

NMR Study of the rotational isomerism around the C β -O bond in phosphorylated α -amino acids: P β Ser and P β Thr

A. CASINI, P. CORTI, L. POGLIANI and G. SABATINI

Istituto di Chimica Generale, Università di Siena

Summary. - Some parameters resulting from the NMR spectra of the phosphorylated α -amino acids Phosphoserine (P β Ser) and Phosphothreonine (P β Thr) are analysed. The attention is focused on the C β -O-P side-chain fragment substituent effects, the relative conformational population as well as the relative free energy differences of the rotational isomerism around the C β -O bond are discussed.

Riassunto. - Alcuni parametri risultanti da spettri RMN di α -amminoacidi fosforilati, Fosfoserina (P β Ser) e Fosfotreonina (P β Thr) sono qui analizzati. L'attenzione è rivolta sul frammento di catena laterale C β -O-P dei suddetti composti. A partire da questi parametri vengono discussi gli effetti dovuti ai sostituenti, le relative popolazioni conformazionali e le relative differenze in energia libera degli isomeri rotazionali intorno al legame C β -O.

INTRODUCTION.

Up to date very few studies on phosphoamino acids by means of the NMR-spectroscopy have been attempted [1-6]. Only the last [4-6] three ones have paid a particular attention to the fine structure of the NMR spectra (both ^1H - and ^{13}C - NMR spectra), in an attempt to obtain good coupling constant data to use in conformational calculation following a method outlined by Pachler [7, 8] for amino acids along C α -C β bond. We investigate in this paper the conformational isomerism around the C β -O bond of the phosphorylated α -amino acids P β Ser and P β Thr. The molecular fragment

$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \end{array} \text{-CH}(\text{COO}^-)\text{-CHR-O-PO}_3^-$ is a common structural unit in biological important molecules: phospholipids, phosphoproteins and phosphoamino acids. Considerable research has been invested on phospholipids and on the related problem of drug transport through membranes. Phosphorylation and dephosphorylation reactions have been shown to be important regulatory mechanisms in processes involving enzymes and membrane, contractile, ribosomal and chromosomal proteins. In sheep and pig fibrinogen P β Ser and P β Thr account for the total phosphorus content and phosphoproteins have been detected in dentin (54 % P β Ser+Ser) [9-20]. The present

experiments [4-6] were carried out in deuterated water solutions in order to simulate natural systems and as it is a very easy method to obtain simple ^1H -NMR spectra. We focused our attention on the C β -O-P side-chain fragment of these compounds since it is along the C β -O bond that the configurational isomerism which involves the P phosphate group can be studied with high resolution NMR spectroscopy of the proton and the carbon-13, and because studies around this bond have been neglected until now. For this purpose, we need the values of the vicinal coupling constants between the hydrogen(s) atom(s) (attached to the C β atom) and the phosphor-31 atom of the phosphate group, i.e., $^3\text{J}(\text{H}\beta\text{P})$, and the vicinal coupling constant between the C α -13 atom and the P-31 atom, i.e., $^3\text{J}(\text{C}\alpha\text{P})$, obtained from highly resolved ^1H - and ^{13}C -NMR experimental spectra, respectively [4-6]. From the conformational data we can deduce the values of the relative energies of the isomerisation process.

Experimental and Theory.

Carbon-13 spectra were measured on a Bruker HFX-90 operating in the FT mode controlled by a PDP-11 computer, proton spectra were recorded at 270 MHz on a Bruker HX-270 FT spectrometer. Solutions were 0.5 M in D $_2$ O, probe temperature was 32 $^\circ$ C and 27 $^\circ$ C for carbon and proton spectra respectively.

The stable forms of P β Ser and P β Thr along the C β -O bond are the three staggered configurations a, b and c (with the relative fractional populations P $_a$, P $_b$ and P $_c$) which represent: two very similar gauche configurations a and b, and a trans c configuration for each of the two compounds (Fig. 1).

The fractional populations of the conformers a, b and c are normalized to 1. To obtain the different P $_i$ (i=a, c) with the Pachler method we have to know the J $_{i,g}$ for the different isomers. Here, we assume that they are constants for all the three rotational isomers of the two compounds.

Our experimentally determined $^3\text{J}(\text{H}\beta\text{P})$ and $^3\text{J}(\text{C}\alpha\text{P})$ are weighted averages of J $_{i,g}$ and J' $_{i,g}$ respectively (J' being valid for ^{13}C -NMR experimental data). For

PSer, using protonic data, we have to solve the following system:

$$\begin{aligned} P_a J_t + P_b J_r + P_c J_s &= {}^3J(\text{H}\beta_2\text{P}) \\ P_a J_r + P_b J_t + P_c J_s &= {}^3J(\text{H}\beta_1\text{P}) \\ P_a + P_b + P_c &= 1 \end{aligned}$$

which gives:

$$\begin{aligned} P_a &= {}^3J(\text{H}\beta_2\text{P}) - J_r(J_t - J_s) \\ P_b &= {}^3J(\text{H}\beta_1\text{P}) - J_r(J_t - J_s) \\ P_c &= 1 - (P_a + P_b) \end{aligned}$$

For PThr we have a ${}^3J(\text{H}\beta\text{B})$ and we can only determine P_a and $P_b + P_c$ (or P_b and $P_a + P_c$). From carbon data, for PThr, we obtain upon resolving a similar system:

$$\begin{aligned} P_c &= {}^3J(\text{C}\alpha\text{P}) - J'_r(J'_t - J'_s) \\ P_b &= {}^3J(\text{C}\gamma\text{P}) - J'_r(J'_t - J'_s) \\ P_a &= 1 - (P_b + P_c) \end{aligned}$$

For PSer we have a ${}^3J(\text{C}\alpha\text{P})$ and we can only determine P_c and $P_a + P_b$. To evaluate the different $J_{t,r}$ and $J'_{t,r}$ we use the already known Karplus-relationship, that relies ${}^3J(\text{HP})$ and ${}^3J(\text{CP})$ with the dihedral angle ν in the H-C-O-P and C-C-O-P fragments respectively:

$$\begin{aligned} {}^3J(\text{HP}) &= J_A \cos^2 \nu - J_B \cos \nu \\ {}^3J(\text{CP}) &= J'_A \cos^2 \nu - J'_B \cos \nu \end{aligned}$$

Among the different sets of values $J_{A,B}$ and $J'_{A,B}$ (4-6, and references therein), we choose the following ones:

$$\begin{aligned} \text{PSer: } J_A &= 21.9 \text{ Hz; } J_B = 6.0 \text{ Hz; } J'_A = 8.0 \text{ Hz; } \\ &J'_B = 2.0 \text{ Hz} \\ \text{PThr: } J_A &= 16.3 \text{ ''; } J_B = 4.6 \text{ ''; } J'_A = 8.0; \\ &J'_B = 2.0 \text{ ''} \end{aligned}$$

The resulting $J_{t,r}$ and $J'_{t,r}$ are:

$$\begin{aligned} \text{PSer: } J_t &= 27.9 \text{ Hz; } J_r = 2.5 \text{ Hz; } J'_t = 10.0 \text{ Hz; } \\ &J'_r = 1.0 \text{ Hz} \\ \text{PThr: } J_t &= 20.9 \text{ ''; } J_r = 1.8 \text{ ''; } J'_t = 10.0 \text{ ''; } \\ &J'_r = 1.0 \text{ ''} \end{aligned}$$

Once determined the conformational population values P_i , we can estimate the relative free energy differences of the rotational isomers ΔF_{ij} : $P_i/P_j = \exp(-\Delta F_{ij}/RT)$.

RESULTS AND DISCUSSION.

In tab. 1 are collected the vicinal coupling constants for PSer and PThr along the C β -O bond, the corresponding p_i values for the conformational populations from the proton and carbon data and the relative free energy differences between two rotational isomers (the c trans and a gauche a or b isomer) for PSer and PThr. From the values in tab. 1, when going from PSer to PThr, we note the influence of the substituent effect on the 3J 's, which enhances the importance of the gauche form relatively to the trans c form. As the effect on 3J 's can be directly ascribed to the substitution of a H β atom (in PSer) with a C γ methyl group

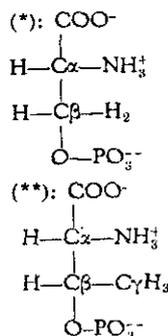
(in PThr), the effect on the p_i 's and ΔF_{ij} 's it is also a function of the assumption on $J_{t,r}$ and $J'_{t,r}$ and of the assumption that the stable forms are the three staggered configurations a, b and c. To obtain the p_i 's we used the values $J_{A,B}$ and $J'_{A,B}$ that give a satisfactory concordance between the P_i 's from the protonic data and the P_i 's from the carbonic data [21]. The error introduced in this way together with the assumption to use only a set of $J_{t,r}$ and $J'_{t,r}$ values for the three isomers of the two compounds are mainly responsible for the inaccuracies in the P_i and ΔF_{ij} determinations. The error involved in the 3J determination (± 0.1 Hz) can therefore be neglected. From the conformational P_i values of PSer obtained from

Table 1

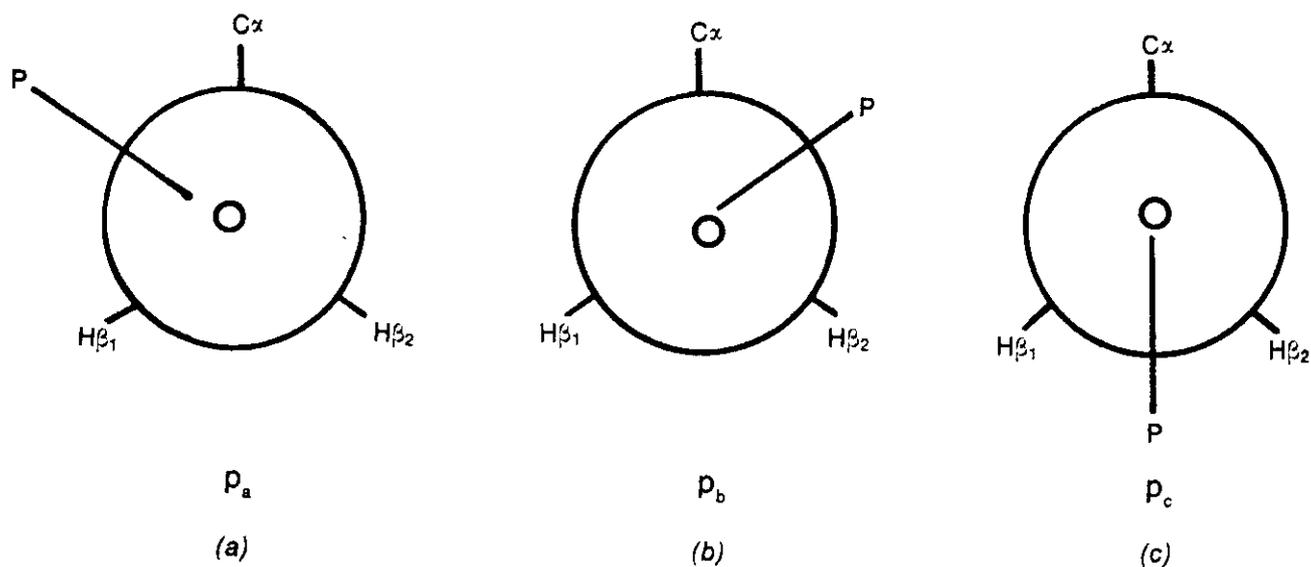
<i>Vicinal coupling constants</i>					
	${}^3J(\text{H}\beta_1\text{P})$ Hz	${}^3J(\text{H}\beta_2\text{P})$ Hz	${}^3J(\text{H}\beta\text{P})$ Hz	${}^3J(\text{C}\alpha\text{P})$ Hz	${}^3J(\text{C}\gamma\text{P})$ Hz
PSer(*)	6,8	6,4	—	5,8	—
PThr(**)	—	—	6,9	5,0	2,6

<i>Conformational Populations</i>				
	from ${}^1\text{H-NMR}$		from ${}^{13}\text{C-NMR}$	
	PSer	PThr	PSer	PThr
P_a	.15	.27	.38	.47
P_b	.17	.73	.18	.53
P_c	.68		.44	

<i>Free Energy differences</i>		
	PSer (from ${}^1\text{H-NMR}$) Kcal/mol	PThr (from ${}^{13}\text{C-NMR}$) Kcal/mol
ΔF_{ca}	-.9	-.1
ΔF_{cb}	-.8	-.5



P Ser



P Thr

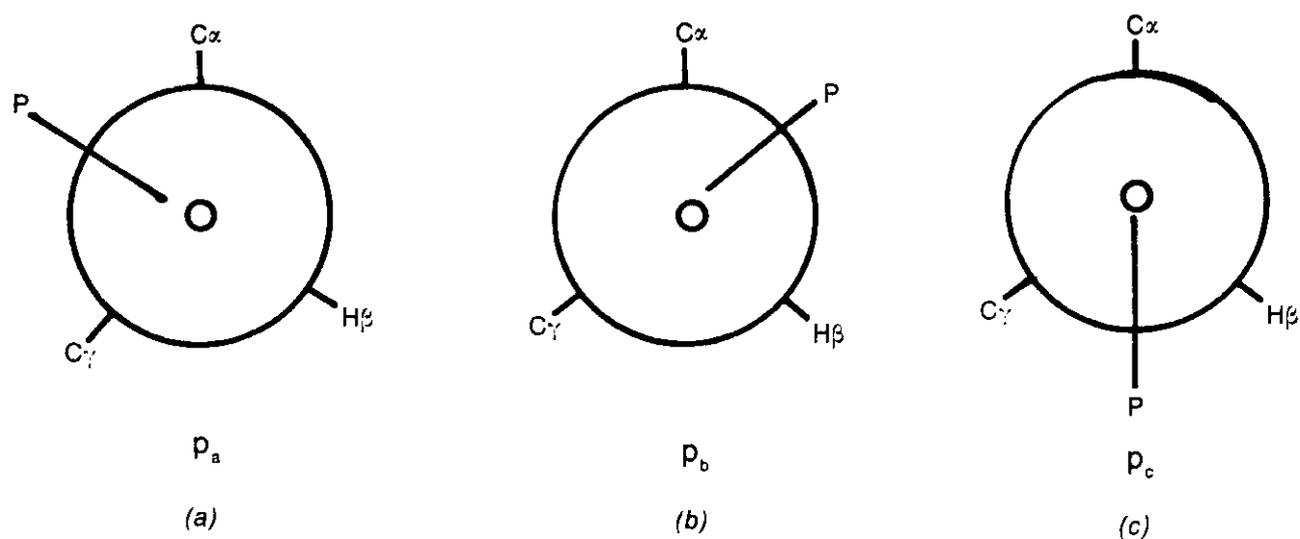


FIG. 1. - P Ser and P Thr rotamers around the $C\beta$ -O bond.

1H -data and from the P_i values of P Thr from the ^{13}C -data we obtain the ΔF_{ij} values resumed in Tab. 1, i.e., the relative free energy differences between the c-trans and a- or b-gauche conformers. The significance of the values in Tab. 1 should not be overestimated, its accuracy being approximately of the order of ± 0.3 Kcal/mol. Nevertheless these values may serve as a qualitative basis to show that the c-trans conformer, in P Ser, is the most stable one, whereas in P Thr a gauche conformer is nearly as stable as the

trans conformer. The two terms influencing this rotational isomerism are the steric repulsion between the bulky groups and the electrostatic interaction between charged groups. From the conformational and energetic data of P Ser, it seems that the rotational isomerism in this compound is mainly determined by the steric interaction of the bulky phosphate P group with the bulky $C\alpha$ (to which are attached the COO^- and NH_3^+ groups) group. Otherwise in P Thr, electrostatic interactions are also important in order to determine

the overall conformation of this compound, together with the steric interaction: the little steric interaction of the phosphate group with the C γ group (the principal steric interaction being with the C α group) destabilizes the *c-trans* position of the phosphate group favouring an electrostatic interaction of this group with the NH $_3^+$ group attached to the C α atom.

CONCLUSION.

The unequivocal conformation of the $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \end{array}$ -CH (COO-)-CHR-O-PO $_3^-$ fragment could be important to understand the mechanisms of many biological processes that could also be of interest in many phar-

macological problems. Even if the accuracy in such a kind of determinations is not precise enough for quantitative predictions, the ^1H and ^{13}C -NMR spectroscopic data can yield qualitative interesting informations about the p_1 and the ΔF_{ij} values involved in the conformational isomerism around the C β -O bond in phosphorylated α -amino acids in solution. To have more reliable results in this kind of studies, a better knowledge of the $J_{i,g}$ for the different isomers for each compound and of the $J_{A,B}$ and $J'_{A,B}$ involved in the Karplus-like relationship is required.

