

**Testo aggiornato del Decreto del Presidente della Repubblica 8 giugno 1982, n. 470, recante: “Attuazione della direttiva (CEE) n. 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione”, a seguito delle disposizioni correttive ed integrative di cui alla Legge 29 dicembre 2000, n. 422, di cui al Decreto-Legge 31 marzo 2003, n. 51 e di cui alla Legge 30 maggio 2003, n. 121**

#### IL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA

Visti gli articoli 76 e 87 della Costituzione;

Vista la legge 9 febbraio 1982, n. 42 recante delega al Governo ad emanare norme per l’attuazione delle direttive della Comunità economica europea;

Vista la direttiva n. 76/160 dell’8 dicembre 1975, emanata dal Consiglio delle Comunità europee, concernente la qualità delle acque di balneazione;

Considerato che in data 11 marzo 1982, ai termini dell’art. 1 della legge 9 febbraio 1982, n. 42, è stato inviato lo schema del presente provvedimento ai Presidenti della Camera dei deputati e del Senato della Repubblica per gli adempimenti ivi previsti;

Tenuto conto delle osservazioni formulate in sede parlamentare;

Considerato che risulta così completato il procedimento previsto dalla legge di delega;

Sulla proposta del Ministro per il coordinamento interno delle politiche comunitarie, di concerto con i Ministri degli affari esteri, del tesoro, della sanità, dell’industria, del commercio e dell’artigianato, di grazia e giustizia;

Vista la deliberazione del Consiglio dei Ministri, adottata nella riunione del 28 maggio 1982;

E M A N A

il seguente decreto:

#### Art. 1

Il presente decreto ha per oggetto i requisiti chimici, fisici e microbiologici delle acque di balneazione.

Il presente decreto non si applica alle acque destinate ad usi terapeutici ed a quelle di piscina.

#### Art. 2

Ai sensi del presente decreto si intendono per:

a) «acque di balneazione» le acque dolci, correnti o di lago e le acque marine nelle quali la balneazione è espressamente autorizzata ovvero non vietata;

b) «zona di balneazione» il luogo in cui si trovano le acque di balneazione di cui al punto a);

c) «stagione balneare» il periodo compreso tra il 1° maggio ed il 30 settembre, fatta salva la facoltà prevista al punto c) del successivo art. 4;

d) «periodo di campionamento» il periodo che inizia un mese prima della stagione balneare e termina con la fine della stessa.

#### Art. 3

Allo **Stato** competono:

a) le funzioni di indirizzo, promozione, consulenze e coordinamento delle attività connesse con la applicazione del presente decreto;

b) l’aggiornamento della tabella (allegato 1) e delle norme tecniche (allegato 2), in base a nuove acquisizioni tecniche e scientifiche o per il miglioramento della qualità delle acque destinate alla balneazione o per determinare i valori di parametri per i quali saranno, in data successiva, stabilite le cifre;

c) le deroghe di cui al successivo art. 9 con decreto del Ministro della sanità.

#### Art. 4

Alle **regioni** competono:

a) la redazione e l’invio al Ministero della sanità, entro 12 mesi dall’entrata in vigore del presente decreto, della mappa degli scarichi, dei corsi d’acqua e dei punti in cui saranno effettuati i campionamenti e le analisi a cura <sup>1</sup>delle agenzie regionali per la protezione dell’ambiente, ove istituite, o dei presidi e servizi multizonali previsti dall’art. 22 della legge n. 833/1978 e, fino all’attivazione degli stessi, dai laboratori provinciali di igiene e profilassi;

b) la individuazione delle zone idonee alla balneazione sulla base dei risultati delle analisi e delle eventuali ispezioni effettuate durante il periodo di campionamento relativo all’anno precedente. Tale individuazione dovrà essere portata a conoscenza delle amministrazioni comunali interessate almeno un mese prima dell’inizio della stagione balneare;

c) la facoltà di ampliare la stagione balneare secondo le esigenze o le consuetudini locali;

d) la facoltà di adottare limiti più restrittivi di quelli previsti dalla tabella (allegato 1); in nessun caso possono essere adottati limiti meno restrittivi;

e) la facoltà di richiedere le deroghe di cui all’articolo 9 del presente decreto;

<sup>1</sup> Come modificato dalla L.422/2000

f) la facoltà di ridurre la frequenza del campionamento di un fattore 2 quando si verificano le condizioni di cui alla nota 1 all'allegato 1.

Le successive modificazioni delle mappe di cui al precedente punto a) nonché i provvedimenti adottati ai sensi dei precedenti punti c), d) e f) dovranno essere trasmessi tempestivamente al Ministero della sanità.

