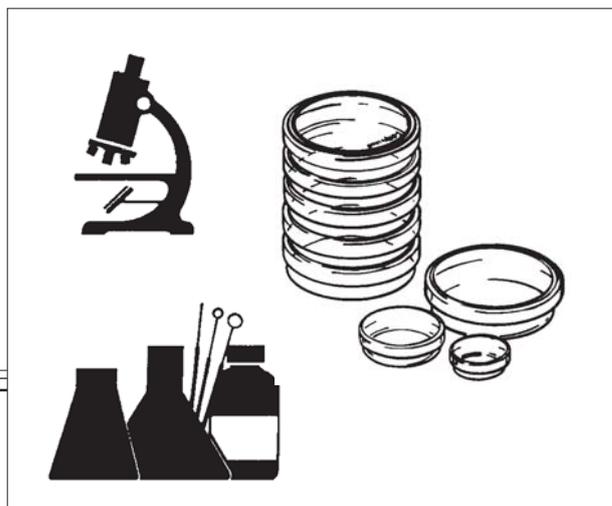


METODI

Metodi riprodotti dal Notiziario dei Metodi Analitici dell'Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA-CNR), supplemento al Quaderno n. 100.



Salmonella nei fanghi di risulta: aspetti igienico-sanitari e metodologia di analisi

Lucia Bonadonna¹

RIASSUNTO

Vengono prese in considerazione le problematiche relative agli aspetti igienico-sanitari e tecnici dei fanghi di depurazione da impianti di trattamento di acque reflue rivolgendo particolare attenzione al patogeno *Salmonella*. La sua ricerca nei fanghi di risulta ha di recente acquisito importanza in seguito all'inserimento del parametro nella normativa relativa all'utilizzazione dei fanghi in agricoltura che ne richiede il rilevamento quantitativo.

SUMMARY

This review is intended to give an overview on the hygienic and technical aspects of sludges from treatment plants of wastewater. Most interest is addressed to the pathogen *Salmonella* in view of its quantitative enumeration requested in the Italian legislation on the use of sludge in agriculture.

INTRODUZIONE

I fanghi, quali prodotti di risulta derivati dai processi di trattamento dei liquami, costituiscono il concentrato di tutti gli inquinanti presenti nei reflui: sostanze organiche, composti inorganici anche difficilmente biodegradabili, metalli pesanti e microrganismi.

I fanghi mostrano un'ampia variabilità delle loro caratteristiche fisiche, chimiche, biologiche e tecnologiche che dipendono dalla loro origine, dal tipo di trattamento subito dai reflui, dal fango stesso, dalla durata dello stoccaggio, ecc. A tutt'oggi non vi è univocità nella comunità scientifica nel definire quali siano le proprietà dei fanghi più significative, i metodi per misurarle e le unità di misura da adottare per definirne i requisiti (RAVALLI, 1989). Vale inoltre ricordare che la maggior parte degli studi è indirizzata principalmente alla caratterizzazione e valutazione di parametri tecnologici, chimici e fisici. Ciò non di meno, se si tiene conto oltretutto che il numero dei microrganismi concentrati nei fanghi supera quello presente nelle acque grezze, bisogna considerare come altrettanto rilevante lo studio delle caratteristiche microbiologiche, soprattutto nel caso i fanghi vengano utilizzati a scopo agricolo (KOWAI, 1985).

L'efficacia dei processi di trattamento cui possono

¹ Istituto Superiore di Sanità, Roma

essere sottoposti i fanghi si dimostra, se considerata sulla base della qualità microbica, relativamente elevata. Nei processi a fanghi attivi condotti su liquame chiarificato ed operanti in condizioni ottimali, l'abbattimento dei batteri patogeni, agenti eziologici di malattie a circuito fecale-orale (es. *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*) unitamente a quello di altri batteri responsabili di patologie per l'uomo (micobatteri, brucelle, leptospire, ecc.) può raggiungere livelli compresi tra il 95 e il 98%, mentre contemporaneamente la riduzione degli indicatori di contaminazione (coliformi e streptococchi) può toccare il 99% (BONADONNA *et al.*, 1994).

