) a temperatura ambiente se sono state conservate ad una temperatura minore. Se necessario, essiccare la superficie delle piastre prima dell'utilizzo.

Piastre MSRV sub colturali positive:

osservare la piastra di MSRV (se necessario su una superficie bianca trasparente o su un tavolo luminoso). Determinare il punto più lontano di diffusione della crescita opaca dai punti d'inoculazione e immergere un'ansa da 1 μ l appena all'interno del bordo della crescita opaca. Ritirare l'ansa accertandosi di non estrarre grossi blocchi di MSRV. Inoculare la superficie di una piastra di XLD in modo da ottenere colonie ben isolate. Procedere allo stesso modo con il secondo terreno d'isolamento selettivo utilizzando una nuova ansa sterile.

Nota: Isolando il materiale di piccole dimensioni dall'MSRV (utilizzando un'ansa da 1 μ L è possibile ottenere colonie ben isolate utilizzando piastre Petri di dimensioni normalizzate (da 90 mm a 100 mm) con agar d'isolamento selettivo. L'utilizzazione di piastre grandi (140 mm) non è pertanto necessaria.

Incubare le piastre di XLD capovolte a 37 °C \pm 1 °C per 24 ore \pm 3 ore.

Incubare il secondo terreno d'isolamento selettivo in conformità alle istruzioni del fabbricante.

Rimettere le piastre di MRSV negative nell'incubatore a 41,5 °C \pm 1 °C e incubare per ulteriori 24 ore \pm 3 ore. Eseguire la procedura d'isolamento selettivo se, dopo 48 ore d'incubazione, queste piastre di MSRV diventano positive.

Le colonie tipiche di *Salmonella* spp. cresciute su agar XLD hanno un centro nero e una zona leggermente trasparente di colore rossiccio a causa del viraggio di colore dell'indicatore.

Le varianti negative di *Salmonella* spp. alla produzione di H₂S (per esempio *Salmonella paratyphi* A) cresciute su agar XLD sono rosa con un centro rosa più scuro. I *Salmonella* lattosio-positivi cresciuti su agar XLD sono gialle con o senza annerimento (vedere anche il punto 10.4.4).

Esaminare il secondo terreno d'isolamento selettivo dopo il tempo d'incubazione appropriato per verificare la presenza di colonie che, per le loro caratteristiche, siano considerate colonie di *Salmonella*.

D.7.4 Conferma



Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

DIPARTIMENTO DELL'ISPettorato CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Per la conferma di colonie tipiche, isolate su terreni d'isolamento selettivo, seguire le istruzioni fornite nel punto 10.5. Nel punto 10.5.2 è prescritto di eseguire uno striscio delle colonie isolate da terreni d'isolamento selettivo su agar nutritivo prima di eseguire la conferma biochimica. Tuttavia, questa ulteriore fase colturale non è necessaria se sono disponibili colonie ben isolate (di una coltura pura) nei terreni d'isolamento selettivo. In questo caso, eseguire la conferma biochimica direttamente su una colonia tipica (sospetta), ben isolata, di ciascun terreno d'isolamento selettivo.

D.8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Vedere punto 11.

D.9 RAPPORTO DI PROVA

Vedere punto 12.

D.10 ASSICURAZIONE DI QUALITA'

Vedere il punto 15.

Per le prove di prestazione dei terreni, seguire le raccomandazioni della ISO/TS 11133-1 e della ISO/TS 11133-2. Tuttavia, in questi documenti sono fornite procedure per brodi selettivi e per terreni di agar selettivi per la ricerca di *Salmonella*, ma non per terreni semisolidi come l'MRSV. La procedura indicata sotto può essere utilizzata per le prove di prestazione dell'MRSV e si basa sulla procedura e i ceppi di prova descritti per i terreni selettivi (arricchimento) per la ricerca di *Salmonella* (per esempio RVS e MKTTn, vedere punti B.2 e B.3) nella ISO/TS 11133-2.

La procedura indicata sotto è stata estrapolata dalla ISO/TS 11133-2:2003, punto 7.4.2.1, ma con una concentrazione adattata dei ceppi di prova. I ceppi di prova, la procedura e i criteri sono riepilogati nella Tabella D.1.

- Inoculazione di microrganismi bersaglio: inoculare nell'MSRV ciascun organismo di prova con circa 10^4 ufc/0.1 mL (per la preparazione dell'inoculo, vedere ISO/TS 11133-2:2003, punto 7.2.1).
- Inoculazione di microrganismi non bersaglio: inoculare nell'MSRV ciascun organismo di prova avente da 10^5 a 10^6 ufc/0.1mL (per la preparazione dell'inoculo vedere ISO/TS 11133-2:2003, punto 7.2.1).
- Inoculazione di microrganismi bersaglio e non bersaglio come coltura mista: inoculare nell'MSRV una coltura mista contenente circa 10^4 ufc/0.1 mL di microrganismi bersaglio e da 10^5 a 10^6 ufc/0.1mL di microrganismi non bersaglio (per la preparazione dell'inoculo, vedere ISO/TS 11133-2:2003, punto 7.2.1).