<sup>2</sup>*I risultati delle analisi eseguite almeno con la frequenza indicata nella tabella (allegato 1) saranno trasmessi mensilmente al Ministero della sanità a cura delle agenzie regionali per la protezione dell'ambiente, ove istituite, o dei presidi e servizi multizonali.*

I compiti che dal presente decreto sono attribuiti alle regioni si intendono conferiti, per il Trentino-Alto Adige, alle province autonome di Trento e Bolzano.

#### Art. 5

Ai **comuni** competono:

a) la delimitazione, prima dell'inizio della stagione balneare, a mezzo di ordinanza del sindaco, delle zone non idonee alla balneazione ricadenti nel proprio territorio;

b) la delimitazione, a mezzo di ordinanza del sindaco, delle zone temporaneamente non idonee alla balneazione qualora nel corso della stagione balneare i risultati delle analisi non risultano conformi alle prescrizioni di cui ai successivi articoli 6 e 7;

c) la revoca, a mezzo di ordinanza del sindaco, su segnalazione dell'autorità competente, dei provvedimenti di cui ai precedenti punti a) e b);

d) l'apposizione, nelle zone interessate, di segnaletica che indichi il divieto di balneazione sia per la limitazione delle zone non idonee di cui al precedente punto a), sia per la delimitazione delle zone soggette al provvedimento di divieto temporaneo di cui al precedente punto b);

e) l'immediata segnalazione <sup>3</sup>alle agenzie regionali per la protezione dell'ambiente, ove istituite, o ai presidi e servizi multizonali di nuove situazioni di inquinamento massivo delle acque di balneazione ricadenti nel proprio territorio.

#### Art. 6

Per l'applicazione di quanto previsto ai precedenti articoli 4, punto b), e 5, punto a), il giudizio di idoneità alla balneazione è subordinato ai risultati favorevoli delle analisi effettuate nel periodo di campionamento di cui all'art. 2, relativo all'anno precedente.

<sup>2</sup> Come modificato dalla L.422/2000

<sup>3</sup> Come modificato dalla L.422/2000

Le acque si considerano idonee alla balneazione quando per il periodo di campionamento relativo all'anno precedente le analisi dei campioni prelevati <sup>4</sup>almeno con la frequenza fissata nella tabella (allegato 1) indicano che i parametri delle acque in questione sono conformi a quelli della tabella stessa per almeno il 90% dei casi e quando nei casi di non conformità i valori dei parametri numerici non si discostino più del 50% dai corrispondenti valori.

Per i parametri microbiologici, il pH e l'ossigeno disciolto, non si applica detta limitazione del 50%.

Per i parametri «coliformi totali», «coliformi fecali», e «streptococchi fecali» la percentuale dei campioni conformi è ridotta all'80%. <sup>5</sup>Qualora per i parametri «coliformi totali» e «coliformi fecali» vengano superati, rispettivamente, i valori di 10.000/100 ml e 2.000/100 ml, la percentuale dei campioni conformi per detti parametri è aumentata al 95 per cento.

Nella determinazione delle percentuali di cui al presente articolo non vanno considerati, nel calcolo, i risultati non favorevoli quando gli stessi siano stati rilevati su campioni influenzati da circostanze particolari quali inondazioni, catastrofi naturali, condizioni meteorologiche eccezionali.

Non vanno altresì considerati nella determinazione delle predette percentuali i risultati sia favorevoli che quelli non favorevoli delle analisi suppletive effettuate per gli ulteriori accertamenti di cui al comma seguente.

Qualora durante il periodo di campionamento si verifici che le analisi eseguite su un campione risultino sfavorevoli anche per uno solo dei parametri previsti nella tabella allegata, il laboratorio preposto al controllo di cui al primo comma dell'art. 4 del presente decreto effettuerà tutti i necessari accertamenti al fine di individuare la possibile causa inquinante ed i limiti della eventuale zona inquinata. Oltre ad una accurata ispezione dei luoghi, il laboratorio dovrà effettuare le analisi su cinque campioni da prelevare in giorni diversi e nello stesso punto nonché prelievi nelle zone limitrofe per la delimitazione della eventuale zona inquinata.

Qualora più di un campione sui predetti cinque dia un risultato non favorevole anche per uno solo dei parametri previsti nella tabella allegata, la zona dovrà essere temporaneamente vietata alla balneazione. Il laboratorio, stante l'urgenza degli interventi da adottare, comunicherà immediatamente al sindaco del comune interessato, per i conseguenti e tempestivi provvedimenti di competenza di cui al precedente art. 5, l'esito sfavorevole delle analisi e la individuazione della zona inquinata.