Il problema di rendere igienicamente innocui i fanghi si pone soprattutto, e in modo prioritario, qualora essi vengano sparsi sul terreno. Essi possono sostanzialmente esercitare un effetto fertilizzante sui suoli migliorandone la struttura e, esaltandone i processi biologici, favorire la crescita della vegetazione (ROVERE MASSARANI, 1981). Tuttavia la presenza di batteri, virus e parassiti (protozoi e metazoi), conglobati nei fanghi, può rappresentare un rischio sanitario e una limitazione per questa pratica di recupero. Il rischio è legato alla contaminazione di colture vegetali che possono, attraverso la catena alimentare, essere veicolo di trasmissione di malattie (FRADKIN, 1988; HAVELAAR *et al.*, 1983).

Se il rischio può essere correlato più facilmente alla presenza delle forme di vita più resistenti (uova e cisti di metazoi e protozoi, spore batteriche), tuttavia anche le forme vegetative batteriche possono trovare condizioni favorevoli per la loro sopravvivenza e moltiplicazione. Infatti, benché tutti i patogeni più comuni possano essere ritrovati nei fanghi, solo alcuni vi si trovano con una frequenza significativa. In particolare, microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae possono raggiungere nei fanghi elevate concentrazioni (OTTAVIANI *et al.*, 1992). Tra i patogeni compresi in questa famiglia, *Salmonella*, per la sua potenziale maggiore diffusione nella popolazione e per la disponibilità di metodiche analitiche sperimentate e applicabili, ha ricevuto più attenzioni rispetto ad altri patogeni ed è stata inserita, quale parametro da ricercare, nel Decreto Legislativo del 27 gennaio 1992 n° 99, recepimento della Direttiva 86/278/CEE (COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES, 1986).

Il decreto stabilisce le norme relative all'impiego dei fanghi in agricoltura allo scopo di disciplinarne l'uso per evitare effetti nocivi sul suolo, sulla vegetazione, sugli animali e sull'uomo. Le condizioni di utilizzo devono prendere in esame sia le caratteristiche del fango sia quelle del suolo ricettore, specificandone possibilità d'uso e divieti. Dalla considerazione di ciò, la normativa ha tenuto conto sia della potenzialità fertilizzante dei

fanghi, sia di quella inquinante ed ha stabilito quando e in che termini questa ultima deve diventare limitante per la prima.

Dal punto di vista microbiologico la normativa fissa il limite di concentrazione nei fanghi per il solo parametro *Salmonella* la cui concentrazione, nei reflui e conseguentemente nei fanghi derivati, può risultare maggiore rispetto a quella di altri patogeni in quanto legata anche alla possibilità di diffusione da parte di portatori sani; la sua presenza potrebbe rappresentare in un certo qual modo un indice della presenza di altri patogeni batterici.

Per quanto riguarda ad esempio *S. typhi*, non sempre rilevabile in campioni ambientali, è riconosciuto che essa sia molto più diffusa nella popolazione di quanto si possa desumere in base ai dati di incidenza della malattia clinicamente accertata. È stato calcolato che in una popolazione esposta ad alto grado di infezione, soltanto una piccola porzione sviluppa la malattia (meno del 20% degli infettati).

Diversi studi hanno messo in evidenza che la diffusione di *Salmonella* nell'ambiente può essere favorita dall'uso, come fertilizzanti, di fanghi non trattati; indagini svolte dove questa pratica è applicata comunemente hanno messo in evidenza che nel fango non igienizzato è possibile rilevare concentrazioni variabili tra 2 e 5 milioni di salmonelle per litro con il 97% dei campioni positivo per questo patogeno (BREER, 1985).

I processi di trattamento del fango sono comunque in grado di ridurre il numero di salmonelle, come di tutti i microrganismi presenti. Tuttavia i diversi trattamenti possono produrre differenti risultati. A questo proposito è stato rilevato che la digestione anaerobica mesofila non è in grado di fornire un fango con sufficienti garanzie igieniche: le concentrazioni di *Salmonella* si possono ridurre da 10^5 a 10^3 per litro. Risultati migliori si ottengono con la digestione aerobica mesofila che permette di ridurre di tre unità logaritmiche il numero di *Salmonella*. Nondimeno è da sottolineare come il fattore che maggiormente influenza la sopravvivenza dei microrganismi durante la digestione del fango sia la temperatura. Pertanto si verifica che con la sola digestione aerobica a freddo la concentrazione di *Salmonella* venga ridotta di un solo fattore (BONADONNA, 1995).

La temperatura influenza anche i processi biologici che si svolgono nel terreno. I microrganismi apportati al suolo con i fanghi vengono ad inserirsi in un equilibrio preesistente non sempre ad essi favorevole e il fattore temperatura interviene in misura prevalente nel contribuire o meno alla loro sopravvivenza nell'ambiente, e nel suolo in particolare.