Acknowledgements.

We would like to thank Mr. F. Brogi for technical assistance.

Ricevuto l'8 luglio 1981

Accettato il 17 novembre 1981.

REFERENCES

1. HO, C., MAGNUSON, J. A., MAGNUSON, N. C. & KURLAND, R. J. 1969. Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance studies of phosphoproteins and phosphorylated molecules. Chemical nature of phosphorus atoms in α_2 casein and phosvitin. *Biochemistry*. **8**: 2074.
2. JAMES, T. L. & NOGGLE, H. J. 1972. ^{23}Na NMR studies of sodium ion interactions: phosphatidyl-serine, phosphoserine and phosphorthanolamine. *Anal. Biochem.* **49**: 208.
3. ASSO, M. 1975. Etude par Resonance Magnétique de la phosphoserine complexée en milieu acide. *Rev. Chim. Miner.* **12**: 120.
4. POGLIANI, L., ZIESSOW, D. & KRUGER, C. 1977. Conformational study of phosphoserine in aqueous solution. I) ^{13}C -NMR results. *Org. Magn. Res.* **9**: 504.
5. POGLIANI, L., ZIESSOW, D. & KRUGER, C. 1977. Conformational study of phosphoserine in aqueous solution. II) ^1H -NMR results. *Org. Magn. Res.* **10**: 26.
6. POGLIANI, L. & ZIESSOW, D. 1978. Conformational study of phosphothreonine in aqueous solution, ^1H and ^{13}C NMR results. *Org. Magn. Res.* **11**: 319.
7. PACHLER, K. G. R. 1963. Nuclear Magnetic Resonance study of some α amino acids. I) Coupling constants in alkaline and acidic medium. *Spectrochim. Acta.* **19**: 2085.
8. PACHLER, K. G. R. 1964. Nuclear Magnetic Resonance study of some α amino acids. II) Rotational isomerism. *Spectrochim. Acta.* **20**: 581.
9. POGLIANI, L., ZIESSOW, D. & GRUGER, C. 1979. ^1H and ^{13}C NMR study of phosphopeptides. I) Acetylphosphoserine and acetylphosphothreonine. *Tetrahedron*. **35**: 2867.
10. TYLER, C. & WYRWICZ, A. M. 1979. ^{31}P -Nuclear Magnetic Resonance observations in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **4**: 276.
11. FUKUSAWA, F., FUKUSAWA, K. M., HIRAOKA, B. Y. & HARADA, M. 1976. Identification of the phosphoprotein in the insoluble fraction of bovine dental pulp. *J. Dent. Res.* **55**: 702.
12. MUNKSGAARD, E. C., BUTLER, W. J. & RICHARDSON, W. S. 1977. III) Phosphoprotein from dentin. New approaches to achieve and asses purity. *Prep. Biochem.* **7**: 321.
13. OH'HARA, I. & YANAGIHURA, T. 1977. Nuclear cromatin proteins from rabbit cerebrum, cerebellum and liver: syntesis and phosphorylation. *J. Neurochem.* **29**: 1065.
14. CASINI, A., PERICCIOLI, E., PICCHI, M. P. & POGLIANI, L. 1980. Le costanti di accoppiamento vicinale $^3\text{J}(\text{HP})$ e $^3\text{J}(\text{CP})$ in risonanza magnetica nucleare del protone e del carbonio relativamente allo studio conformazionale di biomolecole in soluzione. *Atti Acc. Sci. Fisioer. Serie XIV*, **12**.

Valutazione qualitativa e quantitativa mediante microscopia elettronica e tecniche associate, del grado di inquinamento da asbesto di talchi per uso industriale, cosmetico e farmaceutico

L. PAOLETTI, S. CAIAZZA, E. CHESSA, S. NOTARGIACOMO e G. DONELLI

Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - È noto che l'esposizione professionale alle polveri di talco può condurre ad un tipo di fibrosi polmonare nota come talcosi. Inoltre un gran numero di dati epidemiologici e sperimentali mette in evidenza il rischio di tumore associato alle componenti fibrose delle polveri di talco, in particolare alla presenza di fibre di asbesto, un contaminante naturale dei giacimenti di talco.

In considerazione di ciò, è sembrato opportuno iniziare uno studio sistematico delle polveri di talco utilizzate in Italia allo scopo di stabilire il loro contenuto in fibre ed, in particolare, il loro contenuto in asbesto.

Nei campioni di talco studiati sono state osservate percentuali di particelle fibrose fino al 20% del totale delle particelle. Circa la metà dei talchi ha rivelato la presenza di asbesto: in un caso, crisotilo (asbesto di serpentino); negli altri casi, tremolite (asbesto anfibolico). La quantità di asbesto variava notevolmente da un campione all'altro, fino al 30% della frazione fibrosa.

Circa il 75% delle fibre di asbesto osservate nelle polveri di talco è risultata avere uno spessore inferiore a 0,4 µm, cioè al potere risolutivo del microscopio ottico che è tuttora strumento più utilizzato per lo studio di particelle e fibre minerali.

Summary (Qualitative and Quantitative Evaluation of Asbestos Contamination in Industrial, Cosmetic and Pharmaceutical Talcs by Analytical Electron Microscopy). - *It is well known that occupational exposure to talc is associated with a diffuse interstitial lung scarring - talcosis. Moreover, many experimental and epidemiological data show that the fibrous fraction of talc powders is more hazardous than the platy one. Indeed several studies suggest that exposure to fibrous talc increases the risk of cancer in man as a result of the presence of asbestos fibers contaminating natural talc deposits.*

In this connection, it seemed suitable to start a systematic research on talc powders used in Italy, in order to establish their fiber contents and the proportion of asbestos in fibrous material. The samples of talc powders demonstrated fiber contents up to 20% of total particles. About half of talc powders revealed the presence of asbestos: in only one sample was present chrysotile (a serpentine asbestos), in the other ones tremolite (an amphibolic asbestos). The amount of asbestos was very different from one sample to another, reaching, in some cases, 30% of the fibrous fraction. About 75% of observed fibers of asbestos was thinner than 0.4 µm, i.e. below the resolving power of light microscopy which is up today the most utilized technique in evaluating the environmental pollution due to asbestos.

INTRODUZIONE.

Il minerale di talco è un silicato di Mg con caratteristica struttura lamellare in cui ogni lamella è costituita da uno strato di Mg (OH)₂ compreso tra due strati di SiO₄ [1]. I cristalli di talco sono formati dalla sovrapposizione di tali lamelle tenute insieme dai deboli legami di Van der Waals che, permettendo lo scorrimento delle lamelle le une sulle altre, conferiscono al talco le sue proprietà lubrificanti.

Nei giacimenti naturali è raro trovare cristalli di talco contenenti esclusivamente Mg; anzi, molto frequentemente, tale catione è sostituito da Fe, Ni, Cr, Mn, ecc. Inoltre, tali giacimenti non sono in genere monominerali, ma, essendo il risultato di processi geologici che portano alla formazione di un gran numero di altre fasi minerali, risultano spesso largamente eterogenei per specie minerali e relativi rapporti quantitativi [2]. Non è sorprendente, quindi, che molti materiali presenti sul mercato internazionale come « polveri di talco » possano contenere anche meno del 50% in peso di effettivo minerale di talco [3].

Nella Tab. 1 sono elencati i principali minerali che possono trovarsi associati al talco nei depositi naturali: fra essi, in particolare, due varietà fibrose di anfiboli, la tremolite e la antofillite, ed una varietà fibrosa di serpentini, il crisotilo, costituiscono alcune delle più note varietà di asbesto [2, 4, 5].

Trovando oggi le « polveri di talco » largo impiego in una miriade di processi industriali e di prodotti di consumo (per es., nella fabbricazione di prodotti ceramici e di materiali isolanti, nell'industria della carta, come additivo negli asfalti, negli insetticidi, nei prodotti cosmetici, come eccipienti nei preparati farmaceutici, ecc.) [6], sempre più vasti gruppi di popola-

Tabella 1. - Minerali comunemente associati al talco nei depositi naturali.

Carbonati: Calcite, Dolomite, Magnesite
Anfiboli: Tremolite, Antofillite
Serpentini: Crisotilo, Antigorite, Lizardite
Altri: Quarzo, Mica, Clorite, Rutile, Pirofillite

zione rappresentati sia dagli addetti ai processi di produzione che prevedono una qualche utilizzazione del talco, sia dai consumatori dei prodotti che lo contengono, vengono a contatto con il talco e con gli inquinanti ad esso associati.

È un dato da tempo acquisito che l'esposizione professionale alle polveri di talco può condurre a quel tipo di fibrosi polmonare che va sotto il nome di talcosi. Inoltre, un gran numero di dati epidemiologici e di risultati sperimentali mette in evidenza il rischio di tumore associato alle componenti fibrose delle polveri di talco, e cioè sia alle particelle fibrose del talco stesso, sia a quelle presenti nel talco come impurezze.

In letteratura sono riferite, in particolare, molte osservazioni di « asbestos bodies » nel tessuto polmonare di lavoratori esposti al talco [7-11]; è stata inoltre osservata una maggior proporzione di fibre fra le particelle minerali trovate nel tessuto polmonare rispetto a quella presente nel talco cui il lavoratore era stato esposto [9].

Uno studio epidemiologico riguardante lavoratori addetti alla estrazione del talco ha dimostrato per questi un rischio di tumore, a livello di vari organi bersaglio, di 3 o 4 volte maggiore rispetto al resto della popolazione, come dati recenti confermano per la esposizione professionale all'asbesto [12]; inoltre, le alterazioni istologiche polmonari osservate negli stessi erano praticamente indistinguibili da quelle osservate in lavoratori addetti alla estrazione dell'asbesto [13]. Recentemente è stata anche ipotizzata una relazione tra rischio di tumori ovarici ed uso di talchi contenenti asbesto [14, 15].

Tuttavia, alla relativa abbondanza di dati concernenti il rischio associato alla componente fibrosa delle polveri di talco ed alla conseguente patologia corrisponde una notevole carenza di dati analitici sulla composizione in generale, e sulla componente fibrosa in particolare, delle polveri di talco.

Uno studio del 1968 condotto da ricercatori statunitensi [16] su 22 campioni di talco per uso cosmetico ha fornito valori compresi tra l'8 % ed il 30 % di particelle fibrose, mentre un analogo studio su 80 campioni di talco industriale condotto da ricercatori dell'N.B.S. [17] ha messo in evidenza la presenza di particelle fibrose nei campioni in percentuali variabili dal 2 % al 30 %; in ambedue i casi non era precisata la frazione che di tale percentuale era costituita da asbesto.

Ricerche condotte in Gran Bretagna su polveri di talco per vari usi [18] hanno rivelato che, dei 27 campioni esaminati, 3 contenevano tremolite; dati più completi e significativi sono riferiti [19] su 20 talchi per uso cosmetico e su un talco per uso farmaceutico prelevati nell'area di New York dal 1971 al 1975: dei prodotti cosmetici analizzati, 10 contenevano tremolite ed antofillite in quantità variabile dallo 0,1 % al 14 % in peso e 2 mostravano quantità rilevabili di crisotilo.

In considerazione di quanto esposto e della carenza in genere di dati relativi alla situazione italiana, è sembrato opportuno avviare uno studio sistematico delle polveri di talco utilizzate in Italia volto in particolare a determinare la percentuale di particelle fibrose presenti in tali polveri e la frazione che di esse è classificabile come asbesto. A tale scopo è stata utilizzata la microscopia elettronica a trasmissione e le tecniche analitiche ad essa associate, quali la diffrazione degli elettroni e la microanalisi a raggi X che, impiegate

parallelamente, permettono uno studio morfologico-strutturale ed una analisi chimica delle particelle ad elevati livelli di risoluzione.

Il presente lavoro descrive nel seguito la tecnica originale specificamente messa a punto per la preparazione e la analisi dei campioni, insieme ad un commento sulla validità dei dati per suo mezzo ottenibili. Vengono inoltre illustrati alcuni dati preliminari ottenuti dallo studio di un primo gruppo di campioni di talco per uso industriale, cosmetico e farmaceutico.

METODO DI PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI TALCO PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE.

Una piccola quantità di talco prelevata direttamente dalla confezione originale, senza operare alcun tentativo di miscelarne ed omogeneizzarne il contenuto al fine di evitare eventuali frammentazioni delle particelle, viene pesata e poi dispersa in una soluzione di formvar in dicloroetano allo 0,5 % ÷ 0,8 %, fino ad ottenere una concentrazione di 0,02 ÷ 0,05 gr/ml di talco nella soluzione.

Dopo aver agitato la sospensione insufflandovi aria con una pipetta Pasteur per evitare sedimentazione, se ne prelevano con la stessa due o tre gocce per deporle su una lamina di mica appena sfaldata dove si « strisciano » per mezzo di una seconda lamina di mica opportunamente inclinata.

Una volta evaporato il solvente, la pellicola sottile e continua che ingloba le particelle di talco, aderente alla lamina di mica, può essere separata da questa per semplice immersione, in posizione inclinata, in un recipiente contenente H₂O bidistillata; lasciata fluttare sulla superficie del liquido, la pellicola viene quindi raccolta agevolmente su retini portaoggetti. Sulla pellicola adesa a tali retini viene evaporato sotto vuoto uno strato sottile di carbone con funzione di supporto conduttore, resistente a sollecitazioni termiche e meccaniche. Il preparato è quindi pronto per l'osservazione sia al microscopio elettronico, sia eventualmente al microscopio ottico.

AFFIDABILITÀ DEL METODO PROPOSTO.

Nella elaborazione del metodo di preparazione dei campioni di talco per la loro analisi con le tecniche di microscopia elettronica sono state prefissate alcune condizioni, tali da garantire la significatività dei dati ottenibili. In particolare, si è voluto garantire che:

a) i risultati fossero riproducibili;

b) i rapporti fra le particelle fibrose ed altri tipi di particelle non risultassero alterati dalle procedure di preparazione a causa di possibili frammentazioni meccaniche delle particelle stesse o di eventuali processi di arricchimento o di impoverimento della frazione fibrosa;

c) i campioni risultassero idonei per essere esaminati con tecniche di diffrazione degli elettroni e di analisi a raggi X con microsonda elettronica, oltreché stabili per eventuali ripetute osservazioni, anche al microscopio ottico.

La riproducibilità dei risultati ottenibili nella valutazione della frazione fibrosa delle polveri di talco è stata verificata preparando, con la tecnica in precedenza descritta, una serie di films per alcuni dei tipi di polvere di talco studiati. Per questi è stata determinata la frazione fibrosa su differenti films e su zone diverse dello stesso film. Per ogni determinazione, il conteggio è stato effettuato fino a totalizzare 50 particelle fibrose, e comunque su almeno 20 campi, rappresentati ognuno da una maglia del retino di rame su cui è poggiato il film di formvar con le particelle inglobate.

I valori ottenibili da una serie di determinazioni della frazione fibrosa f di un prestabilito numero N di particelle si distribuiscono in modo binomiale [20] e la corrispondente deviazione standard, espressa in funzione della probabilità a priori p di osservare una fibra e del numero N di particelle osservate, è:

$$\sigma = [(1-p) \cdot p \cdot N]^{1/2}$$

Per ogni tipo di polvere di talco considerato è stato calcolato il valor medio $\bar{f} \approx p$ dei valori ottenuti per la frazione fibrosa. Una prima valutazione della riproducibilità e compatibilità dei risultati è stata effettuata verificando se lo scarto tra il numero di fibre osservato ed il numero di fibre atteso $[N_i f_i - N_i \bar{f}]$, essendo N_i il numero di particelle osservate nella i -esima misura, fosse maggiore o minore di $\sigma_i = [(1-\bar{f}) \cdot \bar{f} \cdot N_i]^{1/2}$. Mentre nel 67% circa dei casi [20] lo scarto sarebbe dovuto risultare inferiore alla deviazione standard, in un numero di casi apprezzabilmente superiore al previsto si osservava invece uno scarto maggiore di σ_i , e ciò si verificava per tutti i tipi di polvere di talco considerati.

Per studiare più dettagliatamente la compatibilità statistica dei risultati è stata quindi eseguita una più precisa analisi considerando, per ciascun tipo di polvere, il numero di fibre ed il numero di particelle misurati quali elementi di una « tavola di contingenza » e calcolando il corrispondente valore di χ^2 attraverso un confronto tra i valori numerici ottenuti ed i relativi valori attesi [21]. I valori di χ^2 così ottenuti sono tuttavia risultati troppo elevati (con una probabilità superiore in genere al 50% per un $\chi^2 <$ di quello ottenuto) per poter accettare l'ipotesi della compatibilità statistica dei risultati ottenuti.