<sup>4</sup> Come modificato dalla L.422/2000

<sup>5</sup> Come modificato dalla L.422/2000

Qualora da una ispezione dei luoghi il laboratorio accerti un evidente inquinamento massivo, indipendentemente dal possibile esito delle analisi, ne darà immediatamente comunicazione al sindaco del comune interessato fornendo le necessarie istruzioni per i conseguenti tempestivi provvedimenti.

Sulle acque dichiarate temporaneamente non idonee alla balneazione dovranno proseguirsi i controlli <sup>6</sup>almeno con la frequenza indicata nella tabella (allegato 1).

Nel caso si verifichino due analisi favorevoli per tutti i parametri previsti nella tabella allegata, analisi effettuate su due campioni consecutivi prelevati <sup>7</sup>almeno con la frequenza prevista in tabella (allegato 1), le acque interessate <sup>8</sup>dai provvedimenti di cui all'ottavo comma potranno essere nuovamente adibite alla balneazione con il provvedimento di cui all'art. 5, punto c).

<sup>9</sup>Le zone considerate non idonee alla balneazione sulla base delle disposizioni di cui ai primi sei commi possono essere dichiarate nuovamente idonee, con provvedimento <sup>10</sup>delle regioni, nel caso si verifichi che due campioni prelevati, con la frequenza prevista nella tabella (allegato 1), <sup>11</sup>iniziando dal mese precedente l'inizio della stagione balneare immediatamente successiva a quella cui si riferisce il giudizio di non idoneità di cui al presente articolo, risultino favorevoli per tutti i parametri previsti nella tabella (allegato 1). Tale individuazione è comunicata al Ministero della salute ed al Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio entro quindici giorni dall'adozione del relativo provvedimento. <sup>12</sup>Nelle zone dichiarate nuovamente idonee alla balneazione devono essere effettuati campionamenti e analisi ogni dieci giorni per tutto il periodo di massimo affollamento, procedendo immediatamente alla revoca del provvedimento di idoneità alla balneazione qualora siano rilevati almeno due campioni con esito non favorevole anche per uno solo dei parametri previsti nella tabella (allegato 1).

#### Art. 7

1. <sup>13</sup>Quando per due stagioni balneari consecutive i risultati dei campioni routinari prelevati in uno stesso punto dimostrino per entrambi i periodi la non idoneità alla balneazione, la zona interessata dovrà essere vietata alla balneazione. Quando in una stagione

<sup>6</sup> Come modificato dalla L.422/2000

<sup>7</sup> Come modificato dalla L.422/2000

<sup>8</sup> Come modificato dal D.L. 51 del 31.03.03

<sup>9</sup> Come modificato dal D.L. 51 del 31.03.03

<sup>10</sup> Come modificato dalla L.121/2003

<sup>11</sup> Come modificato dalla L.121/2003

<sup>12</sup> Come modificato dalla L.121/2003

<sup>13</sup> Come modificato dalla L.422/2000

balneare i risultati dei campioni routinari prelevati in uno stesso punto dimostrino la non idoneità alla balneazione con un numero di campioni non conformi superiore ad un terzo di quelli effettuati, la zona interessata dovrà essere vietata alla balneazione. Poste in atto le misure di miglioramento volte a rimuovere le cause dell'inquinamento, nei limiti delle risorse finanziarie previste da apposite leggi di spesa, il giudizio di idoneità alla balneazione sarà subordinato all'esito favorevole di analisi eseguite negli ultimi sei mesi distribuite anche in due periodi di campionamento consecutivi almeno con la frequenza prevista nella tabella (allegato 1).

2. <sup>14</sup>Se nella stagione balneare precedente sono stati effettuati campionamenti routinari in numero inferiore a quelli minimi previsti nella tabella (allegato 1), la zona interessata dovrà essere vietata alla balneazione. Il suddetto divieto potrà essere rimosso a seguito dell'esito favorevole di analisi eseguite per un intero periodo di campionamento almeno con la frequenza prevista nella tabella (allegato 1).

#### Art. 8

1. <sup>15</sup>Le regioni, per i punti non idonei alla balneazione per i quali adottano misure di miglioramento nel rispetto delle disposizioni del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152, comunicano al Ministero dell'ambiente, ai sensi e secondo le modalità previste dall'articolo 9, comma 2, del citato decreto legislativo n. 152 del 1999, tali misure, anche al fine di ottemperare agli obblighi comunitari. Per i casi in cui le regioni accertino che la situazione non necessiti di misure di miglioramento, le stesse dovranno darne adeguata motivazione.