I tempi di sopravvivenza sono in genere maggiori in terreni neutri o alcalini e comunque umidi. Inoltre, i

periodi piovosi e le basse temperature, possono costituire parametri a favore del mantenimento della vitalità batterica. È stato ripetutamente osservato che ad alte temperature, in un ambito in cui i valori massimi non sono letali, i tempi di sopravvivenza sono nettamente inferiori, probabilmente in funzione dell'aumento della competizione con la flora autoctona antagonista. In particolare, la capacità di sopravvivenza di *Salmonella* in suoli trattati con fanghi, dipende in modo prevalente da fattori climatici: nel periodo invernale il tempo di sopravvivenza è stato calcolato tra i 12 e i 60 giorni. Tuttavia si riscontrano differenze nei tempi in funzione dei diversi sierotipi: sono stati segnalati tempi variabili tra i 30 giorni e un anno.

Indagini svolte su diversi grandi impianti a fanghi attivi di trattamento di acque reflue urbane hanno messo in evidenza la possibilità di ottenere risultati diversi quando gli stessi campioni vengono contemporaneamente analizzati con metodiche diverse per la ricerca di *Salmonella* (IRSA, 1983). I risultati ottenuti hanno fornito percentuali elevate di positività e concentrazioni variabili del patogeno in funzione del tipo di trattamento subito dal fango; inoltre tutti i campioni esaminati hanno fornito valori elevati di concentrazione, in alcuni casi superando il limite stabilito per *Salmonella* dalla normativa italiana relativa all'impiego dei fanghi in agricoltura (10^3 MPN/g_{ss}) (BONADONNA *et al.*, 1994).

Nel corso delle indagini sopra menzionate, svolte in un arco di tempo di quattro anni, è stato evidenziato come la caratteristica strutturale dei fanghi possa influenzare i risultati di analisi volte al rilevamento dei microrganismi in essi presenti. Infatti sono state osservate differenze significative nelle medie dei valori ottenuti ($P < 0,05$) se, preventivamente, sul campione veniva o meno praticato un pretrattamento prima dell'analisi. Infatti le particelle di cui è composto il fango possono costituire, oltre che un fattore di sostentamento e protezione, anche un sito di adesione per i microrganismi che vengono in esse segregati. Mezzi diversamente energici, quali agitazione meccanica, omogeneizzazione e sonicazione possono permettere la disgregazione delle particelle di fango con conseguente rilascio in misura diversa dei microrganismi in esse aggregati.

Le difficoltà che si incontrano nell'analisi dei fanghi derivano in misura elevata dalla stretta associazione tra particelle e microrganismi e tra questi reciprocamente tra loro; per rilevarli è necessario pertanto separare, liberandoli dall'aggregazione, i singoli microrganismi. Infatti l'eventualità che aderiscano tra loro può produrre errori di valutazione sul numero di microrganismi realmente presenti anche se molteplici possono essere comunque i meccanismi in grado di interferire sul loro

isolamento: meccanismi di competizione biologica e presenza di cellule che hanno subito stress ambientale intervengono in misura prioritaria. In questo caso, l'analisi della varianza ha evidenziato che la differenza tra le medie dei valori ottenuti con i diversi metodi di pretrattamento era statisticamente significativa ($P < 0,05$). Di seguito verrà indicato uno tra i metodi analitici utilizzati nell'indagine sopra menzionata che, da considerarsi di riferimento a fronte di una indicazione di carattere tecnico dettata dalla legislazione italiana, può essere anche uno strumento applicativo utile alla pianificazione e alla unificazione delle procedure analitiche per la ricerca di *Salmonella* nei fanghi di depurazione.

SALMONELLA: **PROCEDURA DI ANALISI**

CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura analitica viene utilizzata per l'analisi di fanghi di depurazione.

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consente di valutare la concentrazione di *Salmonella* nei fanghi con il metodo dei tubi multipli. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive così suddivise:

- Pretrattamento del campione
- Prearricchimento
- Arricchimento
- Isolamento
- Conferma e identificazione

CONTROLLO DI QUALITÀ

È opportuno procedere allo svolgimento di un controllo di qualità mediante prove atte a valutare l'efficienza del metodo eseguito dal laboratorio utilizzando standard specifici contenenti una densità nota di microrganismi.