Una attenta riconsiderazione delle caratteristiche dei campioni esaminati e del metodo di conteggio utilizzato ha messo in evidenza che i risultati meno affidabili erano quelli relativi alle conte effettuate su campi nei quali erano presenti estesi aggregati di particelle (Fig. 1) oppure un numero eccessivamente alto delle stesse, molte delle quali venivano così a trovarsi a contatto (Fig. 2). Si è potuto inoltre stabilire che la notevole variabilità nei risultati dei conteggi era da porsi anche in relazione alla mancata definizione di una soglia di dimensioni minime che le particelle dovevano possedere per essere considerate nella statistica. Si sono perciò fissati più precisi criteri di conteggio, stabilendo di non considerare campi in cui fossero presenti ammassi di particelle e di prendere in considerazione nelle conte solo le particelle di dimensioni superiori od uguali a $2 \mu\text{m}$ (Fig. 3).

Con tali criteri sono stati quindi rianalizzati gli stessi campioni di talco esaminati in precedenza, ottenendo questa volta una ottima « compatibilità statistica » dei

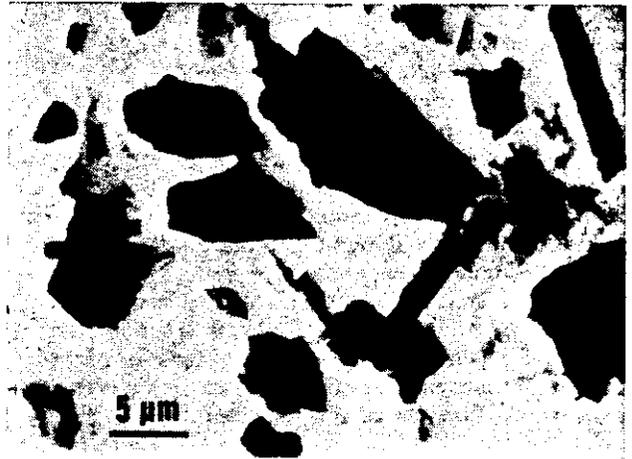


FIG. 1. - Particelle di talco aggregate ed in numero eccessivo per un conteggio statisticamente significativo.



FIG. 2. - Particelle di talco aggregate ed in numero eccessivo per un conteggio statisticamente significativo.

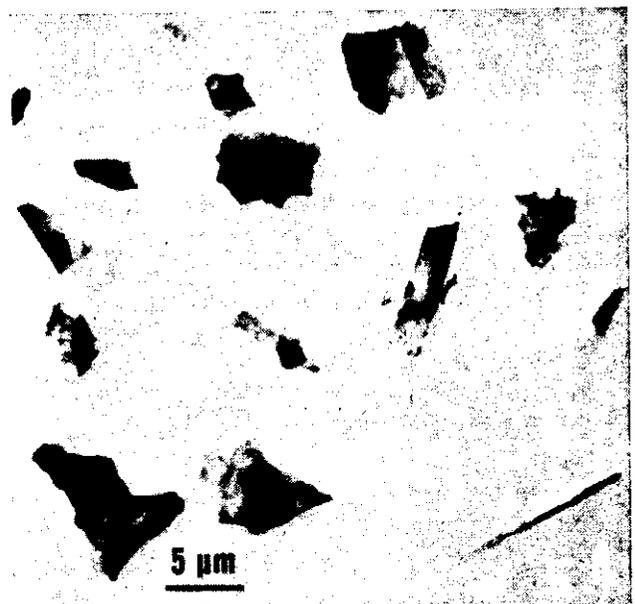


FIG. 3. - Particelle di talco distribuite in modo ottimale per un conteggio statisticamente significativo.

risultati; in Tab. 2 sono elencati i valori di χ^2 ottenuti e quelli corrispondenti a probabilità dell'1 %, 5 % e 10 % per gli stessi gradi di libertà [22].

Una ulteriore verifica circa l'eventualità che il metodo adottato per l'inglobamento delle particelle nel film di formvar potesse portare ad un arricchimento o ad un impoverimento della frazione fibrosa è stata inoltre effettuata studiando, per ogni tipo di polvere, la correlazione tra il numero totale di particelle presenti per unità di superficie del film (come unità di superficie è stata adottata l'area di una maglia del retino e le particelle sono state contate secondo i criteri restrittivi appena discussi) e la percentuale di particelle fibrose presenti su tale superficie, sia in diverse zone dello stesso film, sia su film differenti.

Tabella 2. - Test del χ^2 sulla riproducibilità dei risultati nella valutazione della frazione fibrosa delle polveri di talco.

CAMPIONI	χ^2 calcolato	Valori del χ^2 corrispondenti a una probabilità del:		
		1 %	5 %	10 %
A	3,1	1,2	2,2	2,8
B	4,1	3,6	5,2	6,3
C	7,9	5,2	7,3	8,5
D	4,1	5,2	7,3	8,5
E	5,1	11,5	14,6	16,5
F	3,7	9,5	12,3	14,0
G	2,5	1,2	2,2	2,8

Tabella 3. - Correlazione fra il numero di particelle per unità di superficie del film e percentuale di particelle fibrose presenti.

CAMPIONI	Parametro di correlazione r^2
A	0,22
B	0,13
C	0,03
D	0,13
E	0,002
F	0,41
G	0,06

In tutti i casi il parametro di correlazione r^2 [21] tra il numero di particelle per unità di superficie e la frazione fibrosa di esse è risultato molto vicino a zero; in Tab. 3 sono riportati i valori di r^2 ottenuti per le polveri di talco considerate.

CRITERI STATISTICI PER LA VALUTAZIONE DEL RAPPORTO FIBRE/PARTICELLE PRESENTI IN CAMPIONI DI TALCO.

Per i valori ottenibili da analisi quantitative della frazione fibrosa di un prestabilito numero di particelle, come anche della frazione classificabile come asbesto di un prefissato numero di fibre, è attesa, come si è

detto, una distribuzione binomiale [21]; ciò permette di valutare il numero di particelle che è necessario osservare per ottenere la precisione di misura desiderata.

Per una distribuzione binomiale, la deviazione standard relativa (espressa in percentuale del valor medio μ) in funzione della probabilità a priori p di osservare una fibra e del numero N di particelle osservate è data da:

$$\sigma/\mu = [(1-p)/(N \cdot p)]^{1/2}$$

La Tab. 4, che riporta tale deviazione standard in funzione di p e di N , evidenzia che, per valutare la concentrazione delle fibre con una accettabile precisione (deviazione standard relativa $< 10\%$ - 15%), anche per concentrazioni comprese fra il 5 % ed il 30 %, N deve essere dell'ordine di grandezza di 10^3 e deve aumentare almeno di un fattore 10 per concentrazioni inferiori.

Tabella 4. - Deviazione standard relativa per una distribuzione binomiale in funzione del numero totale N di particelle osservate e della probabilità p di osservare una particella fibrosa.

p	$N=100$ %	$N=1000$ %	$N=10000$ %
0,01	99	31	10,0
0,05	43	14	4,3
0,10	30	9	3
0,15	24	7	2,4
0,20	20	6	2
0,25	17	5	1,7
0,35	15	5	1,5

Una approssimativa stima della probabilità a priori di osservare una fibra può essere ottenuta con una valutazione della concentrazione di fibre mediante un preventivo conteggio su di un piccolo campione.

Il numero N di particelle totali da osservare nella valutazione del rapporto fibre/particelle può essere calcolato con la precedente espressione in funzione della precisione desiderata per la misura.

In considerazione del fatto che alcuni campioni di talco possono avere un contenuto estremamente basso, e perciò difficilmente rivelabile, di fibre di asbesto, è opportuno definire un criterio volto a fissare un limite superiore per il livello di inquinamento nel caso di mancata rivelazione di fibre di asbesto in un determinato campione. In tale eventualità, ovviamente nulla autorizza a concludere che il talco sia esente da asbesto.

In base a semplici considerazioni probabilistiche [20] si può calcolare la probabilità p di osservare almeno una fibra di asbesto fra un numero N di particelle fibrose in funzione del rapporto ϑ fra il numero di fibre di asbesto ed il numero di fibre totali ($p = 1 - (1-\vartheta)^N$).

Dalla Tab. 5, che riporta tale probabilità in funzione di N e ϑ , si desume, per esempio, che, per concentrazioni abbastanza piccole ($\vartheta < 10^{-4}$), la probabilità di osservare una fibra di asbesto è molto vicina a zero per campioni dell'ordine di $10^2 \div 10^3$ particelle.

Tabella 5. - Probabilità di osservare almeno una fibra di asbesto fra un numero N di particelle fibrose in funzione del rapporto -.

e	N					
	50	100	200	500	1000	3000
10^{-4}	0,005	0,01	0,02	0,05	0,10	0,18
$5 \cdot 10^{-4}$	0,025	0,05	0,10	0,22	0,39	0,63
10^{-3}	0,05	0,10	0,18	0,39	0,63	0,86
$2 \cdot 10^{-3}$	0,10	0,18	0,33	0,63	0,86	0,98
$3 \cdot 10^{-3}$	0,14	0,26	0,45	0,78	0,95	1,00
$5 \cdot 10^{-3}$	0,22	0,39	0,63	0,92	0,99	1,00
$7 \cdot 10^{-3}$	0,30	0,50	0,75	0,97	1,00	1,00
10^{-2}	0,39	0,63	0,87	0,99	1,00	1,00
$2 \cdot 10^{-2}$	0,64	0,87	0,98	1,00	1,00	1,00
$5 \cdot 10^{-2}$	0,92	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10^{-1}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Per fissare un limite superiore alla presunta concentrazione di asbesto nel campione, si è scelto un opportuno valore della probabilità p di individuare almeno una fibra di asbesto nel campione di fibre osservate: per il fine che ci si propone si è ritenuto significativo un valore di $p = 0,9$ (criterio del 90 % di probabilità); in funzione di tale valore si è poi calcolata quella concentrazione che, per il numero di fibre osservate, fornisce quel valore di probabilità $p (= 0,9)$.

Il valore così determinato per la concentrazione dell'asbesto nel campione è stato considerato un limite superiore per tale concentrazione (una concentrazione superiore avrebbe dato una probabilità superiore al 90 %, e quindi in pratica la certezza, di osservare una fibra di asbesto).

Il limite superiore della concentrazione di fibre di asbesto così prefissato può risultare un parametro significativo ed utile per il confronto dei risultati relativi a più operatori, se i limiti superiori dell'inquinamento così calcolati sono riferiti tutti al medesimo valore di p (allo stesso criterio di probabilità).

IDENTIFICAZIONE DELLE FIBRE DI ASBESTO MEDIANTE DIFFRAZIONE ELETTRONICA E LORO TIPIZZAZIONE MEDIANTE MICROANALISI A RAGGI X.

Le tecniche di microscopia elettronica analitica, diffrazione elettronica e microanalisi a raggi X possiedono la sensibilità necessaria per la identificazione della struttura cristallina e per l'analisi chimica di una particella o fibra minerale [23, 24] di dimensioni anche inferiori ai 20 nm [25, 26].

Per la valutazione dell'inquinamento da asbesto nei talchi occorre ricercare nei campioni studiati le varietà fibrose della tremolite e dell'antofillite ed una varietà fibrosa dei serpentini, il crisotilo [2-4]. Le figure di diffrazione elettronica di tali minerali [27] sono complesse, tuttavia presentano alcune peculiarità che permettono di attribuirle con sicurezza ad una fibra di asbesto anfibolico o ad una di asbesto di serpentino [23, 28].

Il crisotilo [23, 27, 28] presenta una figura di diffrazione (Fig. 4) con spots disposti su layers perpendicolari all'asse del reticolo cilindrico dei cristalli fibrosi, con una spaziatura tra layers pari a circa 0,53 nm; la caratteristica più tipica della sua figura di diffrazione è data dagli spots diffusi all'infuori della prima layer-line della figura di diffrazione che tendono a farla assomigliare ad una diffrazione a raggi X ottenuta con la tecnica del campione rotante.

Può anche accadere che le fibre di crisotilo perdano la H_2O di cristallizzazione e divengano amorfe per il conseguente collasso della struttura cristallina tanto da non poter essere più osservata una ben definita figura di diffrazione.

L'antofillite e la tremolite [23, 27, 28] hanno figure di diffrazione molto simili tra loro (Figg. 5, 6) ed agli altri anfiboli fibrosi con layers di spots perpendicolari all'asse delle fibre e con una spaziatura di circa 0,53 nm. In effetti la struttura cristallina di tutti gli anfiboli fibrosi è molto simile [4], i vari tipi minerali differenziandosi solamente per la natura chimica dello strato di cationi che lega fra di loro le catene del silicio; le dimensioni delle celle unitarie dei diversi anfiboli risultano in conseguenza molto vicine (le spaziature reticolari differiscono di meno dello 0,5 %) e le figure di diffrazione molto somiglianti per tutte le varie specie di anfiboli.

L'osservazione delle figure di diffrazione elettronica può essere un utile mezzo per riconoscere rapidamente la presenza di asbesto di serpentino o di asbesto anfi-

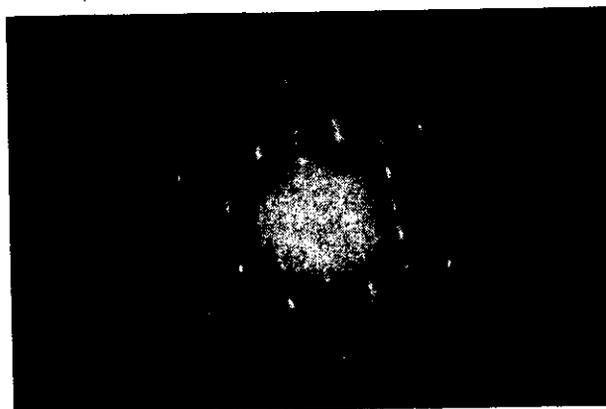


FIG. 4. - Figura di diffrazione elettronica di una fibra di crisotilo.

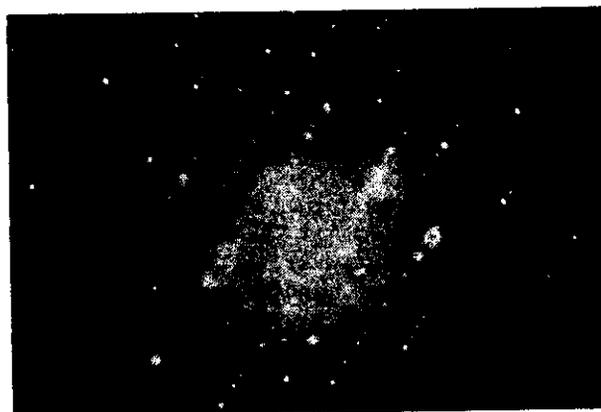


FIG. 5. - Figura di diffrazione elettronica di una fibra di antofillite.

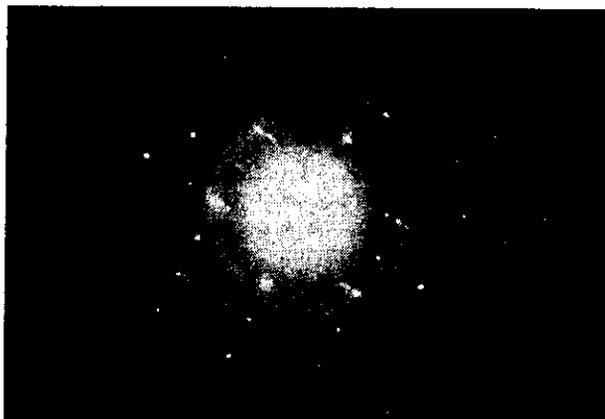


FIG. 6. - Figura di diffrazione elettronica di una fibra di tremolite.

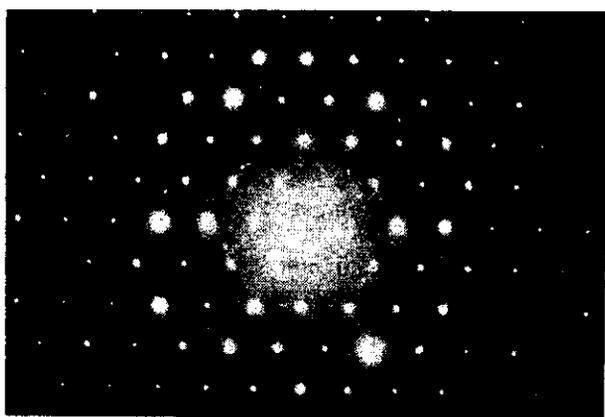


FIG. 7. - Figura di diffrazione elettronica di una particella fibrosa di talco.

bolico tra le particelle con struttura cristallina pseudo-esagonale del talco (Fig. 7) [29]; tuttavia, pur essendo possibile in linea di principio distinguere le diverse varietà di anfibioli fibrosi con un accurato studio dei relativi patterns di diffrazione, l'identificazione inequivocabile del tipo minerale degli asbesti anfibioli può essere più efficacemente effettuata con l'analisi chimica mediante microsonda elettronica [23].