2. <sup>16</sup>Per i punti non idonei alla balneazione, per i quali è necessario adottare misure di miglioramento, fermo restando il divieto di balneazione, non è obbligatorio sottoporre a controllo le acque interessate.

3. <sup>17</sup>Le misure di cui ai commi 1 e 2 sono adottate nei limiti delle risorse finanziarie previste da apposite leggi di spesa

#### Art. 9

E' consentita la deroga ai valori fissati nella tabella allegata:

a) per i parametri: pH, colorazione e trasparenza per condizioni geologiche o geografiche eccezionali;

<sup>14</sup> Come modificato dalla L.422/2000

<sup>15</sup> Come modificato dalla L.422/2000

<sup>16</sup> Come modificato dalla L.422/2000

<sup>17</sup> Come modificato dalla L.422/2000

b) quando le acque di balneazione si arricchiscano naturalmente di talune sostanze, con superamento dei valori limite fissati.

Per le deroghe di cui al presente articolo, le regioni interessate dovranno inviare al Ministero della sanità idonea documentazione che ne giustifichi la richiesta.

#### Art. 10

Per le acque di balneazione in prossimità delle frontiere e per quelle che le attraversano, gli obiettivi di qualità comuni, verranno determinati di concerto fra lo Stato italiano e gli Stati interessati, tenendo conto della normativa comunitaria.

#### Art. 11

Il primo « periodo di campionamento » di cui all' art. 2 dovrà riferirsi alla seconda stagione balneare completa successiva all'entrata in vigore del presente decreto.

Al termine della seconda stagione balneare completa entrano in vigore tutte le norme previste dal presente decreto.

Fino a tale data per il giudizio di idoneità alla balneazione si applicano le disposizioni già emanate al riguardo dal Ministero della sanità.

#### Art. 12

Il presente decreto entra in vigore il giorno successivo a quello della sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Il presente decreto, munito del sigillo dello Stato, sarà inserito nella Raccolta ufficiale delle leggi e dei decreti della Repubblica italiana. E' fatto obbligo a chiunque spetti di osservarlo e di farlo osservare.

---

## REQUISITI DI QUALITÀ DELLE ACQUE DI BALNEAZIONE

| Parametri  | Valore limite   | Frequenza <i>minima</i> dei campioni | Metodo di analisi o di ispezione  |
|--|---|--------------------------------------|---|
| 1) <b>Coliformi totali</b> /100 ml   | 2.000   | Bimensile<br>(1)                     | Vedi allegato 2   |
| 2) <b>Coliformi fecali</b> /100 ml   | 100   | Bimensile<br>(1)                     | Vedi allegato 2   |
| 3) <b>Streptococchi fecali</b> /100 ml   | 100   | Bimensile<br>(1)                     | Vedi allegato 2   |
| 4) <b>Salmonelle</b> /1 L  | 0   | (2)                                  | (2)   |
| 5) <b>pH</b>   | 6~9<br>(0)  | Bimensile<br>(1)                     | Metodo elettromedico  |
| 6) <b>Colorazione</b>  | Assenza di variazione<br>anormale del colore (0)  | Bimensile<br>(1)                     | Ispezione visiva  |
| 7) <b>Trasparenza m</b>  | 1<br>(0)  | Bimensile<br>(1)                     | Disco di Secchi   |
| 8) <b>Oli minerali mg/l</b> (3)  | Assenza di pellicola<br>visibile alla superficie<br>dell'acqua e assenza di<br>odore<br>≤ 0,5 | Bimensile<br>(1)                     | Ispezione visiva e olfattiva<br>Estrazione da un volume<br>sufficiente e pesata del<br>residuo secco                                |
| 9) <b>Sostanze tensioattive</b> che reagiscono<br>al blu di metilene mg/l (laurilsolfato)<br>(3) | Assenza di schiuma<br>persistente<br>≤ 0,5  | Bimensile<br>(1)                     | Ispezione visiva<br>Spettrofotometria di<br>assorbimento al blu di<br>metilene  |
| 10) <b>Fenoli mg/l</b> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH) (3)                                    | Nessun odore specifico<br>≤ 0,05  | Bimensile<br>(1)                     | Verifica dell'assenza di odori<br>specifico del fenolo<br>Spettrofotometria di<br>assorbimento: metodo della 4-<br>amminoantipirina |
| 11) <b>Ossigeno disciolto</b> % saturazione O <sub>2</sub>                                       | 70 ÷ 120  | Bimensile<br>(1)                     | Metodo di Winkler o metodo<br>elettrometrico  |

(0) Superamento dei limiti previsti in presenza di eccezionali condizioni geografiche o geologiche.