PRETRATTAMENTO

Permette la disgregazione delle particelle di fango con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Procedura

Pesare 20 g di fango e risospenderli in 180 mL di

acqua fisiologica tamponata (K_2HPO_4 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, Na Cl 8,5 g/L; pH $7,2 \pm 0,2$). Lasciare agitare per alcuni minuti la sospensione su piastra magnetica o tramite Stomacher per rendere la sospensione omogenea.

Sottoporre il campione, per circa 15 secondi, a omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" con regolatore di velocità da 1000 a 10000 g/m e pestello in teflon, mantenendo la sospensione in un bagno di ghiaccio. Prima dell'omogeneizzazione è possibile eventualmente aggiungere Tween 80 ad una concentrazione finale di 0,01% (v/v).

PREARRICCHIMENTO

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in un idoneo brodo di coltura non selettivo la cui formulazione è riportata di seguito.

ACQUA PEPTONATA TAMPONATA

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone	10	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato monoacido	3,5	g
Potassio fosfato biacido	1,5	g
pH	$7,2 \pm 0,2$	

Il terreno si prepara a partire dai singoli ingredienti. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Preparare il brodo a concentrazione tale che l'inoculo non diluisca la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard. Distribuire in tubi e sterilizzare a 121 °C per 15 min. Conservare il terreno a circa + 4 °C per non più di due settimane.

Procedura

Inoculare diluizioni scalari della sospensione di fango trattata, in triplice, in almeno 3 serie di tubi ciascuna contenenti Acqua Peptonata Tamponata. La scelta delle aliquote da inoculare si basa anche sulla qualità del fango da esaminare in considerazione che a maggiori volumi di inoculo può corrispondere un mancato rilevamento di *Salmonella* la cui presenza è facilmente schermata da elevate concentrazioni di flora batterica interferente. Volumi indicativi, dettati dall'esperienza e dalle caratteristiche dei fanghi, variano tra 10 e 0,1 mL. Incubare a 36

± 1 °C per 18-24 ore.

ARRICCHIMENTO

Esistono in commercio diversi substrati usati per la prova di arricchimento di *Salmonella* che garantiscono buoni risultati in fase analitica anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutti i sierotipi di *Salmonella* presenti. Di seguito si riporta la formulazione del Brodo Rappaport Vassiliadis.

BRODO RAPPAPORT VASSILIADIS (RAPPAPORT VASSILIADIS BROTH)

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	8	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,6	g
Magnesio cloruro esaidrato	40	g
Verde malachite	40	mg
pH	$5,2 \pm 0,2$	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in tubi e sterilizzare a 116 °C per 15 min. Conservare a circa 4 °C per non più di una settimana. L'aggiunta al brodo di arricchimento di 10 µg/mL di sodio novobiocina può migliorare il recupero di *Salmonella*.

Procedura

Da ciascun tubo del brodo di prearricchimento eseguire, in altrettanti tubi di Rappaport Vassiliadis, l'inoculo di una stessa aliquota della brodocoltura (es. 1 mL).

Incubare a $42 \pm 0,5$ °C per 24+24 ore. A questa temperatura e per la presenza in questo terreno di verde malachite tuttavia *S. typhi* non cresce. La sua ricerca attualmente viene ancora effettuata in brodi alla selenite, il cui uso richiede particolare attenzione e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

ISOLAMENTO

Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento di *Salmonella* che garantiscono buoni risultati in fase analitica. Di seguito si riporta la formula-

zione dell'Hektoen Enteric Agar.

HEKTOEN ENTERIC AGAR

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone	12	g
Estratto di lievito	3	g
Sali biliari	9	g
Lattosio	12	g
Saccarosio	12	g
Salicina	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio iposolfito	5	g
Citrato ferrico ammoniacale	1,5	g
Agar	13,5	g
Blu di bromotimolo	64	mg
Fucsina acida	40	mg
pH 7,6 ± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa + 4 °C per non più di tre settimane.

Procedura

Da ciascuno dei tubi del brodo di arricchimento eseguire, prelevando un'ansata, due subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento: la prima dopo 24 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore. Incubare le piastre a 36 ± 1 °C per 24 ore.

Su Hektoen Enteric Agar le colonie sospette di *Salmonella* si presentano verdi con margini netti con o senza centro nero. Il riconoscimento delle colonie di *Salmonella* è in larga parte dovuto all'esperienza, in quanto il loro aspetto può essere vario, non solo fra specie diverse, ma anche in rapporto ad un lotto di terreno rispetto ad un altro. Pertanto è comunque necessario effettuare prove di controllo di qualità interlaboratoriale con ceppi puri di riferimento per verificare la fertilità e la selettività del terreno.