Se il campione studiato con questa tecnica è sufficientemente sottile [30, 31], e questa è generalmente la condizione in cui si trova una singola fibra di asbesto, sarà in pratica trasparente ai raggi X primari prodotti in esso dal fascio elettronico incidente; in prima approssimazione, allora, assorbimento dei raggi X e fluorescenza possono essere trascurati. In queste condizioni il rapporto delle intensità delle righe dello spettro a raggi X di due elementi sarà proporzionale al rapporto delle concentrazioni nel campione dei due elementi stessi. La costante di proporzionalità, che rende conto della efficienza relativa di rivelazione del sistema utilizzato per i due elementi, può essere facilmente determinata mediante una taratura con uno standard a concentrazioni note.

La determinazione dei rapporti delle concentrazioni degli elementi chimici permette di identificare senza ambiguità il tipo minerale della fibra di asbesto; tali rapporti costituiscono quasi delle impronte digitali chimiche per il crisotilo e per i vari tipi di asbesti anfibioli [2, 4].

In Tab. 6 sono riportate le concentrazioni degli elementi chimici nelle principali varietà di asbesto. In particolare, per la individuazione del tipo di anfibiolo presente nei talchi, come si vede dalla tabella precedente, anche la sola rivelazione qualitativa del Ca (per la tremolite) e del Mg (per la antofillite) permette in modo inequivocabile il riconoscimento del minerale inquinante.

Tabella 6. - *Composizione chimica delle più comuni varietà di asbesto espressa in % di ossido.*

	Crisotilo	Crocidolite	Amosite	Antofillite	Tremolite
SiO ₂	41,8-42	49-53	49-53	56-58	55-60
MgO	41,8-42,8	0-3	1-7	28-34	21-26
FeO	0,1-1,6	13-20	34-44	3-12	0-4
Fe ₂ O ₃	0,2-1,3	17-20	—	—	0-0,5
Al ₂ O ₃	0,1-0,5	0-0,2	—	0,5-1,5	0-2,5
CaO	0-0,1	0,3-2,7	—	—	11-13
K ₂ O	0-0,1	0-0,4	0-0,4	—	0-0,6
Na ₂ O	—	4-8,5	—	—	0-1,5
H ₂ O	13,6-14	2,5-4,5	2,5-4,5	1-6	0,5-2,5

RISULTATI E DISCUSSIONE.

I dati appresso riportati rappresentano presumibilmente i primi dati relativi al contenuto in particelle fibrose, ed in fibre di asbesto in particolare, di polveri di talco impiegate in Italia.

È tuttavia opportuno precisare che con tale studio si è voluta ottenere una valutazione quantitativa attendibile della percentuale di particelle fibrose presente nelle polveri di talco esaminate ed in particolare della percentuale di fibre classificabili come asbesto. Il metodo proposto non è quindi in grado di fornire, nella sua attuale versione, valutazioni attendibili della percentuale in peso di minerali diversi dal talco presenti nelle polveri, anche se tentativi per ottenere dati in tal senso sono in linea di principio possibili.

Applicando il metodo da noi elaborato ed i criteri discussi sono stati studiati 15 diversi campioni di talco reperibili sul mercato italiano, dei quali 4 per uso industriale, 6 per uso cosmetico ed igienico e 5 per uso farmaceutico.

I campioni di polveri preparati con il metodo del film di formvar sono risultati tali da poter verificare, in modo soddisfacente, la condizione di idoneità richiesta dagli studi mediante diffrazione elettronica e microanalisi a raggi X, nonché dalle stesse osservazioni di microscopia ottica in campo chiaro, dimostrando tra l'altro un notevole grado di stabilità anche dopo ripetute osservazioni.

Le analisi statistiche effettuate hanno dimostrato il notevole grado di affidabilità e riproducibilità dei risultati ottenibili per campioni di polveri preparati con il metodo descritto, a condizione che vengano seguite puntualmente le indicate procedure di conteggio.

Adeguandosi alle normative internazionali ed in particolare a quelle adottate dalla CEE [32], sono state considerate come particelle fibrose quelle con un rapporto lunghezza/larghezza maggiore o uguale a 3 e con

Tabella 7. - Percentuale di particelle fibrose e di fibre di asbesto in alcuni talchi industriali.

	% Fibre nel particolato	% Fibre > 5µm nel particolato	% Fibre asbesto su fibre totali	% Fibre asbesto nel particolato	Varietà di asbesto
A	26,5±1,7	2,8±0,6	<2	<0,5	—
B	5,7±0,3	0,8±0,1	8±2,7	0,5±0,2	Tremolite
C	4,7±0,7	0,5±0,2	4±1,9	0,2±0,1	Crisolite
D	2,6±0,3	0,6±0,1	<2	<0,05	—

Tabella 8. - Percentuale di particelle fibrose e di fibre di asbesto in alcuni talchi farmaceutici.

	% Fibre nel particolato	% Fibre > 5µm nel particolato	% Fibre asbesto su fibre totali	% Fibre asbesto nel particolato	Varietà di asbesto
A	5,4±0,8	1,1±0,4	8±2,7	0,4±0,2	Tremolite
B	8,7±1,0	3,1±0,6	<2	<0,2	—
C	4,5±0,6	0,4±0,2	14±3,4	0,6±0,2	Tremolite
D	3,1±0,4	0,9±0,2	21±4	0,7±0,2	Tremolite
E	3,7±0,4	1,0±0,2	17±3,7	0,6±0,2	Tremolite

Tabella 9. - Percentuale di particelle fibrose e di fibre di asbesto in alcuni talchi cosmetici.

	% Fibre nel particolato	% Fibre < 5µm nel particolato	% Fibre asbesto su fibre totali	% Fibre asbesto nel particolato	Varietà di asbesto
A	6,1±0,9	1,6±0,5	<2	<0,1	—
B	21,6±1,6	5,0±0,9	<2	<0,4	—
C	11,1±1,1	3,2±0,6	<2	<0,2	—
D	4,9±0,5	0,7±0,2	32±4,7	1,6±0,3	Tremolite
E	10,3±0,7	3,2±0,4	<2	<0,2	—
F	5,1±0,6	1,8±0,4	10±3	0,5±0,2	Tremolite

larghezza minore di 3 µm; sono state considerate separatamente fibre di dimensioni rispettivamente superiori ed inferiori ai 5 µm di lunghezza secondo il criterio, contenuto nelle citate normative, che considera più dannose per i loro effetti biologici le fibre più lunghe di 5µm.

I conteggi per la valutazione delle percentuali di particelle fibrose sono stati effettuati su un numero di particelle totali per ogni tipo di talco variabile tra $2 \cdot 10^8$ e $10 \cdot 10^8$ in modo tale che l'errore attribuibile alle varie percentuali (deviazione standard calcolata con l'espressione data nei criteri statistici) risultasse, in generale, non superiore al 10 %.

Come risulta dai dati riportati nelle Tab. 7, 8 e 9, tutte le polveri di talco osservate contenevano percentuali di particelle fibrose comprese fra il 2 % ed oltre il 25 %; dalla stessa tabella si può desumere che le percentuali di fibre (sul totale delle particelle) con lunghezza superiore a 5 µm sono risultate estremamente variabili arrivando a differire anche di un fattore 10.

Per ogni tipo di polvere di talco è stato considerato un campione di 100 particelle fibrose scelte a caso; di

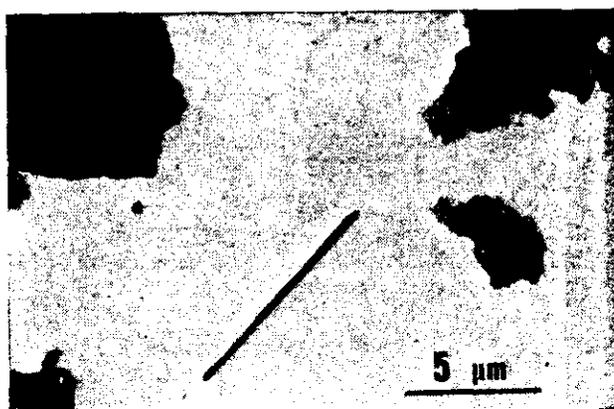


FIG. 8. - Fibre di tremolite associate a particelle di talco.



FIG. 9. - Fibre di tremolite associate a particelle di talco.



FIG. 10. - Fibre di tremolite associate a particelle di talco.



FIG. 11. - Fibre di crisotile associate a particelle di talco.

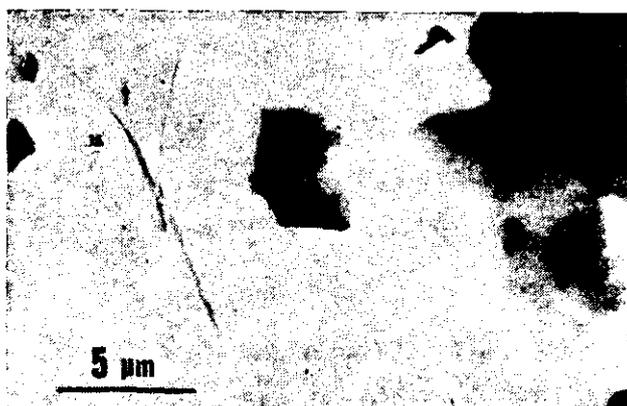


FIG. 12. - Fibre di crisotilo associate a particelle di talco.

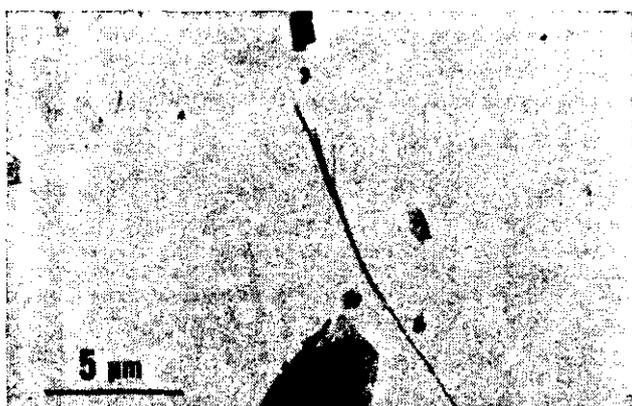


FIG. 13. - Fibre di crisotilo associate a particelle di talco.

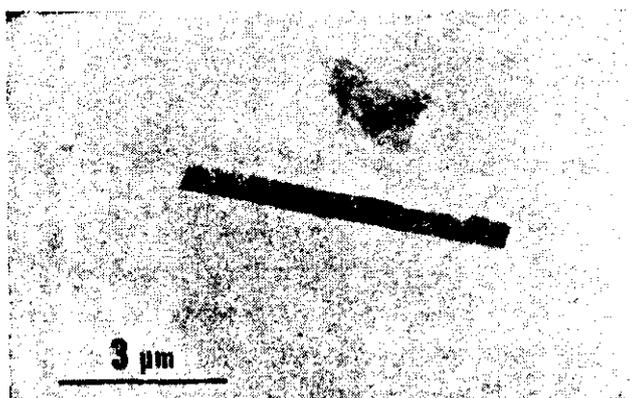


FIG. 14. - Particella fibrosa di talco.

ciascuno sono stati studiati sia la figura di diffrazione elettronica, sia il contenuto di Ca ed Mg con la tecnica della microanalisi a raggi X.

Come è riportato nelle Tab. 7, 8 e 9, in otto campioni su quindici è stata rivelata la presenza di fibre di asbesto: in sette casi fibre di tremolite, in un caso fibre di crisotilo. Nelle Figg. 8-13 sono riportate alcune tipiche fibre di tali varietà minerali, osservate nei campioni studiati.

È interessante osservare che approssimativamente i 3/4 delle fibre di asbesto esaminate avevano un diametro inferiore a circa $0,4 \mu\text{m}$, cioè al potere risolutivo ottenibile di routine con la microscopia ottica in contra-

sto di fase che è stata la tecnica finora più utilizzata per l'osservazione di particelle e fibre minerali microscopiche.

Per i campioni di polvere di talco nei quali non è stata rivelata la presenza di fibre di asbesto, sono stati presi come limiti superiori per il contenuto di asbesto quelli corrispondenti alle relative precisioni di misura, valutate in base al criterio esposto (criterio del 90% di probabilità); tali limiti superiori sono riportati nelle Tab. 7, 8 e 9. È da notare che in tutte le polveri di talco studiate sono state osservate con una certa frequenza particelle fibrose di talco, morfologicamente molto simili alle fibre degli anfiboli (Fig. 14) ma facilmente riconoscibili in base ai tipici patterns di diffrazione elettronica [19, 23].

Nei campioni studiati, inoltre, sono state osservate frequentemente particelle di minerali comunemente associati al talco (Tab. 1), in particolare carbonati di Ca e Mg; come è stato già sottolineato, non è stato tuttavia fatto alcun tentativo di valutarne in modo quantitativo il contenuto nei campioni di talco.

Nella presente fase dell'indagine non si è ritenuto opportuno tentare di risalire all'origine geologicomineraria dei pochi campioni studiati, rimandando ad una successiva fase di studio, su un più vasto e rappresentativo insieme di campioni, tale aspetto del problema.

In conclusione, riteniamo che il metodo da noi proposto e verificato sui quindici campioni presi in considerazione sia adeguato ed in grado di fornire risultati attendibili e riproducibili per la valutazione della componente fibrosa e dell'inquinamento da asbesto di campioni di talco. I dati ottenuti dallo studio di questo primo gruppo di campioni hanno messo in evidenza, in taluni casi, un livello di inquinamento sorprendentemente elevato, tale da esporre i soggetti che in vario modo vengono a contatto con tali talchi ad un rischio presumibilmente inaccettabile. Ciò sottolinea la necessità di approfondire la conoscenza delle caratteristiche dei talchi oggi utilizzati in Italia e di pervenire in tempi brevi, tanto più ove i risultati qui presentati trovassero conferma su vasta scala, ad una opportuna regolamentazione in materia.

La normativa e la legislazione nazionale ed internazionale relative alle caratteristiche delle polveri di talco sono a tutt'oggi estremamente carenti; le uniche prescrizioni relative al contenuto di anfiboli fibrosi nel talco sono quelle emanate dalla associazione dei produttori statunitensi di cosmetici C.T.F.A. (Cosmetic Toiletry and Fragrance Association), la quale nel 1976 [33] ha stabilito che nelle polveri di talco utilizzate nella produzione di cosmetici e polveri igieniche almeno il 90% del contenuto debba essere effettivamente rappresentato da minerale di talco e che il materiale, esaminato sia con la diffrattometria X, sia con la microscopia ottica, non debba comunque contenere quantità rivelabili di minerali di asbesto fibrosi.

Per quanto riguarda il talco usato come eccipiente in vari preparati farmaceutici, sia la Farmacopea europea, sia quella Italiana non hanno prescritto sino ad ora alcun tipo di controllo analitico concernente la contaminazione da asbesto del talco stesso; va tuttavia segnalato che il problema è stato di recente preso in considerazione anche in queste sedi ed è presumibile che prescrizioni in tal senso vengano fissate in tempi brevi.