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

Incubare le piastre di MSR/V a $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e valutare le piastre dopo 24 ore ± 3 ore e dopo 48 ore ± 6 ore .

TABELLA D.1 – Prove di prestazione di MSR/V (ceppi di prova, procedura e criteri per l'assicurazione di qualità).

Funzione	Ceppi di controllo	Concentrazione finale nell'inoculo di 0.1ml	Incubazione di MSR/V	Criteri
specificità	<i>S.typhimurium</i> ATCC 14028 o <i>S.enteritidis</i> ATCC13076	10^4 ufc	$41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 2 x 24 ore ± 3 ore	zona torbida grigio-bianca che si estende dalla goccia inoculata. Dopo 48 ore le zone torbide delle 3 gocce sono (quasi) completamente migrate sulla piastra.
selettività	<i>E.coli</i> ATCC 25922 o ATCC 8739 <i>E. faecalis</i> ATCC29212 o ATCC 19433	da 10^5 a 10^6 ufc	$41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 2 x 24 ore ± 3 ore	possibile crescita nel punto della goccia inoculata senza una zona torbida.
produttività	<i>S.typhimurium</i> ATCC 14028 o <i>S.enteritidis</i> ATCC 13076 + <i>E.coli</i> ATCC 25922 o ATCC 8739 + <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	10^4 ufc $10^5 - 10^6$ ufc $10^5 - 10^6$ ufc	$41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 2 x 24 ore ± 3 ore	Zona torbida grigio-bianca che si estende dalla goccia inoculata. Dopo 48 ore le zone torbide delle 3 gocce sono (quasi) completamente migrate sulla piastra. Possibile extra: subcoltura con ansa di 1 μ l all'interno del bordo della crescita opaca e diffusione su XLD. Incubare a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per 24 ore ± 3 ore. Criteri: crescita di colonie caratteristiche in maggioranza

Nota: in generale, *S. typhimurium* mostra una crescita più rapida e zone di migrazione più ampie rispetto a *S.enteritidis*.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

16.5 APPENDICE E (normativa)

**RIFERIMENTI NORMATIVI ALLE PUBBLICAZIONI INTERNAZIONALI E ALLE
PUBBLICAZIONI EUROPEE CORRISPONDENTI**

La presente norma rimanda, mediante riferimenti datati e non, a disposizioni contenute in altre pubblicazioni. Tali riferimenti normativi sono citati nei punti appropriati del testo e vengono di seguito elencati. Per quanto riguarda i riferimenti datati, successive modifiche o revisioni apportate a dette pubblicazioni valgono unicamente se introdotte nella presente norma come aggiornamento o revisione. Per i riferimenti non datati vale l'ultima edizione della pubblicazione alla quale si fa riferimento (compresi gli aggiornamenti).

Nota: Quando una pubblicazione internazionale è stata modificata mediante modifiche comuni, indicate come (mod.), si applica la corrispondente EN/HD.

pubblicazione	anno	titolo	EN	anno
ISO 6887-1	1999	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part I: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions	EN ISO 6887-1	1999
ISO 8261	2001	Milk and milk products .General guidance for the Preparation of test samples, initial suspensions and Decimal dilutions for microbiological examination	EN ISO 8261	2001

BIBLIOGRAFIA

- (1) ISO 6887-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
- (2) ISO 6887-3 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
- (3) ISO 6887-4 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products fish and fishery products.



*Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*

DIPARTIMENTO DELL' ISPETTORATO CENTRALE DELLA TUTELA DELLA QUALITA' E
REPRESSIONE FRODI DEI PRODOTTI AGRO-ALIMENTARI
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE E DEL CONTRASTO
ALLE FRODI AGRO-ALIMENTARI

- (4) Ewing W.H. and Ball M.M. 1996. The biochemical reactions of the genus *Salmonella*. National Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
- (5) Feldsine P. et al. 2001. Recovery of *Salmonella* in selected foods by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC International Official Method of Analysis: Collaborative study. J. AOAC Int.
- (6) Culture Media for Food Microbiology. In: Progress in Industrial Microbiology, Vol. 34.(Eds. Corry J.E.L., Curtis G.D.W. and Baird R.M.). Elsevier, Amsterdam, 1995.
- (7) Voogt N., Raes M., Wannet W.J.B., Henken A.M., Van de Giessen A.W. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. Letters in Applied Microbiology 32, 89-92.
- (8) De Smedt J.M., Bolderdijk R.F., Rappold H., Lautenschlaeger D. 1986. Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. Journal of Food Protection 49(7), 510-514.
- (9) Veenman C., Korver H., Mooijman K.A. 2007. Improvements in the method for detection of *Salmonella* spp. in animal faeces. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands. RIVM Report 330300 010.
- (10) Soutourina O.A., Semenovva E.A., Parfenova V.V., Danchin A., Bertin P. 2001. Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated and peritrichous bacteria isolated from lake Baikal. Applied and Environmental Microbiology 67(9), 3852-3859.