(1) Quando le analisi effettuate negli ultimi due periodi di campionamento hanno dato costantemente risultati favorevoli per tutti i parametri del presente allegato e quando non sia intervenuto alcun fattore di deterioramento della qualità delle acque, la frequenza *minima* di campionamento può essere ridotta di un fattore due.

(2) La ricerca di salmonelle sarà effettuata quando, a giudizio della autorità di controllo, particolari situazioni facciano sospettare una loro eventuale presenza.

In tal caso la ricerca delle salmonelle sarà effettuata mediante filtrazione su membrana, arricchimento su terreni liquidi, isolamento su terreni solidi ed identificazione.

(3) Qualora l'esame ispettivo dia un referto dubbio occorre applicare il valore limite numerico.

## ALLEGATO 2

## NORME TECNICHE

## GENERALITÀ

Di norma la distanza tra due punti di prelievo adiacenti non dovrà superare i 2 km salvo a ridurla opportunamente nelle zone ad alta densità di balneazione.

Per ogni singolo punto di campionamento i prelievi dovranno essere, durante il mese, opportunamente distanziati nel tempo.

I prelievi dovranno essere effettuati ad una profondità di circa 30 cm sotto il pelo libero dell'acqua ad una distanza dalla battigia tale che il fondale abbia una profondità di 80-120 cm; in corrispondenza di scogliere a picco o di fondali rapidamente degradanti i prelievi dovranno essere effettuati a non più di metri cinque dalla scogliera o dalla battigia; per gli oli minerali, i prelievi vanno effettuati in superficie.

I prelievi dovranno essere effettuati dalle ore nove alle ore quindici. I prelievi non dovranno essere effettuati durante e nei due giorni successivi all'ultima precipitazione atmosferica di rilievo ed all'ultima burrasca.

I campioni per le analisi microbiologiche dovranno essere prelevati con le comuni bottiglie sterili in uso per i campioni di acque, incartate e successivamente sterilizzate. La bottiglia dovrà essere immersa aperta e trattenuta tramite una pinza od altro idoneo sistema. I campioni dovranno essere trasportati in idoneo contenitore frigorifero e sottoposti ad esame al più presto e comunque entro le 24 ore.

Per ogni prelievo dovranno essere rilevati:

- la posizione del punto di prelievo;
- data ed ora del prelievo;
- temperatura dell'aria e dell'acqua;
- vento: direzione (provenienza in funzione dei punti cardinali) e intensità (debole, medio, forte);
- stato del mare o del lago (calmo o mosso);
- corrente superficiale: direzione ed intensità.

## TECNICHE PER LA RICERCA DEI COLIFORMI TOTALI E COLIFORMI FECALI

**Tecnica dei tubi multipli (M.P.N.)**

Si seminano 10 ml di acqua per tubo in cinque tubi di brodo lattosato concentrato 2x, ml 1 di acqua per tubo in cinque tubi di brodo lattosato a concentrazione normale e ml 0,1 per tubo in cinque tubi di brodo lattosato a concentrazione normale.

Tutti i tubi in cui si sia formata, dopo 24 o 48 ore di incubazione a 37°C, una qualsiasi quantità di gas, debbono essere sottoposti alle successive prove di conferma.

Per la prova di conferma dei coliformi totali le colture positive, passate su terreno lattosio-bile-verde brillante, vengono incubate a 35-37°C.

Si esamina per la presenza di gas dopo 24 -- 2 e dopo 48-- 3 ore. Vengono considerate positive le provette che hanno dato crescita con sviluppo di gas.

La densità dei coliformi totali nel campione di acqua seminato si ottiene applicando la tabella 1.

Per la prova di conferma dei coliformi fecali le colture positive passate su terreno lattosio-bile-verde brillante, vengono incubate a 44°C. Si esamina per la presenza di gas dopo 24-2 ore.

Vengono considerate positive le provette che hanno dato crescita con sviluppo di gas.

La densità dei coliformi fecali nel campione di acqua seminato si ottiene analogamente applicando la tabella 1.

*Preparazione dei terreni di coltura***A) Brodo lattosato:**

Composizione:

|                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| estratto di carne .....         | g 3         |
| peptone .....                   | » 5         |
| lattosio .....                  | » 5         |
| acqua distillata .....          | ml 1000     |
| pH (dopo sterilizzazione) ..... | = 6,8 - 7,0 |

E' preferibile usare le preparazioni disidratate del commercio seguendo appropriate modalità.