BIBLIOGRAFIA

1. WELLS, A. F. 1962. *Structural Inorganic Chemistry 3rd Ed.* Oxford University Press, London.
2. DEER, W. A., HOVIE, R. A. & ZUSSMAN, J. 1962. Sheet silicates. In: *Rock-forming minerals, vol. 3.* Longmans, London, pp. 203-374.
3. HAMMER, D. H., ROLLE, F. R. & SCHELZ, J. P. 1976. Characterization of talc and associated minerals. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **37**: 296-304.
4. ZUSSMAN, J. 1978. The mineralogy of asbestos. In: *Asbestos, properties, applications and hazards.* L. Michaels & S. S. Chissick (Eds.). Wiley, New York, pp. 45-65.
5. STEMPLE, I. S. & BRINDLEY, G. W. 1960. Structural study of talc and talc-tremolite relations. *J. Am. Ceramic Soc.* **43**: 34-42.
6. ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY, 1969. Vol. 19, J. Wiley & Sons, New York. **19**: 608-614.
7. RUBINO, G. F., MARAZZANA, P., PETTINATI, L. & SCANSETTI, G. 1963. Aspetti etiopatologici e clinici delle pneumopatie da talco. *Medicina del Lavoro.* **54**: 496-506.
8. DAYMON, H. 1946. Latent silicosis and tuberculosis. *Am. Rev. Tuberculosis.* **53**: 554-559.
9. McLAUGHLIN, A., ROGERS, E. & DUNHAM, K. C. 1949. Talc pneumoconiosis. *Br. J. Industr. Med.* **6**: 184-194.
10. HOBBS, A. A. 1950. A type of pneumoconiosis. *Am. J. Roentgenol. Radiol. Therap.* **58**: 488-497.
11. KLEINFELD, M., MESSITE, J. & LANGER, A. M. 1973. A study of workers exposed to asbestiform minerals in commercial talc manufacture. *Environ. Res.* **6**: 132-143.
12. CLEMMESSEN, J. & HJALGRIM-JENSEN, S. 1981. Cancer incidence among 5686 Asbestos-Cement Workers followed from 1943 through 1976. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **5**: 15-23.
13. KLEINFELD, M., MESSITE, J., KOOYMAN, O. & ZAKI, M. 1967. Mortality among talc miners and millers in New York State. *Arch. Environ. Health.* **14**: 663-667.
14. LONGO, D. L. & YOUNG, R. C. 1979. Cosmetic talc and ovarian cancer. *The Lancet.* **II**: 349-351.
15. GRAHAM, J. & GRAHAM, R. 1967. Ovarian cancer and asbestos. *Environ. Res.* **1**: 115-128.
16. CRALLEY, L., KEY, M. M., GROTH, D. M., LAINHAST, W. S. & LIGO, R. M. 1968. Fibrous and mineral content of cosmetic talcum products. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **29**: 350-354.
17. STAFF, N. B. S. 1977. A report on the fiber content of eighty industrial talc samples obtained from, and using the procedures of, the O.S.H.A.
18. POOLEY, F. D. 1975. Examination of British Talc Powders. Department of Mineral Exploitation, University of Wales.
19. ROHL, A. N., LANGER, A. M., SELIKOFF, I. J., TORDINI, A., KLIMENTIDIS, R., BOWES, D. R. & SKINNER, D. L. 1976. Consumer talcums and powders: mineral and chemical characterization. *J. Tox. Environ. Health.* **2**: 255-284.
20. LINDGREN, B. W. & McELRATH, G. W. 1969. *Introduction to probability and statistics.* The McMillan Company, London.
21. HERDAN, G. 1960. *Small particles statistics.* Butterworths, London.
22. OWEN, D. B. 1962. *Handbook of statistical tables.* Pergamon Press, London.
23. CHAMPNESS, P. E., CLIFF, G. & LORIMER, G. W. 1976. The identification of asbestos. *J. Microsc.* **108**: 231-249.
24. PARMENTIER, C. J. & GILL, G. J. 1978. Practical aspects of talc and asbestos. *N.B.S. Special Publication 506*: 403-411.
25. STANLEY, H. D. 1978. The detection and identification of asbestos and asbestiform minerals in talc. *N.B.S. Special Publication 506*: 325-338.
26. STEWART, I. M. 1978. Transmission electron microscopical methods for the determination of asbestos. *N.B.S. Special Publication. 506*: 271-280.
27. SKIKNE, M. I., TALBOT, J. M. & RENDAL, R. E. G. 1971. Electron diffraction patterns of U.I.C.C. asbestos samples. *Environ. Res.* **4**: 141-145.
28. RUND, C. O., BARRETT, C. S., RUSSEL, P. A. & CLARK, R. L. 1976. Selected area electron diffraction and energy dispersive X-ray analysis for the identification of asbestos fibres, a comparison. *Micron.* **7**: 115-132.
29. MUELLER, P. K. & ALCOCER, A. E. 1975. *Asbestos fiber atlas.* Technical Report Data E.P.A. 650/2-75-036. State of California Department of Health.
30. HALL, T. A. 1971. The microprobe assay of chemical elements. In: *Physical techniques in biological research.* G. Oster (Ed.). Academic Press, New York, pp. 158-266.
31. CHANDLER, J. A. 1977. *X-ray microanalysis in the electron microscope.* North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
32. COMMISSIONE DELLE COMUNITA EUROPEE. 1980. Proposta per una direttiva del Consiglio delle Comunità Europee in merito alla protezione dei lavoratori nei confronti dei pericoli derivanti dall'esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici nei luoghi di lavoro: amianto.
33. C.T.F.A. SPECIFICATION. 1976. Cosmetic talc. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Washington.

Isolamenti di *Yersinia enterocolitica* in neonati prematuri

M. FANTASIA MAZZOTTI, V. GIRALDI, E. FILETICI e F. MONDELLO

Riassunto. - Dal novembre 1980 al giugno 1981 sono stati esaminati 480 campioni di feci di neonati sottopeso ricoverati in un ospedale romano. Oltre ai comuni patogeni enterici si è eseguita la ricerca di *Yersinia enterocolitica*. Stipiti appartenenti al biotipo 1, sierogruppo 0:6 fagotipo X₂ sono stati isolati dalle feci di 8 neonati di cui uno con grave gastroenterite, poi deceduto. Uno stipite con caratteristiche diverse è stato isolato da un neonato anch'esso asintomatico.

Summary (*Yersinia enterocolitica* isolates in Low-Birth-Weight Infants). - Nine strains of *Yersinia enterocolitica* were isolated from 480 fecal specimens of premature newborn infants in Rome through the period november 1980-june 1981. Eight of these strains were assigned the biotype 1, serotype 6, phagetype X₂. All the newborn infants were asymptomatic except one who died after severe gastroenteritis.

INTRODUZIONE.

Yersinia enterocolitica, germe ubiquitario descritto per la prima volta con nome diverso da Gilbert nel 1933 [1] e riconosciuto come specie distinta nel 1964 [2], viene isolato con sempre maggiore frequenza negli ultimi anni da animali e da uomini, sia sani sia malati, da alimenti e da acque. Si tratta di un batterio Gram negativo, mobile a temperature inferiori a 30 °C, immobile a 37 °C, non fermentante il lattosio, che cresce lentamente su agar peptone, agar sangue e sui terreni comunemente usati per coltivare *Salmonella* e *Shigella* come SS agar, agar desossicolato e agar McConkey; ne sono stati finora descritti 34 sierotipi e almeno 5 biotipi [3, 4]. È attualmente incluso nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, tribù IV [5].

Le principali sindromi descritte in letteratura legate direttamente o indirettamente a *Y. enterocolitica* sono riportate in Tab. 1 [6-17].

Oltre che da malati con sintomatologia enterica o con manifestazioni extraintestinali, esistono anche segnalazioni di isolamenti di *Y. enterocolitica* da persone sane [18, 19], pur essendo molto controverso il valore da attribuire a tali reperti.

Numerosissime sono inoltre le segnalazioni di isolamenti di *Y. enterocolitica* da animali malati, quali scimmie, maiali, ratti, cincillà (a carico di questi ultimi è riportata una epidemia con elevatissima mortalità) e inoltre cani, mucche e anche pulci (non si sa bene se

sane o malate) e da animali sani quali cani, gatti, rospi e lucertole; per questi ultimi si è formulata l'ipotesi che possano avere funzioni di serbatoio [20].

Y. enterocolitica è stata isolata anche da alimenti quali latte, cioccolato e carne [21], nonché da acque potabili, di fiume e di lago [18].

In Italia l'incidenza di *Y. enterocolitica* è ancora poco conosciuta. Si hanno notizie di isolamenti di mitili a Messina [22], da scarichi di allevamenti bovini a Ferrara [23], da un malato in ambiente ospedaliero ad Alessandria [24], da acque di fiume e da feci umane a Ferrara [18], da un caso di gastroenterite con leucopenia a Chieti [8], da feci di bambini in asilo nido a Roma [25] e da appendiciti asportate chirurgicamente a Bari [15] (Tab. 2).

Oltre a questi dati pubblicati vi sono numerosi dati relativi ad isolamenti di *Y. enterocolitica* che non vengono pubblicati. Di molti abbiamo notizia perché vengono inviati all'Istituto Superiore di Sanità per conferma. Essi sono stati isolati in diverse città d'Italia: Mantova, Napoli, Palermo e Siena. Ma se da molte altre parti mancano informazioni questo è dovuto sia alle diffi-

Tabella 1. - Principali sindromi morbose descritte nell'uomo e attribuite a *Y. enterocolitica*.

SINDROME DESCRITTA	Autore	Anno
Ilette terminale	Kato Y. et al.	1977
Congiuntivite granulomatosa..	Chin. G.N. et al.	1977
Gastroenterite con leucopenia	Giraldi V. et al.	1979
Diarrhea febbrile con eritema nodoso	Legoux J.R. et al.	1980
Malattia reumatica	Larsen J.H.	1980
	Leino R. et al.	1980
Linfadenite cervicale	Jaffe K.M. et al.	1980
Setticemia	Jmhoff. B. et al.	1980
Meningite	Challa V.R. et al.	1980
Pseudo appendicite acuta	Monno R. et al.	1981
Glomerulonefrite	Denneberg T. et al.	1981
	Friedberg M. et al.	1981

Tabella 2. - *Isolamenti di Yersinia enterocolitica in Italia.*

Y. enterocolitica tipo	Anno	Materiali di isolamento	Città	Autore e Rivista
—	1968	Mitili	Messina	Spadaro M., Infortuna M. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 44 (II): 1896-7
—	1977	Scarichi di allevamenti bovini	Ferrara	Cenci P. et al. - Boll. Ist. Sieroter. Milan. 56 (4)
—	1977	Feci umane	Alessandria	Fiori G.P., Marchesi E. - G. Mal. Infett. e Parassit., 29 (1): 11-13
—	1979	Acque di fiume e feci umane	Ferrara	Luppi A., Gaiani R. - Boll. Ist. Sieroter. Milan., 58 (5): 391-394.
1; 0:6,31; X ₂	1979	Feci umane	Chieti	Giraldi V. et al. - Ann. Sclavo, 21 (4): 468-474
4; 0:3; VIII	1979	Liquido peritonitico	Roma	Levi Della Vida M.V. et al. (non pubblicato)
1; 0:7,8; X ₀	1981	Feci umane	Roma	Giraldi V. et al. - Ann. Ist. Super. Sanità 17 (2): 163-170
1; 0:10; X ₀				
1; 0:8; X ₂	1981	Appendici asportate chirurgicamente	Bari	Monno R. et al. - Ann. Sclavo, 23 (1): 87-91
2; 0:9; X ₂				

coltà sopra accennate sia e soprattutto al fatto che è mancato fino ad oggi un centro in grado di raccogliere tutti gli stipiti isolati e di mantenerli in collezione, determinarne il biotipo, e il sierotipo. L'Istituto Superiore di Sanità è ora in grado di espletare tale funzione. Si potrà così arrivare a conoscere la reale distribuzione di tale germe in Italia e a disegnare una mappa sulla base degli isolamenti.

MATERIALI E METODI.

Nell'ambito dell'indagine iniziata nel novembre 1980, della durata di un anno, volta a definire la « facies microbica » dell'ambiente intestinale di neonati sottopeso che presentano o non sintomatologia gastroenterica, sono stati esaminati 480 campioni di feci raccolti da 140 neonati prematuri ricoverati nel reparto specialistico dell'Ospedale « Bambino Gesù » di Roma, tra il novembre 1980 e il giugno 1981. I neonati entrano in reparto, di norma, nella prima giornata di vita e vi restano dalle due alle otto settimane. Campioni di feci sono stati prelevati al momento dell'ingresso in reparto e successivamente una volta a settimana per tutta la durata della degenza. Qui riferiamo solo le metodiche e i dati concernenti la ricerca di *Y. enterocolitica*.

Ciascun campione di feci, raccolto con una spatola, nella quantità di 2 g circa, viene immediatamente immerso in containers a chiusura ermetica contenente *Cary e Blair transport medium* [26] e inviato in laboratorio; qui giunte le feci vengono trasferite in provetta, contenente *fluid Yersinia broth* [27] che viene posta a + 4° C per 2 settimane (arricchimento a freddo). Contemporaneamente si esegue una semina isolante su piastre di SS agar e di McConkey agar con aggiunta di Tween 80 allo 0,3 % che vengono incubate a 27°-28° C e osservate quotidianamente. Dopo 14 giorni dal terreno di arricchimento si esegue una

semina isolante su McConkey agar con Tween 80 allo 0,3%. Le colonie sospette, piccole, piatte, lisce, non fermentanti il lattosio con o senza alone di idrolisi vengono identificate mediante Api system 20 e test di mobilità a 24° C e a 37° C.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

I primi campioni risultati positivi per *Y. enterocolitica* sono quelli raccolti il 20 gennaio 1981 da due neonati ricoverati nel reparto rispettivamente da 9 e da 8 giorni. Successivamente sono risultati positivi i campioni di feci di 6 neonati raccolti il 10 febbraio 1981 a distanza variabile da 10 a 45 giorni dal ricovero in reparto. Questi 6 stipiti e i 2 precedentemente isolati appartengono al chemiotipo 1, sierogruppo 0:6, lisotipo X₂. L'ultimo isolamento riguarda uno stipite di *Y. enterocolitica* chemiotipo 1, sierogruppo 0:7,8, lisotipo X₀ proveniente da un campione di feci raccolto il 24 marzo 1981 (Tab. 3). Tutti gli stipiti producono indolo e sono lipasi positivi. Su richiesta è stato possibile esaminare solo i campioni di feci di 6 assistenti sanitarie su un totale di 20 addette al reparto, con risultato negativo. La prima ipotesi fu che il bambino M. A. nato a Campobasso, ricoverato prima all'ospedale Cardarelli di quella città e poi trasferito al reparto immaturi dell'ospedale romano avesse portato il germe che, sfuggito ad un esame dei primi campioni di feci si fosse poi diffuso nel reparto e avesse portato a morte il suddetto bambino già in condizioni precarie.

Appare però più probabile che questo piccolo sia venuto a morte per altre cause, dato anche il rilievo autoptico di atrofia della mucosa intestinale che appare poco probabile attribuire a *Y. enterocolitica*, e non essendo riportata in letteratura alcuna notizia relativa a rilievi autoptici in casi mortali attribuiti a *Y. enterocolitica*. Date invece le caratteristiche del ceppo isolato anche

Tabella 3. — *Isolamenti di Yersinia enterocolitica* (Roma, gennaio-marzo 1981).

CASO	Chemiotipo sierogruppo lisotico	Data prelievo campione positivo	Data ricovero
P.	1; 0; 6; X ₂	20-1-1981	11-1-1981
T.	1; 0; 6; X ₂	20-1-1981	12-1-1981
M.A.	1; 0; 6; X ₂	10-2-1981	13-1-1981
L.L.	1; 0; 6; X ₂	10-2-1981 23-2-1981	10-1-1981
L.A.	1; 0; 6; X ₂	10-2-1981	10-1-1981
V.R.F.	1; 0; 6; X ₂	10-2-1981	25-12-1981
M.S.	1; 0; 6; X ₂	10-2-1981 23-2-1981	27-1-1981
C.D.	1; 0; 6; X ₂	10-2-1982	31-1-1981
B.E.	1; 0; 6,8; X ₂	24-3-1981	2-2-19.1

da altri neonati in buone condizioni di salute, che non sembra essere tra quelli descritti come patogeni per l'uomo, si può avanzare l'ipotesi che la *Y. enterocolitica* albergasse nell'acqua distillata (non sterile) che, acquistata in grandi contenitori, viene usata per umidificare le culle termostate dove sono accolti i piccoli neonati. Purtroppo non è stato possibile esaminare campioni di questa acqua. La capacità di *Y. enterocolitica* di crescere in acqua distillata è del resto già stata dimostrata [28].

Ricevuto il 2 ottobre 1981.

Accettato il 16 febbraio 1982.

Resta il fatto che, se si può ipotizzare una fonte unica per i primi 8 casi, l'ultimo è invece nettamente distinto sia per le caratteristiche biosierofagiche sia per la data dell'isolamento, pur essendo anch'esso isolato da un neonato asintomatico. Si può aggiungere che il reperto di *Y. enterocolitica* era associato in 4 di questi neonati a *Aeromonas hydrophila* oltre ai comuni enterobatteri.

Pur non avendo potuto condurre una indagine epidemiologica che potesse permettere di accertare la fonte da cui *Y. enterocolitica* si è diffusa, ci è sembrato utile, date le scarse notizie che riguardano la circolazione di questo germe in Italia, rendere noti i risultati da noi ottenuti che rivelano, se ancora ce ne fosse bisogno, quanto questo germe sia diffuso in ogni tipo di ambiente.

Si può concludere pertanto che, benché l'incidenza di *Y. enterocolitica* in Italia sia poco conosciuta, i dati riferiti testimoniano una circolazione non certo irrilevante nel nostro paese. È necessario che ricercatori e medici intensifichino i loro sforzi per chiarire gli aspetti clinici ed i meccanismi patogenetici e per stabilire le vie di trasmissione e l'ecologia di questo germe, che sta diventando sempre più importante nella patologia, sia umana sia animale.