CONFERMA

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Salmonella*, è necessario eseguire, sulle colonie rilevate, la prova della fermentazione dei carboidrati ed eventualmente la prova della decarbossilazione della lisina.

In alternativa si possono usare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio per l'individuazione dell'appartenenza al genere *Salmonella*.

Prima di effettuare ciascuna prova è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su idoneo terreno di crescita non selettivo ed eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo. Il terreno colturale da utilizzare è quello la cui formulazione è riportata di seguito.

Prima di effettuare ciascuna prova è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su idoneo terreno di crescita non selettivo ed eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo. Il terreno colturale da utilizzare è quello la cui formulazione è riportata di seguito.

TRIPTONE SOIA AGAR (TRYPTIC SOY AGAR)

Composizione per 1 L di terreno:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
pH 7,3 ± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare a 121 °C per 15 min. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa + 4 °C per non più di due settimane.

Procedura

Isolare le colonie da sottoporre a conferma sul terreno Triptone Soia Agar e incubare a 36 ± 1 °C per 24 ore.

PROVA DELLA FERMENTAZIONE DEI CARBOIDRATI

Le colonie sospette si trasferiscono, per evidenziare le reazioni per la fermentazione dei carboidrati, su Agar al ferro di Kligler la cui formulazione viene riportata di seguito.

AGAR AL FERRO DI KLIGER (KLIGER IRON AGAR)

Composizione per 1 L di terreno:

Estratto di carne	3	g
-------------------	---	---

Estratto di lievito	3	g
Peptone	20	g
Sodio cloruro	5	g
Lattosio	10	g
Glucosio	1	g
Ferro citrato	0,3	g
Sodio tiosolfato	0,3	g
Agar	12	g
Rosso fenolo	50	mg
pH 7,4 ± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provette e dopo sterilizzazione a 121 °C per 15 min lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa + 4 °C per non più di due settimane.

Procedura

Prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno solidificato in provetta. Incubare a 36 ± 1 °C per 18-24 ore. È essenziale che i risultati vengano registrati dopo 18-24 ore di incubazione. Per l'interpretazione dei risultati si devono annotare le reazioni di seguito indicate, anche se è da ricordare che quando si isola una delle rare salmonelle lattosio-positiva, anche la superficie inclinata del terreno appare gialla.

Utilizzazione dei carboidrati su *Kliger Iron Agar*

Reazione sulla superficie inclinata:

Acidità: colore giallo

Alcalinità: colore rosso

Reazione di profondità

Acidità: colore giallo

Alcalinità: colore rosso

Produzione di gas

Presente: bolle o rottura dell'agar

Assente

Produzione di H₂S

Presente: annerimento del terreno

Assente

Le reazioni dopo 18-24 ore di incubazione a 36 ± 1 °C per le salmonelle sono le seguenti:

Microrganismo	Superficie	Profondità	Gas	H ₂ S
<i>Salmonella</i> spp.	Rosso	Giallo	+	+
<i>S. typhi</i>	Rosso	Giallo	-	+
<i>S. paratyphi</i>	Rosso	Giallo	-	-

Prova della decarbossilazione della lisina

Le colonie sospette si trasferiscono, per evidenziare le reazioni per la decarbossilazione della lisina, su Agar al ferro e lisina la cui formulazione viene riportata di seguito.

AGAR AL FERRO E LISINA (LYSINE IRON AGAR)

Composizione per 1 L di terreno:

Casitone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Destrosio	1	g
L-lisina	10	g
Ferro ammonio citrato	0,5	g
Agar	13,5	g
Sodio tiosolfato	40	mg
Porpora bromocresolo	20	mg
pH 6,7 ± 0,1		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provette e dopo sterilizzazione a 121 °C per 12 min lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa + 4 °C per non più di due settimane.

Procedura

Prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno solidificato in provetta. Incubare a 35 ± 1 °C per 16-20 ore.

Tutte le salmonelle producono una colorazione violetta sia del becco sia del cilindro con produzione (annerimento) di idrogeno solforato.

IDENTIFICAZIONE

Per l'identificazione si effettuano prove sierologiche di sierotipizzazione eseguite con antisieri specifici

polivalenti e monovalenti.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di salmonelle presenti in ciascun campione di fango è calcolato in base alla tabella dell'indice MPN (Tab. 1), riportando il valore all'unità di grammo di sostanza secca.