Il terreno viene distribuito in tubi (mm 180 x 18 circa) contenenti una provetta capovolta che funge da campanella di raccolta per il gas (tubi da fermentazione).

Sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15'.

Il terreno alla concentrazione normale indicata è adatto alla semina di quantità non superiori a ml 1 per tubo.

Per la semina di volumi più elevati (10 ml) occorrerà preparare il terreno in concentrazione doppia e distribuito nelle quantità di ml 10 circa in tubi da fermentazione di maggiori dimensioni (mm 180 x 22 circa).

I tubi da fermentazione pronti per l'uso non debbono essere conservati in frigorifero per evitare che nel successivo riscaldamento durante l'incubazione, la liberazione dei gas disciolti a bassa temperatura provochi la formazione di una bolla nel tubicino interno con conseguenti possibilità di errore al momento della lettura.

**B) Brodo lattosato con bile e verde brillante.**

Composizione:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| peptone .....          | g 10     |
| lattosio .....         | " 10     |
| bile disidratata ..... | " 20     |
| verde brillante .....  | " 0,0133 |
| acqua distillata ..... | ml 1.000 |
| pH .....               | = 7,2    |

E' da preferirsi l'uso del terreno in polvere del commercio seguendo appropriate modalità.

Sciogliere g 40 del terreno in polvere in ml 1.000 di acqua distillata e distribuire in tubi da fermentazione come indicato per il brodo lattosato.

Per la sterilizzazione e la conservazione del terreno pronto per l'uso vale quanto riportato per il brodo lattosato.

## RICERCA DEI COLIFORMI TOTALI CON LA TECNICA DELLE MEMBRANE FILTRANTI

ml 100 o quantità inferiore (\*) dell'acqua da esaminare vengono filtrati attraverso membrana utilizzando le apparecchiature da filtrazione disponibili in commercio che diano sufficienti; garanzie di riproducibilità dei risultati.

Si fanno passare circa ml 20 di acqua distillata sterile per lavare la membrana filtrante.

Con apposita pinza sterile si afferra la membrana, facendo attenzione a non capovolgerla e si depona sull'adatto terreno di coltura (M-Endo-Broth, vedi), opportunamente predisposto in piastre di Petri.

Incubare in termostato a 37 °C per 24 ore.

Vengono considerate di coliformi totali tutte le colonie rosse con riflessi metallici che si sviluppano su M-Endo-Broth.

## RICERCA DEI COLIFORMI FECALI CON LA TECNICA DELLE MEMBRANE FILTRANTI

ml 100 dell'acqua da esaminare vengono filtrati attraverso membrana utilizzando le apparecchiature disponibili in commercio che diano sufficienti garanzie di riproducibilità dei risultati.

Si fanno passare circa ml 20 di acqua distillata sterile per lavare la membrana filtrante.

Con apposita pinza sterile si afferra la membrana facendo attenzione a non capovolgerla e si depona sull'adatto terreno (M-FC-Broth, vedi), opportunamente predisposto in piastre di Petri.

Incubare a 44,5 °C per 24 ore, in bagnomaria, avvolgendo le piastre in appositi contenitori impermeabili all'acqua.

Vengono considerate di coliformi fecali tutte le colonie di colore bleu dopo incubazione in M-FC-Broth.

(\*) la quantità di acqua da filtrare varia con il presumibile livello di inquinamento del campione da esaminare fermo restando che il conteggio va riferito a 100 ml di campione.

## PREPARAZIONE DEI TERRENI DI COLTURA PER MEMBRANE FILTRANTI

*M-Endo-Broth:*

## Composizione:

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| estratto di lievito ..... | g 6,0    |
| peptone .....             | " 20,0   |
| lattosio .....            | " 25,0   |
| fosfato bipotassico ..... | " 7,0    |
| fuesina basica .....      | " 1,0    |
| solfito sodico .....      | " 2,5    |
| acqua distillata .....    | ml 1.000 |

## Sterilizzazione a 121°C per 5 minuti:

pH (dopo sterilizzazione) ..... =7,5

E' preferibile usare le preparazioni disidratate del commercio.

Il terreno deve essere preparato giornalmente.

Il terreno pronto per l'uso deve essere impiegato utilizzando gli appositi dischi assorbenti predisposti sul fondo delle piastre.