La sollecita segnalazione di casi di yersiniosi e l'invio di stipti al Centro per gli enterobatteri patogeni dell'Istituto Superiore di Sanità, che ne eseguirà il controllo, provvederà a mantenerli in collezione e ne determinerà il biotipo e il sierotipo, permetterà di stabilire la reale incidenza del germe in Italia.

Si ringrazia il Prof. H. H. Mollaret per la tipizzazione degli stipti.

BIBLIOGRAFIA

- GILBERT, R. 1933. Interesting cases and unusual specimens. Annual Report of Division of Laboratory and Research (Albany) p. 57.
- FREDERIKSEN, W. 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria. In: *Proc. 14th Scand. Congress Pathol. Microbiol.*, Oslo, pp. 103-104.
- NILEHN, B. 1969. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 206, Suppl. 1.
- WAUTER, G. & VANDEPITTE, J. 1978. De *Yersinia enterocolitica* en pathologie humaine. *Microbia*. Suppl. 4, no. 2: 75-80.
- Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 1974. Eighth Edition.
- KATO YAND HATTOI, T. 1977. Acute terminal ileitis. *Gastroenterol. Japoni.* 12 (1): 36-43.
- CHIN, G. N. & NOBLE, R. C. 1977. Ocular involvement in *Yersinia enterocolitica* infection. *Am. J. Ophthalmol.* (US), 83 (1): 19-23.
- GIRALDI, V., CHIESA, C., ROMAGNOLI, E. & MIDULLA, M. 1979. *Yersinia enterocolitica* associated with gastroenteritis and leucopenia. *Ann. Sclavo.* 21 (4): 468-474.
- LEGOUX, J. L. et al. 1980. *Yersinia enterocolitica* a germ to search for in any febrile diarrhea with eritema nodosum. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 4 (10): 730-1.
- LARSEN, J. H. 1980. *Yersinia enterocolitica* infections and Rheumatic Diseases. *Scand. J. Rheumatol.* 9 (3): 129-137.
- LEINO, R. et al. 1980. *Yersinia* arthritis in children. *Scand. J. Rheumatol.* 9 (4): 245-9.
- JAFFE, K. M. & SMITH, A. L. 1980. *Yersinia enterocolitica* cervical lymphadenitis. *J. Pediatr.* 97 (6): 937-9.
- IMHOOF, B. & AUCKENTHALER, R. 1980. *Yersinia enterocolitica* septicemia. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 110 (29): 1115-17.
- CHALLA, V. R. & MARX, R. S. 1980. Pathology of *Yersinia enterocolitica* meningitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 43 (5): 455-7.
- MONNO, R. et al. 1981. Prima segnalazione in Puglia di isolamento di *Yersinia enterocolitica* in campo pediatrico. *Ann. Sclavo* 23 (1): 87-91.
- DENNEBERG, T. et al. 1981. Glomerulonephritis in infections with *Yersinia enterocolitica* O-serotype 3. I. *Acta Med. Scand.* 209 (1-2): 97-101.
- FRIEDBELG, M. et al. 1981. Glomerulonephritis in infections with *Yersinia enterocolitica* O-serotype 3. II. Ibidem: 103-10.
- LUPPI A. & GAJANI, R. 1979. Primi isolamenti di *Yersinia enterocolitica* da acque superficiali e da feci umane. *Boll. Ist. Sieroter. Milanese.* 58 (5): 391-4.

19. ZAREMBA, M. *et al.* 1980. Analysis of feces of healthy persons for *Yersinia enterocolitica* carrier state. *Przegl. Epidemiol.* **34** (2): 179-86.
20. KUMAR, A. & SHARMA, V. K. 1978. Enterobacteria of emerging pathogenic significance from clinical cases in men and animals. *J. Microbiol. Serol.* **44** (2): 219-228.
21. ASAKAWA, Y. *et al.* 1979. Investigation of source and route of *Yersinia enterocolitica* infection. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **5**: 115-21.
22. SPADARO, M. & INFORTUNA, M. 1968. Isolamento di *Yersinia enterocolitica* in *mitilus galloprovincialis* Lamk. *Boll. Soc. It. Biol. Sperim.* **44** (11): 1896-7.
23. CENCI, P. *et al.* 1977. Sull'inquinamento microbiologico dell'ambiente da parte degli allevamenti. *Boll. Ist. Sieroter. Milanese.* **56** (4).
24. FIORE, G. P. & MARCHESI, E. 1977. Su di un caso di infezione da *Yersinia enterocolitica* in ambiente ospedaliero. *G. Mal. Infett. Parassit.* **29** (1): 11-13.
25. GIRALDI, V. *et al.* 1981. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from children during an outbreak of enteritis. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **17** (2): 163-170.
26. CARY, S. G. & BLAIR, E. B. 1964. New transport medium for shipment of clinical specimens. I, fecal specimens. *J. Bacteriol.* **88**: 96-99.
27. WHO 1977. Guidelines for health related monitoring of coastal water quality. Annex III: 134.
28. HIGHSMITH, A. K. *et al.* 1976. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from Well Water and Growth in Distilled Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **34** (6): 745-750.

Bibliografia e documentazione

A cura di:

V. ALBERANI e G. PETRELLI

con la collaborazione di:

F. PORTOGHESI, G. SIEPI e D. TURCHI

Tutela igienico-sanitaria delle acque: Normativa nazionale e regionale

INTRODUZIONE.

Molti corsi d'acqua hanno visto diminuire il loro potere di autodepurazione a seguito della massiccia contaminazione proveniente da insediamenti industriali e civili. L'immissione di sostanze tossiche in acque utilizzate per usi domestici, agricoli, sportivi e commerciali provoca un danno alla salute pubblica oltre che al patrimonio ittico, ecologico ecc. Il più delle volte, inoltre, le sostanze immesse nell'ambiente non sono biodegradabili e quindi si accumulano nelle catene alimentari.

Questo aspetto che investe direttamente la salute dell'uomo è stato affrontato dalla legge n. 833 del 23 dicembre 1978, istitutiva del Servizio Sanitario Nazionale, che ha formalizzato anche il rapporto tra diritto alla salute ed ambiente ed ha direttamente affrontato la tematica della degradazione ambientale annunciando una precisa regolamentazione degli inquinanti di natura chimica, fisica e biologica.

Il problema dell'inquinamento idrico sull'intero territorio nazionale è stato affrontato, per la prima volta in maniera organica, dalla legge n. 319 del 10 maggio 1976 che ha disciplinato « gli scarichi di qualsiasi tipo, pubblici e privati, diretti ed indiretti, in tutte le acque superficiali e sotterranee interne e marine, sia pubbliche che private nonché in fognature sul suolo e sottosuolo ». L'art. 26 della stessa legge ha, inoltre, abrogato tutte le norme che direttamente o indirettamente disciplinavano gli scarichi nel suolo e sottosuolo.

Tra gli obiettivi individuati dalla legge n. 319 un particolare rilievo va dato al piano di risanamento idrico, strumento essenziale nella pianificazione territoriale. Il piano di risanamento, oltre ad individuare il fabbisogno di opere fognarie e di depurazione, tiene conto anche delle opere tecnico-normative, amministrative e finanziarie rivolte alla tutela e all'uso razionale dei corpi idrici presenti nelle regioni.

Il tempo sufficientemente lungo intercorso tra la pubblicazione della legge n. 319, le successive modifiche ed i rinvii ha fatto sì che numerose regioni, malgrado i gravi disagi, siano riuscite ad approntare strumenti amministrativi, ad addestrare il personale, ad avviare iniziative atte a ridurre l'inquinamento, a depurare scarichi entro i limiti previsti dalla legge n. 319, a promuovere piani di risanamento delle acque ed a programmare interventi ad hoc. Tuttavia ciò non è avvenuto in maniera uniforme e ad oggi la salvaguardia dell'ambiente presenta ancora gravi lacune.

La presente nota, basandosi sul modello delle precedenti pubblicate in questa rubrica, ha focalizzato l'attenzione sul problema della tutela delle acque e riporta una rassegna aggiornata al 31 marzo 1982 della normativa nazionale (Tab. 1) e regionale relativa al problema in studio. Sono state considerate esclusivamente le leggi pubblicate nella *Gazzetta Ufficiale* ritenute, dagli Autori, più significative. Le leggi regionali sono state analizzate ed interpretate alla luce dei compiti attribuiti alle regioni dalla legge n. 319 e i contenuti della normativa regionale sono sintetizzati nella Tab. 2. È da notare che, pur avendo 9 regioni una normativa concernente il censimento dei corpi idrici e piano di risanamento delle acque, solo la Liguria, la Lombardia e il Piemonte hanno, alla data del 31 marzo 1982, emanato un piano che pienamente ha recepito le finalità indicate nella legge 319. Per quanto riguarda la normativa in questione della regione da ultima citata, questa non compare nella presente rassegna, in quanto anteriore alla legge 319.

Nonostante l'impegno a trattare esaurientemente gli argomenti affrontati, gli Autori si scusano per eventuali omissioni ed errori.

PIEMONTE

CENSIMENTO DEI CORPI IDRICI E PIANO DI RISANAMENTO DELLE ACQUE.

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

- 1) Legge Regionale 6 novembre 1978, n. 68: *Norme per la conservazione del patrimonio naturale e dell'assetto ambientale* (Boll. Uff. della Regione n. 47 del 14 novembre 1978; G.U. n. 36 del 6 febbraio 1979).

È vietato immettere idrocarburi, anche se parzialmente combustibili nelle acque dei fiumi e dei laghi o nella fascia di 100 metri dal limite del demanio, in quanto superiore ai limiti di accettabilità definiti dalla legge 10 maggio 1976, n. 319 e dalla legge regionale 20 ottobre 1977, n. 49.

- 2) Legge Regionale 22 giugno 1979, n. 31: *Norme integrative e di attuazione dei criteri e delle norme generali di cui al punto E), n. 2, 3 dell'art. 2 della legge n. 319/1976, in materia di liquami e fanghi* (Boll. Uff. della Regione n. 27 del 3 luglio 1979; G.U. n. 307 del 10 novembre 1979).

Tabella 1. - *Provvedimenti nazionali in vigore dal 10 maggio 1976.*

PROVVEDIMENTO	Data	N.	Data pubblicazione G.U.
Legge	10- 5-1976	319	N. 141 del 25- 5-1976
Decreto-legge	10- 8-1976	544	N. 211 dell'11- 8-1976
Legge	8-10-1976	690	N. 270 del 9-10-1976
Deliberazione Comitato Ministri	4- 2-1977	—	N. 48 del 21- 2-1977
Comunicato Min. Lavori Pubblici	13- 5-1977	—	N. 160 del 14- 6-1977
D.P.R.	24- 5-1977	—	N. 232 del 26- 8-1977
D.P.R.	24- 7-1977	616	Suppl. ord. N. 234 del 26-8-1977
Comunicato Min. Lavori Pubblici	26- 7-1978	—	N. 219 del 7- 8-1978
Comunicato Min. Lavori Pubblici	26- 7-1978	—	N. 221 del 9- 8-1978
Decreto-legge	23- 5-1979	148	N. 141 del 24- 5-1979
Decreto-legge	24- 9-1979	467	N. 263 del 25- 9-1979
Legge	24-12-1979	650	N. 352 del 29-12-1979
Decreto-legge	28- 2-1981	38	N. 60 del 2- 3-1981
Legge	23- 4-1981	153	N. 114 del 27- 4-1981
Decreto-legge	4-11-1981	620	N. 303 del 4-11-1981
Decreto-legge	30-12-1981	801	N. 2 del 4- 1-1982
Legge	5- 3-1982	61	N. 63 del 5- 3-1982
Comunicato Min. Grazia e Giustizia	—	—	N. 74 del 17- 3-1982

È regolato dalla presente legge lo smaltimento finale o non finale, diretto o indiretto:

a) dei liquami provenienti da insediamenti produttivi sul suolo e negli strati superficiali del suolo o in ogni altro ricettore finale diverso dalle acque superficiali e dalle fognature;

b) dei fanghi residuati dai cicli di lavorazione e dai processi di depurazione o potabilizzazione;

c) dei fanghi o residui ad essi assimilabili a base non acquosa, salva l'applicabilità di disposizioni integrative da impartirsi per i singoli casi.

COMPITI DELEGATI ALLE PROVINCE E COMUNI.

3) Legge Regionale 20 ottobre 1977, n. 49: *Modificazioni ed integrazioni alle leggi regionali 8 novembre 1974 n. 32 e 29 aprile 1975 n. 23 (Boll. Uff. della Regione n. 44 del 2 novembre 1977; G.U. n. 61 del 2 marzo 1978).*

Il presidente della giunta provinciale è competente a rilasciare l'autorizzazione per gli scarichi di cui al punto b) dell'art. 5 della legge n. 319/1976. Il sindaco o il presidente del consorzio intercomunale è competente a rilasciare l'autorizzazione per gli scarichi di cui all'ultimo comma dell'art. 6 della citata legge n. 319.

NORME FINANZIARIE.

4) Legge Regionale 25 gennaio 1977, n. 11: *Integrazione straordinaria per il piano regionale di risanamento delle acque approvato dalla legge regionale 29 aprile 1975, n. 23 (Boll. Uff. della Regione n. 6 dell'8 febbraio 1977; G.U. n. 53 del 25 febbraio 1977).*

L'ammontare di 4.269 milioni attribuito alla regione Piemonte, nel quadro dei programmi regionali di sviluppo di cui all'art. 9 della legge 16 maggio 1970, n. 281, ai sensi dell'art. 16 della legge 16 ottobre 1975, n. 492, per le spese destinate al finanziamento di lavori di completamento di opere di competenza regionale, è destinato agli interventi di cui alla legge regionale 29 aprile 1975, n. 23, secondo le modalità della legge medesima.

5) Legge Regionale 10 maggio 1979, n. 22: *Piano regionale di risanamento delle acque. Integrazioni e modificazioni alla legge regionale 29 aprile 1975, n. 23 (Boll. Uff. della Regione n. 20 del 15 maggio 1979; G.U. n. 306 del 9 novembre 1979).*

Per la realizzazione di collettori e di impianti di depurazione degli scarichi di acque reflue, la regione Piemonte può sostituire alla concessione del contributo in conto capitale quella del contributo in annualità, comprensivo delle quote interessi e delle quote per la restituzione del capitale.

6) Legge Regionale 19 gennaio 1981, n. 4: *Provvedimenti per la realizzazione di impianti di depurazione degli scarichi degli insediamenti produttivi in attuazione dell'art. 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319 e dell'art. 5 della legge 24 dicembre 1979, n. 650 (Boll. Uff. della Regione n. 4 del 28 gennaio 1981; G.U. n. 96 del 7 aprile 1981).*

La Regione, in attuazione dell'art. 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319, integrata e modificata dalla legge 24 dicembre 1979, n. 650, concede alle imprese industriali, alle imprese artigianali, alle imprese agricole

Tabella 2. - *Legislazione regionale aggiornata al 1° marzo 1982 relativa ai compiti attribuiti alle regioni della legge n. 319 del 10 maggio 1976.*

REGIONI	LEGGI 319 10/5/1976	Piano risanamento acque	Censimento e catasto dei corpi idrici	Acqua scopo irriguo	Falde acquifere	INSEDIAMENTI PRODUTTIVI					INSEDIAMENTI CIVILI					Compiti delegati ad enti territoriali	N. leggi	
						Scarico mare	Scarico acque sup.	Scarico fognie	Scarico suolo	Scarico sottosuolo	Norme finanziarie	Scarico mare	Scarico acque sup.	Scarico fognie	Scarico suolo			Scarico sottosuolo
PIEMONTE		■							■	■	■					■	■	6
VALLE D'AOSTA											■					■		1
LOMBARDIA		■	■								■					■		8
TRENTINO A. ADIGE	Tn						■	■	■	■		■	■	■	■			4
	Bz										■					■		2
VENETO		■	■			■		■		■	■				■			9
FRIULI VENEZIA GIULIA		■	■							■					■			7
LIGURIA		■				■				■					■			5
EMILIA ROMAGNA						■	■	■			■	■			■	■		8
TOSCANA		■				■	■	■	■	■					■	■		6
UMBRIA				■	■			■	■	■			■	■	■			4
MARCHE																		-
LAZIO										■					■			3
ABRUZZO		■						■		■			■		■			2
MOLISE			■	■				■	■	■					■			4
CAMPANIA						■					■							1
PUGLIA				■								■			■	■		2
BASILICATA		■								■					■			3
CALABRIA																		-
SICILIA		■				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			5
SARDEGNA										■					■			1

assimilate agli insediamenti produttivi, nonché ai soggetti indicati all'art. 5, secondo comma della legge 24 dicembre 1979, n. 650, contributi in conto capitale per interventi destinati esclusivamente o prevalentemente alla realizzazione, modifica e adeguamento di impianti di depurazione o di pretrattamento degli scarichi negli insediamenti produttivi.