Ricostruire il numero caratteristico a tre cifre corrispondente a un valore dell'indice MPM della tabella in base alle positività riscontrate almeno dopo la fase di conferma. Leggere il valore dell'indice ricavato e moltiplicare per l'inverso del valore di diluizione (es. 10 se la prima serie di tubi considerata per ricostruire il numero caratteristico era stata inocolata con 1, 0,1 e 0,001 mL). Procedere al calcolo del peso secco del fango analizzato. Dal valore ottenuto dell'indice MPN calcolare il numero di salmonelle per grammo di sostanza secca di fango con la seguente formula:

$$N \frac{100}{\%ss} = \text{salmonelle/g}_{ss}$$

Bibliografia

- BONADONNA L., 1995 – La componente batterica. In: Aspetti tecnico-economici, agronomici, pedologici, igienico-sanitari e normativi dei fanghi di depurazione civili. *Rapporti Istisan*, **38**, 233 pp.
- BONADONNA L., M. LATINI, I. DI GIROLAMO, M. OTTAVIANI, 1994 – Valutazione della contaminazione microbiologica di fanghi di depurazione di reflui civili: problemi legati alle metodiche di analisi. *Rapporti Istisan*, **17**, 84 pp.
- BREER C., 1985 – Environmental contamination with *Salmonellae* by the spread of animal waste and sewage sludge. *Experientia*, **41**: 533-537.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1986 – Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official Journal of the European Communities*, L 181/6-181/12 of 04/07/1986.
- D.L. 27 GENNAIO 1992, n. 99. Attuazione della direttiva 86/278/CEE concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 38 del 15 febbraio 1992.
- FRADKIN L., 1988 – Development of a qualitative pathogen risk assessment methodology for municipal sludge land filling. *EPA Report*, 600-S/6-88-006.
- HAVELAAR A., OOSTEROM, S. NOTERMANS AND F. VAN KNAPEN, 1983 – Hygienic aspects of the application of sewage sludge to land. In: International Symposium on Biological reclamation

Tab. 1 - Indice MPN e limite di fiducia al 95% per varie combinazioni di risultati positivi, quando i tubi vengono inoculati con le diluizioni di 10 mL, 1 mL e 0,1 mL.

Combinazioni positive	Diluizioni nei tubi		
	3		
	MPN index /100 mL	Limite di fiducia al 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
0-0-0	< 3		
0-0-1	3	<0,5	9
0-1-0	3	<0,5	13
0-2-0	-		
1-0-0	4	<0,5	20
1-0-1	7	1	21
1-1-0	7	1	23
1-1-1	11	3	36
1-2-0	11	3	36
2-0-0	9	1	36
2-0-1	14	3	37
2-1-0	15	3	44
2-1-1	20	7	89
2-2-0	21	4	47
2-2-1	28	10	150
2-3-0	-		
3-0-0	23	4	120
3-0-1	39	7	130
3-0-2	64	15	380
3-1-0	43	7	210
3-1-1	75	14	230
3-1-2	120	30	380
3-2-0	93	15	380
3-2-1	150	30	440
3-2-2	210	35	470
3-3-0	240	36	1300
3-3-1	460	71	2400
3-3-2	1100	150	4800
3-3-3	≥2400		

and land utilization of urban wastes, Napoli, 11-14 October, 1983.

- IRSA-CNR, 1983 – Metodi analitici per i fanghi. *Quad. Ist. Ric. Acque*, **64**, Roma.
- KOWAL E.N., 1985 – Health effects of land application of municipal sludge. *EPA Report* 600/1-85/015.
- OTTAVIANI M., L. BONADONNA, L. MANCINI, E. VESCHETTI, M. GABBARRO, G. LULLI, A. ZANOBINI, M. DIVIZIA, L. GABRIELI, D. DONIA, A. PANÀ, 1992 – Aspetti chimici e biologici delle acque e dei fanghi di risulta da un impianto di depurazione. *Ing. Amb.*, **21**: 639-647.
- RAVALLI M., 1989. Caratteristiche e confronto dei fanghi provenienti da impianti biologici di acque reflue urbane suscettibili di recupero in agricoltura. *Inform. Recupero*, **10**: 21-24.
- ROVERE MASSARANI E., 1981 – Proprietà chimiche, fisico-chimiche, biologiche e biochimiche dei fanghi di depurazione. *Ing. Amb.*, **10**: 110-115.