*M-PC-Broth:*

## Composizione:

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| peptone .....             | g 15,0 |
| estratto di lievito ..... | " 3,0  |
| cloruro di sodio .....    | " 5,0  |
| lattosio .....            | " 12,5 |
| sali biliari .....        | " 1,5  |
| bleu di anilina .....     | " 0,1  |
| pH .....                  | = 7,4  |

E' preferibile usare le preparazioni disidratate del commercio.

Sospendere g 3,7 del terreno base disidratato in ml 100 di acqua distillata contenente ml 1,0 di una soluzione all'1% di acido rosolico in sodio idrato 0,2 N.

Riscaldare agitando fino ad ebollizione. Raffreddare.

La soluzione di acido rosolico di cui sopra può essere conservata al buio, in frigorifero per due settimane.

Il terreno pronto per l'uso deve essere impiegato utilizzando gli appositi dischi assorbenti predisposti sul fondo delle piastre.

## RICERCA DEGLI STREPTOCOCCHI FECALI

*Tecnica in terreno liquido.*

## a) Prova presuntiva.

Seminare l'acqua in esame in una serie di tubi di brodo glucosato all'azide sodica (vedi). Per la quantità di acqua da seminare e la sua suddivisione in una o più serie di tubi, valgono i criteri adottati per la colimetria.

Incubare a 35-37 °C per 24 e 48 ore. Vengono considerati positivi i tubi torbidi.

## b) Prova di conferma.

Vengono sottoposti a questa prova tutti i tubi risultati positivi nella prova presuntiva dopo 24 o 48 ore di incubazione.

Da ciascun tubo positivo fare una semina abbondante in un tubo contenente brodo all'azide sodica e al violetto di etile (vedi).

Incubare a 35-37 °C per 48 ore. Vengono considerati positivi i tubi che presentino sul fondo un deposito color porpora.

Per il calcolo del numero più probabile (MPN) valgono i criteri adottati per la colimetria e quindi la tabella 1.

## c) Prova finale.

E' consigliabile solo in casi particolari, quando cioè sussistano dubbi sulla natura dell'inquinamento e gli "enterococchi" siano l'unico indice di inquinamento presente e soprattutto non siano accompagnati dai coliformi. Da ogni tubo positivo di brodo all'azide sodica e al violetto di etile seminare per isolamento su terreno al TTC (terreno di Slanetz).

Le colonie rosse o rosa che si sviluppano su tale terreno dopo 24 ore a 35-37 °C vengono seminate in un tubo di Brain Hearth infusion agar e in un tubo di Brain Hearth infusione brodo; incubare a 35-37 °C per 48 ore.

Dalla coltura in terreno liquido fare un passaggio in un tubo dello stesso terreno, incubare a 45°C per 48 ore. Prelevare una ansata della carica batterica cresciuta sul terreno solido e fare una sospensione densa in una soluzione fisiologica; aggiungere qualche goccia di acqua ossigenata e osservare se si verifica sviluppo di gas (prova della catalasi). Gli enterococchi non possiedono catalasi come tutti gli streptococchi.

## TERRENI DI COLTURA

## 1) Brodo glucosato all'azide sodica:

|   |          |
|---|----------|
| estratto di carne .....                             | g 4,5    |
| peptone (triptone, polipeptoneo altro simile) ..... | " 15     |
| glucosio .....                                      | " 7,5    |
| sodio cloruro. ....                                 | " 7,5    |
| azide sodica (azoturo di sodio) .....               | " 0,2    |
| acqua distillata .....                              | ml 1.000 |

## Sterilizzazione a 121°C per 15 minuti:

pH (dopo sterilizzazione) ..... = 7,2

Per la semina di quantità di acqua superiori a ml 1, il terreno viene preparato a concentrazione maggiore, analogamente a quanto indicato a proposito della colimetria.

## 2) Brodo all'azide sodica e al violetto di etile:

Da preferire l'impiego del terreno già preparato in forma disidratata.

## Composizione:

|  |           |
|--|-----------|
| peptone (triptone, polipeptone o altro equivalente) g 20 |           |
| glucosio .....   | " 5       |
| sodio cloruro .....                                      | " 5       |
| fosfato bipotassico .....                                | " 2,7     |
| azide sodica .....                                       | " 0,4     |
| violetto di etile .....                                  | " 0,00083 |
| acqua distillata .....                                   | ml 1.000  |

## Sterilizzazione a 121°C per 15':

pH (dopo sterilizzazione) ..... = 7,0

## 3) Terreno al TTC (M-enterococcus agar) o terreno di Slanetz:

Da preferire l'impiego del terreno già preparato in forma disidratata.