VALLE D'AOSTA

NORME FINANZIARIE.

- 1) Legge Regionale 29 dicembre 1980, n. 71: *Interventi regionali in attuazione dell'art. 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319, concernente norme per la tutela delle acque dall'inquinamento, integrata e modificata dalla legge 24 dicembre 1979, n. 650 (Boll. Uff. della Regione n. 14 del 30 dicembre 1980; G.U. n. 87 del 28 marzo 1981).*

In attuazione dell'art. 20 della legge n. 319/1976, integrata e modificata dalla legge, n. 650/1979, la Regione concede contributi in conto capitale ad imprese singole

od associate, già in servizio alla data del 1° gennaio 1975, le quali realizzino o modifichino impianti di depurazione o di pretrattamento per le necessarie modificazioni degli scarichi in atto alla stessa data.

LOMBARDIA

CENSIMENTO DEI CORPI IDRICI E PIANO DI RISANAMENTO DELLE ACQUE.

- 1) Legge Regionale 20 marzo 1980, n. 32: *Censimento e catasto delle acque. Piani in materia di tutela delle acque dall'inquinamento (Boll. Uff. della Regione, 3° Suppl. Ord. al n. 12 del 21 marzo 1980; G.U. n. 196 del 18 luglio 1980).*

Al fine di ripristinare e garantire l'idoneità qualitativa e la disponibilità quantitativa delle risorse idriche per il loro uso plurimo, ed, in particolare, per l'attuazione della legge 10 maggio 1976, n. 319, e successive modificazioni e integrazioni, nel quadro delle finalità di recupero ambientale, la Regione opera il censimento dei corpi idrici, istituisce il catasto regionale delle

acque, approva il piano regionale di risanamento delle acque, nonché il successivo piano regionale generale delle acque.

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

2) Legge Regionale 7 giugno 1980, n. 94: *Norme per interventi per lo smaltimento dei rifiuti* (Boll. Uff. della Regione, 5° Suppl. Ord. al n. 24 del 12 giugno 1980; G.U. n. 297 del 29 ottobre 1980).

La presente legge disciplina lo smaltimento dei rifiuti solidi urbani e dei rifiuti speciali al fine di adeguare tale attività alle esigenze della tutela dell'ambiente; promuove e definisce il sistema delle opere e dei servizi relativi, ai sensi dell'art. 4, primo comma lett. e) della legge regionale 15 aprile 1975, n. 51, quale contenuto del piano territoriale regionale.

NORME FINANZIARIE.

3) Legge Regionale 29 novembre 1979, n. 65: *Piano di interventi urgenti nel settore del disinquinamento* (Boll. Uff. della Regione, 1° Suppl. Ord. al n. 48 del 4 dicembre 1979; G.U. n. 83 del 25 marzo 1980).

La Regione, sulla base degli obiettivi fissati dal programma regionale di sviluppo ed in attuazione delle previsioni del bilancio pluriennale 1979-81, attua un piano di intervento finanziario a sostegno dell'azione degli enti locali e loro consorzi, rivolto al completamento ed alla realizzazione di opere di collettamento e di depurazione delle acque, nonché al completamento e alla costruzione di reti di fognatura.

4) Legge Regionale 30 aprile 1980, n. 47: *Interventi regionali in attuazione dell'art. 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319: «Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento», integrata e modificata dalla legge 24 dicembre 1979, n. 650* (Boll. Uff. della Regione, 2° Suppl. Ord. al n. 18 del 5 maggio 1980; G.U. n. 234 del 27 agosto 1980).

In attuazione dell'art. 20, legge n. 319/1976 integrata e modificata dalla legge n. 650/1979, la Regione concede contributi in conto capitale ad imprese singole o associate, già in attività alla data del 1° gennaio 1975, che realizzino o modifichino impianti di depurazione o di pretrattamento degli scarichi o dei fanghi di risulta dei processi depurativi, per il loro adeguamento alle prescrizioni della normativa nazionale e regionale, con particolare riferimento alle iniziative collegate ad impianti pubblici centralizzati di carattere consortile.

5) Legge Regionale 15 dicembre 1980, n. 101: *Modifiche alla legge regionale 29 novembre 1979, n. 65, recante disposizioni per interventi urgenti nel settore del disinquinamento* (Boll. Uff. della Regione n. 51, 1° Suppl. Ord. del 17 dicembre 1980; G.U. n. 86 del 27 marzo 1981).

Il secondo comma, lett. a), dell'art. 3 della legge regionale 29 novembre 1979, n. 65 è così modificato:

«a) l'intera spesa ammissibile per le opere di cui alla lett. b) del precedente art. 2, primo comma».

I termini previsti dall'art. 8, primo comma, della legge regionale 29 novembre 1979, n. 65 ai fini della decadenza dai benefici, sono prorogati al 31 marzo 1981.

Il termine di cui al primo comma dell'art. 11 della legge 29 novembre 1979, n. 65 è prorogato al 31 maggio 1981.

6) Legge Regionale 30 maggio 1981, n. 25: *Tariffe per i servizi di raccolta, allontanamento, depurazione e scarico delle acque di rifiuto* (Boll. Uff. della Regione, 2° Suppl. Ord. al n. 21 del 30 maggio 1981; G.U. n. 232 del 25 agosto 1981).

Il termine per la presentazione della denuncia prevista dall'art. 10 della legge regionale 30 maggio 1981, n. 25 è prorogato al 30 settembre 1981.

7) Legge Regionale 5 settembre 1981, n. 54: *Integrazione finanziaria per interventi nel settore del disinquinamento delle acque* (Boll. Uff. della Regione, 2° Suppl. Ord. al n. 35 del 5 settembre 1981; G.U. n. 343 del 15 dicembre 1981).

La Regione concede alle comunità montane, ai comuni e ai loro consorzi, i contributi in conto capitale specificati nel 1° programma per il risanamento delle acque, approvato con deliberazione del consiglio regionale n. II/1404 in data 27 marzo 1980.

8) Legge Regionale 5 settembre 1981, n. 60: *Proroga del termine di cui all'art. 10, primo comma, della legge regionale 30 maggio 1981, n. 25: «Tariffe per i servizi di raccolta, allontanamento, depurazione e scarico delle acque di rifiuto»* (Boll. Uff. della Regione, 2° Suppl. Ord. al n. 35 del 5 settembre 1981; G.U. n. 343 del 15 dicembre 1981).

Nella formazione delle tariffe si osservano modalità e tempi disposti dagli articoli 16 e 17 della legge 10 maggio 1976, n. 319 come sostituiti dall'art. 3 del decreto-legge 28 febbraio 1981, n. 38, convertito in legge 23 aprile 1981, n. 153. Il canone determinato in base alle tariffe è dovuto esclusivamente agli utenti della pubblica fognatura.

TRENTINO-ALTO ADIGE

Prov. TRENTO

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

1) Legge Provinciale 18 novembre 1978, n. 47: *Norme per la tutela dell'aria e delle acque dall'inquinamento* (Boll. Uff. della Regione, Suppl. Ord. n. 1 al n. 60 del 28 novembre 1978; G.U. n. 88 del 29 marzo 1979).

La presente legge disciplina le modalità ed i limiti delle emissioni nell'atmosfera nonché gli scarichi nelle acque, al fine di tutelare dalle contaminazioni l'ambiente e le sue componenti naturali considerate come beni di interesse collettivo.

2) Legge Provinciale 23 aprile 1979, n. 2: *Modifiche alla legge provinciale 18 novembre 1978, n. 47* (Boll. Uff. della Regione n. 22 del 2 maggio 1979; G.U. n. 250 del 12 settembre 1979).

Alla legge provinciale 18 novembre 1978, n. 47, concernente « Norme per la tutela dell'aria e delle acque dall'inquinamento », sono apportate, con effetto dalla data di entrata in vigore della legge medesima, le modifiche di cui ai successivi commi.

3) Legge Provinciale 20 giugno 1980, n. 18: *Ulteriori modifiche ed integrazioni alla legge provinciale 18 novembre 1978, n. 47, concernente: « Norme per la tutela dell'aria e delle acque dall'inquinamento » e alla legge provinciale 29 novembre 1973, n. 59, concernente: « Costruzione del dipartimento ecologico provinciale e provvedimenti urgenti per la tutela dell'ambiente »* (Boll. Uff. della Regione n. 33 del 24 giugno 1980; G.U. n. 289 del 21 ottobre 1980).

La presente legge apporta ulteriori modifiche ed integrazioni alla legge provinciale 18 novembre 1978, n. 47 e alla legge provinciale 29 novembre 1973, n. 59; inoltre le Tabelle B, C, E, F e G collegate alla legge provinciale 18 novembre 1978 sono sostituite da quelle allegate alla presente legge.

4) Legge Provinciale 11 gennaio 1982, n. 1: *Ulteriori modifiche ed integrazioni alla legge provinciale 18 novembre 1978, n. 47, concernente: « Norme per la tutela dell'aria e delle acque dall'inquinamento »* (Boll. Uff. della Regione n. 4 del 19 gennaio 1982; G.U. n. 59 del 2 marzo 1982).

La giunta provinciale, su proposta del servizio protezione ambiente, sentiti i comuni territorialmente interessati, può autorizzare la continuazione dell'esercizio di impianti produttivi misti, già in funzione alla data del 12 dicembre 1978, che diano luogo ad emissioni non conformi ai limiti fissati della Tabella B.

PROV. BOLZANO

COMPITI DELEGATI AI COMUNI E CONSORZI.

1) Legge Provinciale 20 giugno 1980, n. 22: *Disciplina della gestione degli impianti di trattamento delle acque di rifiuto di comuni e loro consorzi* (Boll. Uff. della Regione n. 36 dell'8 luglio 1980; G.U. n. 307 dell'8 novembre 1980).

Al fine di assicurare il più adeguato funzionamento degli impianti depurativi e di trattamento delle acque di rifiuto dei comuni o loro consorzi, la cui realizzazione sia derivata dalle norme di legge in vigore, si applicano le disposizioni contenute nella presente legge.

Il raggiungimento delle finalità di cui al precedente articolo viene perseguito dai consorzi di comuni, costituiti ai sensi dell'art. 19 della legge provinciale 6 settembre 1973, n. 63, mediante i compiti ad essi affidati.

NORME FINANZIARIE.

2) Legge Provinciale 28 agosto 1976, n. 39: *Provvidenze per la realizzazione di impianti depurativi per il trattamento delle acque di rifiuto e dei relativi collettori principali* (Boll. Uff. della Regione n. 45 del 19 ottobre 1976; G.U. n. 28 del 31 gennaio 1977).

Per la progettazione e la realizzazione di impianti depurativi destinati al trattamento delle acque di rifiuto e dei collettori principali che allacciano i medesimi alle rispettive reti di fognatura è autorizzata per l'esercizio finanziario 1976 la spesa di lire 3.500 milioni.

VENETO

CENSIMENTO DEI CORPI IDRICI E PIANO DI RISANAMENTO DELLE ACQUE.

1) Legge Regionale 7 settembre 1979, n. 71: *Provvedimenti in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, in attuazione della legge 10 maggio 1976, n. 319, e successive modificazioni, e di gestione delle risorse idriche* (Boll. Uff. della Regione n. 45 del 10 settembre 1979; G.U. n. 303 del 7 novembre 1979).

Al fine di tutelare dalle contaminazioni l'ambiente e le sue componenti naturali, considerate come beni di interesse collettivo, nonché al fine di valorizzare e di impiegare in modo ottimale le risorse idriche disponibili, la regione Veneto interviene secondo le disposizioni di cui ai successivi articoli:

- art. 1) censimento dei corpi idrici;
- art. 2) istituzione del catasto regionale delle acque.

2) Legge Regionale 3 aprile 1980, n. 22: *Norme in materia di tutela delle acque dall'inquinamento e modifiche alla legge regionale 7 settembre 1979, n. 71, recante: « Provvedimenti in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, in attuazione della legge 10 maggio 1976, n. 319, e successive modificazioni, e di gestione delle risorse idriche »* (Boll. Uff. della Regione n. 21 dell'8 aprile 1980; G.U. n. 200 del 23 luglio 1980).

In attuazione dell'art. 1, secondo comma, della legge n. 650/1979, la giunta regionale entro il 31 marzo 1980, sentita la competente commissione consiliare ed i comuni interessati, predispose un primo programma di risanamento delle acque e lo invia al comitato interministeriale di cui all'art. 3 della legge n. 319/1976. Nel programma dovranno essere indicati gli obiettivi fondamentali e le priorità delle opere da realizzare, anche in conformità a quanto stabilito dall'art. 7 della legge regionale 7 settembre 1979, n. 71.

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

3) Legge Regionale 24 agosto 1979, n. 64: *Norme di attuazione dell'art. 6, ultimo comma, del decreto del Presidente della Repubblica 20 settembre 1973, n. 262. Tutela della città di Venezia e del suo territorio dall'inquinamento delle acque* (Boll. Uff. della Regione n. 42 ediz. straord. del 28 agosto 1979; G.U. n. 272 del 4 ottobre 1979).

Le norme di prescrizione delle metodiche di campionamento ed analitiche, ai fini del controllo della rispondenza degli affluenti ai valori limite, di cui alla tabella allegata al D.P.R. 20 settembre 1973, n. 262, e all'attribuzione delle relative competenze in materia di esecuzione dei controlli, sono definite dalla presente legge.

I controlli previsti nel precedente articolo riguardano le acque reflue degli impianti di depurazione, di cui al secondo comma dell'art. 9 della legge 16 aprile 1973, n. 171, il cui recapito avvenga direttamente in laguna o nei corsi d'acqua che comunque si immettano nella laguna.

NORME FINANZIARIE.

4) Legge Regionale 9 settembre 1977, n. 58: *Proroga della decorrenza delle spese pluriennali autorizzate con le leggi regionali 31 gennaio 1974, n. 15 e 19 aprile 1974, n. 26, recanti provvidenze rispettivamente per la realizzazione di impianti per lo smaltimento dei rifiuti solidi urbani e di impianti fognari e di depurazione a prevalente uso industriale* (Boll. Uff. della Regione n. 41 del 14 settembre 1977; G.U. n. 326 del 30 novembre 1977).

L'autorizzazione di spesa per l'esercizio è stabilita in L. 750.000.000 annue per anni 10 con inizio dall'esercizio 1977, in dipendenza della decorrenza della erogazione dei contributi fissata dall'art. 7 della stessa legge regionale.

5) Legge Regionale 3 agosto 1978, n. 39: *Interventi nel settore delle opere fognarie ed acquedottistiche* (Boll. Uff. della Regione n. 34 del 7 agosto 1978; G.U. n. 269 del 26 settembre 1978).

Al fine di conseguire un graduale risanamento dei corpi idrici ed un corretto utilizzo delle risorse idriche per il soddisfacimento dei fabbisogni idropotabili, la Regione concede contributi annui costanti nella misura del 5%, per un periodo di anni venti, ai comuni, consorzi di comuni e comunità montane, sull'ammontare della spesa riconosciuta ammissibile per l'esecuzione di opere fognarie ed acquedottistiche.

6) Legge Regionale 23 agosto 1979, n. 59: *Nuovi interventi nei settori delle opere fognarie ed acquedottistiche e rifinanziamento della legge regionale 3 agosto 1978, n. 39* (Boll. Uff. della Regione n. 41 ediz. straord. del 27 agosto 1979; G.U. n. 261 del 22 settembre 1979).

Per l'attuazione di un programma triennale di interventi nel settore delle opere fognarie ed acquedottistiche la Regione concede contributi annui costanti nella misura del 5%, per un periodo di venti anni, ai comuni, consorzi di comuni e comunità montane sull'ammontare della spesa riconosciuta ammissibile per l'esecuzione delle opere fognarie ed acquedottistiche.

7) Legge Regionale 11 aprile 1980, n. 26: *Norme per la determinazione delle tariffe relative al canone dovuto ai comuni o loro consorzi per i servizi di fognatura e di depurazione delle acque di rifiuto ai sensi degli art. 16 e 17 della legge 10 maggio 1976, n. 319 e del D.P.R. 24 maggio 1977* (Boll. Uff. della Regione ediz. straord. n. 23 del 16 aprile 1980; G.U. n. 236 del 28 agosto 1980).

Le tariffe relative al canone dovuto per i servizi di fognatura e di depurazione delle acque di rifiuto, previste dagli articoli 16 e 17 della legge n. 319/1976, sono stabilite, dai comuni o loro consorzi per le diverse categorie di utenti, entro 150 giorni dall'entrata in vigore della presente legge.