## Composizione:

|  |          |
|--|----------|
| peptone (triptone, polipeptone o altro equivalente) " 20 |          |
| estratto di carne .....                                  | " 5      |
| glucosio .....   | " 2      |
| fosfato bipotassico .....                                | " 4      |
| azide sodica .....                                       | " 0,4    |
| agar .....   | " 10-15  |
| 2,3,5 trifetil-tetrazolio-cloruro .....                  | " 0,1    |
| acqua distillata .....                                   | ml 1.000 |

Disciogliere per ebollizione e distribuire in piastre di Petri. Non sterilizzare in autoclave.

## TECNICA DELLE MEMBRANE FILTRANTI

La quantità di acqua da filtrate varia con il grado presumibile di inquinamento del campione in esame; è consigliabile filtrare 100 ml o 10 ml (\*).

Dopo avere filtrato la quantità stabilita di acqua, la membrana viene posta sulla superficie del terreno al TTC (terreno di Slanetz) precedentemente versato e lasciato solidificare in una piastra di Petri del diametro di almeno 60 mm.

Incubare a 37 °C per 48 ore. Le colonie rosa o rosse che si sviluppano in tali condizioni sono considerate di enterococco. Se si ritiene necessario le colonie possono essere sottoposte alla prova finale, già descritta a proposito della tecnica in terreno liquido.

(\*) La quantità di acqua da filtrare varia con il presumibile livello di inquinamento del campione da esaminare fermo restando che il conteggio va riferito a 100 ml di campione.

TABELLA 1

| Numero di tubi positivi su |           |             | Indice MPN per 100/ml | Numero di tubi positivi su |           |             | IndiceMPN per 100/ml |
|----------------------------|-----------|-------------|-----------------------|----------------------------|-----------|-------------|----------------------|
| 5 da 10 ml                 | 5 da 1 ml | 5 da 0,1 ml |                       | 5 da 10 ml                 | 5 da 1 ml | 5 da 0,1 ml |                      |
| 0                          | 0         | 1           | 2                     | 4                          | 2         | 1           | 26                   |
| 0                          | 1         | 0           | 2                     | 4                          | 3         | 0           | 27                   |
| 0                          | 2         | 0           | 4                     | 4                          | 3         | 1           | 33                   |
| 1                          | 0         | 0           | 2                     | 4                          | 4         | 0           | 34                   |
| 1                          | 0         | 1           | 4                     | 5                          | 0         | 0           | 23                   |
| 1                          | 1         | 0           | 4                     | 5                          | 0         | 1           | 31                   |
| 1                          | 1         | 1           | 6                     | 5                          | 0         | 2           | 43                   |
| 1                          | 2         | 0           | 6                     | 5                          | 1         | 0           | 33                   |
| 2                          | 0         | 0           | 5                     | 5                          | 1         | 1           | 46                   |
| 2                          | 0         | 1           | 7                     | 5                          | 1         | 2           | 63                   |
| 2                          | 1         | 0           | 7                     | 5                          | 2         | 0           | 49                   |
| 2                          | 1         | 1           | 9                     | 5                          | 2         | 1           | 70                   |
| 2                          | 2         | 0           | 9                     | 5                          | 2         | 2           | 94                   |
| 2                          | 3         | 0           | 12                    | 5                          | 3         | 0           | 79                   |
| 3                          | 0         | 0           | 8                     | 5                          | 3         | 1           | 109                  |
| 3                          | 0         | 1           | 11                    | 5                          | 3         | 2           | 141                  |
| 3                          | 1         | 0           | 11                    | 5                          | 3         | 3           | 175                  |
| 3                          | 1         | 1           | 14                    | 5                          | 4         | 0           | 130                  |
| 3                          | 2         | 0           | 14                    | 5                          | 4         | 1           | 172                  |
| 3                          | 2         | 1           | 17                    | 5                          | 4         | 2           | 221                  |
| 3                          | 3         | 0           | 17                    | 5                          | 4         | 3           | 278                  |
| 4                          | 0         | 0           | 13                    | 5                          | 4         | 4           | 345                  |
| 4                          | 0         | 1           | 17                    | 5                          | 5         | 0           | 240                  |
| 4                          | 1         | 0           | 17                    | 5                          | 5         | 1           | 348                  |
| 4                          | 1         | 1           | 21                    | 5                          | 5         | 2           | 542                  |
| 4                          | 1         | 2           | 26                    | 5                          | 5         | 3           | 918                  |
| 4                          | 2         | 0           | 22                    | 5                          | 5         | 4           | 1.609                |