8) Legge Regionale 6 giugno 1980, n. 86: *Integrazione alla legge regionale 11 aprile 1980, n. 26, recante: « Norme per la determinazione delle tariffe relative al canone dovuto ai comuni o loro consorzi per i servizi di fognatura e di depurazione delle acque di rifiuto »* (Boll. Uff. della Regione ediz. straord. n. 38 dell'11 giugno 1980; G.U. n. 275 del 7 ottobre 1980).

Nella Tab. B allegata alla legge regionale 11 aprile 1980, n. 26, e relativa alla tariffa per usi industriali, alle note esplicative riguardanti il coefficiente K_2 è aggiunta la seguente dicitura: « Il coefficiente deve essere posto uguale a 0 per gli scarichi che, per loro natura o perché depurati in impianti precedenti l'impianto consortile comunale o intercomunale, rientrano nei riguardi del COD e dei materiali in sospensione nei limiti di accettabilità previsti per l'effluente del suddetto impianto consortile.

9) Legge Regionale 29 giugno 1981, n. 30: *Concessione di contributi ai comuni, alle comunità montane o a loro consorzi e alle provincie per la realizzazione degli interventi di competenza nel settore delle opere fognarie e acquedottistiche, ai sensi dell'art. 19 della legge 10 maggio 1976, n. 319 e dell'art. 4 della legge 24 dicembre 1979, n. 650* (Boll. Uff. della Regione ediz. straord. n. 29 del 3 luglio 1981; G.U. n. 219 dell'11 agosto 1981).

La Regione concede contributi in conto capitale ai comuni, alle comunità montane o a loro consorzi, per la costruzione e l'ammodernamento degli impianti necessari all'espletamento dei servizi pubblici di acquedotto, fognature, depurazione delle acque usate, smaltimento dei fanghi residuati da processi produttivi e impianti di trattamento di acque di scarico, ai sensi dell'art. 19 della legge n. 319/1976.

FRIULI-VENEZIA GIULIA

CENSIMENTO DEI CORPI IDRICI E PIANO DI RISANAMENTO DELLE ACQUE.

1) Legge Regionale 13 luglio 1981, n. 45: *Norme generali in materia di tutela delle acque dall'inquinamento* (Boll. Uff. della Regione n. 74 del 13 luglio 1981; G.U. n. 251 del 12 settembre 1981).

L'amministrazione regionale provvede al censimento dei corpi idrici superficiali e sotterranei del proprio territorio ed alla formazione del catasto regionale delle acque e degli scarichi.

L'amministrazione regionale, inoltre, si dota del piano generale per il risanamento delle acque.

NORME FINANZIARIE.

2) Legge Regionale 29 dicembre 1976, n. 68: *Interventi regionali nel settore delle opere igienico-sanitarie* (Boll. Uff. della Regione n. 115 del 29 dicembre 1976; G.U. n. 30 del 2 febbraio 1977).

Al fine di promuovere ed agevolare la realizzazione da parte degli Enti locali delle opere igienico-sanitarie che rientrano nelle loro attribuzioni funzionali, l'Am-

ministrazione regionale è autorizzata ad intervenire nelle forme previste dalla presente legge.

L'Amministrazione regionale è autorizzata a concedere ai Comuni, ai Consorzi di comuni ed alle Comunità montane contributi annui costanti, per un periodo non superiore ad anni 20, nella misura massima dell'8% della spesa ammissibile, per la costruzione, il potenziamento, l'ampliamento e la sistemazione di fognature e dei relativi impianti di idoneo trattamento dei liquami.

- 3) Legge Regionale 25 luglio 1977, n. 40: *Integrazione e rifinanziamenti dell'art. 4 della legge regionale 27 maggio 1970, n. 16, relativo a studi per la tutela del patrimonio idrico* (Boll. Uff. della Regione n. 74 del 29 luglio 1977; G.U. n. 252 del 15 settembre 1977).

Al primo comma dell'art. 4 della legge regionale 27 maggio 1970, n. 16, dopo le parole «liquami fognali» sono aggiunte le parole: «e le condizioni igieniche dei corpi idrici ricettori, nonché le caratteristiche degli scarichi inquinanti, effettuando tutte le necessarie analisi di laboratorio chimiche, fisiche e microbiologiche».

Per le finalità previste dall'art. 4 della legge regionale 27 maggio 1970, n. 16, come integrato dal precedente art. 1, è autorizzata per gli esercizi finanziari dal 1977 al 1980, la spesa complessiva di lire 550 milioni, di cui lire 100 milioni per l'esercizio finanziario 1977.

- 4) Legge Regionale 16 agosto 1979, n. 42: *Provvedimenti per il rilevamento delle risorse idriche regionali, per la prevenzione delle inondazioni e per il controllo delle condizioni igieniche dei corpi idrici e degli scarichi fognali, ai fini dell'individuazione dei più idonei trattamenti depurativi* (Boll. Uff. della Regione n. 84 del 18 agosto 1979; G. U. n. 281 del 15 settembre 1979).

Per la razionale utilizzazione delle acque ad uso civile, agricolo ed industriale, l'amministrazione regionale è autorizzata a curare, anche avvalendosi di enti, di organismi specializzati o di privati esperti, il rilevamento delle risorse idriche del territorio regionale; a promuovere a tale scopo studi, lavori di sondaggio, ivi compresa l'installazione di impianti fissi di rilevazione nonché la realizzazione di ogni altra utile opera relativa alle ricerche idrogeologiche e climatiche, assumendone le spese relative. L'amministrazione regionale è altresì autorizzata ad assumere le spese di funzionamento di dette opere ed impianti di rilevamento quali il pagamento dei fitti di indennità per asservimento, di compensi per la custodia e la lettura di strumenti, nonché ogni altra spesa connessa.

- 5) Legge Regionale 3 novembre 1979, n. 61: *Determinazione delle tariffe di cui agli articoli 16 e 17 della legge 10 maggio 1976, n. 319* (Boll. Uff. della Regione n. 119 del 3 novembre 1979; G.U. n. 337 del 12 dicembre 1979).

Ai sensi degli articoli 16 e 17 della legge 10 maggio 1976, n. 319, il pagamento del canone per i servizi relativi alla raccolta, allontanamento, depurazione e scarico delle acque di rifiuto decadenti dalle superfici e dai fabbricati privati e pubblici, inclusi gli stabilimenti e gli opifici industriali a qualunque uso adibiti, determinato in conformità alle formule tipo emanate con il D.P.R. 24 maggio 1977, è disciplinato dalle norme della presente legge regionale.

- 6) Legge Regionale 23 dicembre 1980, n. 76: *Integrazione della legge regionale 16 agosto 1979, n. 42, recante provvedimenti per il rilevamento delle risorse idriche regionali, per la prevenzione delle inondazioni e per il controllo delle condizioni igieniche dei corpi idrici e degli scarichi fognali, ai fini dell'individuazione dei più idonei trattamenti depurativi* (Boll. Uff. della Regione n. 130 del 23 dicembre 1980; G.U. n. 32 del 3 febbraio 1981).

Dopo la previsione di cui alla lett. b) dell'art. 3 della legge regionale 16 agosto 1979, n. 42, è aggiunta la seguente previsione: «c) lo stato di qualità dei corpi idrici ricettori, la definizione degli usi principali delle acque, nonché la valutazione della quantità massima di sostanze inquinanti che possono essere versate negli stessi corpi idrici in rapporto allo stato dell'inquinamento e agli usi che si vogliono tutelare al fine della redazione dei piani di risanamento, dei bacini idrografici regionali».

Per le finalità di cui all'art. 3 della suddetta legge regionale, come integrato con il precedente art. 1, è autorizzata la spesa di L. 700 milioni nell'esercizio 1980.

- 7) Legge Regionale 15 gennaio 1982, n. 4: *Contributi regionali per la costruzione e l'ammodernamento di impianti igienico-sanitari di cui alla legge 10 maggio 1976, n. 319* (Boll. Uff. della Regione n. 4 del 15 gennaio 1982; G.U. n. 50 del 20 febbraio 1982).

La Regione è autorizzata a concedere contributi in conto capitale a comuni e loro consorzi e comunità montane, fino all'80% del costo delle opere, per la costruzione ed ammodernamento di impianti di acquedotto, fognatura, depurazione, smaltimento e trattamento delle acque e smaltimento dei fanghi residuati da processi produttivi, di cui al secondo comma dell'art. 6 della legge 10 maggio 1976, n. 319, inserito con l'art. 9 della legge 24 dicembre 1979, n. 650.

LIGURIA

CENSIMENTO DEI CORPI IDRICI E PIANO DI RISANAMENTO DELLE ACQUE.

- 1) Legge Regionale 24 marzo 1980, n. 20: *Norme a tutela dell'ambiente dagli inquinamenti* (Boll. Uff. della Regione, Suppl. Ord. 2° al n. 14 del 2 aprile 1980; G.U. n. 161 del 13 giugno 1980).

Il consiglio regionale, su proposta della giunta, approva un programma regionale di salvaguardia e di recupero dell'integrità dell'ambiente, finalizzato alla prevenzione ed all'eliminazione degli inquinamenti di natura biologica, chimica e fisica di origine antropica ed al migliore utilizzo delle risorse ambientali. Il consiglio regionale, su proposta della giunta approva il piano regionale di risanamento delle acque previsto dall'art. 4, primo comma, lett. a), della legge 10 maggio 1976, n. 319.

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

- 2) Legge Regionale 23 aprile 1981, n. 14: *Designazione, dell'autorità competente al rilascio dell'autorizzazione*

agli scarichi diretti nelle acque del mare (Boll. Uff. della Regione n. 19 del 13 maggio 1981; G.U. n. 175 del 27 giugno 1981).

Ai sensi dell'art. 11, primo comma della legge 10 maggio 1976 n. 319, come sostituito dall'art. 14 della legge 24 dicembre 1979, n. 650, l'autorizzazione agli scarichi diretti nelle acque del mare provenienti da insediamenti produttivi è rilasciata dal comune competente per territorio.

NORME FINANZIARIE.

- 3) Legge Regionale 3 giugno 1981, n. 18: *Contributi alle imprese con impianti produttivi ai sensi dell'art. 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319 e successive modifiche ed integrazioni* (Boll. Uff. della Regione n. 25 del 24 giugno 1981; G.U. n. 243 del 4 settembre 1981).

La Regione in attuazione delle norme contenute nell'art. 20, della legge 10 maggio 1976, n. 319, e successive modifiche ed integrazioni, concede contributi in conto capitale alle imprese singole o associate, per la realizzazione o la modificazione di impianti necessari per adeguare gli scarichi dei loro insediamenti produttivi alle prescrizioni della legge medesima.

- 4) Legge Regionale 1° luglio 1981, n. 24: *Modificazioni alla legge regionale 24 gennaio 1978, n. 10, concernente: « Contributi per apparecchiature antinquinamento »* (Boll. Uff. della Regione n. 29 del 22 luglio 1981; G.U. n. 243 del 4 settembre 1981).

Il primo comma dell'art. 1 della legge regionale 24 gennaio 1978, n. 10, è sostituito dal seguente: « La giunta regionale è autorizzata a concedere alle amministrazioni provinciali liguri contributi per l'acquisto di apparecchiature destinate allo svolgimento dei compiti indicati dall'art. 104 del D.P.R. 24 luglio 1977, n. 616 ».

- 5) Legge Regionale 2 febbraio 1982, n. 7: *Interventi per favorire la realizzazione di opere ed impianti per la tutela delle acque dall'inquinamento* (Boll. Uff. della Regione n. 7 del 17 febbraio 1982; G.U. n. 98 del 9 aprile 1982).

La regione Liguria concede finanziamenti a medio termine relativi alla realizzazione di opere ed impianti volti al disinquinamento idrico ed allo smaltimento dei fanghi di risulta nell'ambito dell'attuazione delle leggi 10 maggio 1976, n. 319 e 24 dicembre 1979, n. 650, e nel rispetto delle disposizioni della Comunità economica europea nella materia.

EMILIA-ROMAGNA

COMPITI DELEGATI AD AMMINISTRAZIONI PROVINCIALI.

- 1) Legge Regionale 24 marzo 1980, n. 19: *Attuazione dell'art. 2 della legge 24 dicembre 1979, n. 650, recante ulteriori norme in materia di tutela delle acque dall'inquinamento. Delega di funzioni amministrative alle province*

ed al comitato circondariale di Rimini (Boll. Uff. della Regione n. 42 del 26 marzo 1980; G.U. n. 133 del 16 maggio 1980).

Le funzioni amministrative inerenti le autorizzazioni ai titolari degli insediamenti produttivi per l'attuazione dei programmi di disinquinamento dei rispettivi scarichi idrici defluenti sia nei corsi d'acqua superficiali, sia nelle pubbliche fognature, demandate alla Regione dall'art. 2 della legge n. 650/1979, sono delegate alle amministrazioni provinciali ed al comitato circondariale di Rimini per i territori di rispettiva competenza.

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

- 2) Legge Regionale 31 agosto 1978, n. 39: *Interventi per la ricerca ambientale. Norme per l'esercizio della motonave regionale « Daphne »* (Boll. Uff. della Regione n. 120 dell'1 settembre 1978; G.U. n. 308 del 3 novembre 1978).

La motonave « Daphne », al pari dei mezzi mobili di rilevamento dell'inquinamento e delle reti provinciali di controllo ambientale, è inserita nella struttura regionale dei sistemi di controllo coordinata dal centro regionale previsto dalla legge regionale 24 marzo 1975, n. 19.

L'uso della nave è finalizzato alle campagne di ricerca per lo studio dei fenomeni riguardanti l'inquinamento, l'eutrofizzazione del mare Adriatico e dei corsi d'acqua e l'erosione marine per la parte interessante il territorio regionale, nonché per rilievi batimetrici e correntimetrici e per studi comunque attinenti il rilevamento e la determinazione di parametri connessi con i predetti fenomeni.

- 3) Legge Regionale 30 ottobre 1979, n. 39: *Immissioni di scarichi nelle acque costiere del mare Adriatico. Delega di funzioni amministrative alle province di Ferrara, Forlì e Ravenna* (Boll. Uff. della Regione n. 130 del 3 novembre 1979; G.U. n. 340 del 14 dicembre 1979).

Le funzioni amministrative inerenti le autorizzazioni ad immettere direttamente nel mare Adriatico i rifiuti di lavorazioni industriali o provenienti da servizi pubblici o da insediamenti di qualunque specie sono attribuite ai capi dei compartimenti marittimi. Le funzioni amministrative sono delegate alle province di Ferrara, Forlì e Ravenna per i tratti di costa adriatica prospicienti le rispettive circoscrizioni territoriali.

NORME FINANZIARIE.

- 4) Legge Regionale 5 giugno 1976, n. 21: *Primo finanziamento della spesa derivante dal concorso della regione Emilia-Romagna nel pagamento del costo di realizzazione del piano di utilizzazione ottimale e per la salvaguardia delle risorse idriche* (Boll. Uff. della Regione n. 69 dell'8 giugno 1976; G.U. n. 173 del 3 luglio 1976).

L'amministrazione regionale è autorizzata a corrispondere alla S.p.a. IDRO.S.E.R., costituita a sensi della legge regionale 5 giugno 1975, n. 44, la propria quota di concorso nella spesa per le attività di studio,

pianificazione settoriale e progettazione di massima concernenti il « piano regionale per la salvaguardia e l'utilizzazione ottimale delle risorse idriche in Emilia-Romagna ».

- 5) Legge Regionale 15 novembre 1976, n. 47: *Disciplina transitoria degli interventi per il finanziamento di opere idroigieniche nel territorio regionale* (Boll. Uff. della Regione n. 151 del 16 novembre 1976; G.U. n. 324 del 4 dicembre 1976).

La regione Emilia-Romagna, fino all'approvazione del « Piano per la utilizzazione ottimale e per la salvaguardia delle risorse idriche » in corso di elaborazione da parte dell'IDRO.S.E.R. S.p.a. e fino all'approvazione del piano di risanamento delle acque di cui alla legge 10 maggio 1976, n. 319, è autorizzata a concedere contributi a favore dei comuni e loro consorzi per la esecuzione di lavori attinenti le opere idroigieniche secondo le disposizioni di cui alla presente legge.

- 6) Legge Regionale 22 gennaio 1980, n. 6: *Nuovi interventi della Regione per il controllo e la prevenzione degli inquinamenti atmosferici ed idrici* (Boll. Uff. della Regione n. 9 del 24 gennaio 1980; G.U. n. 89 del 31 marzo 1980).

La regione Emilia-Romagna, nell'ambito dei compiti a essa demandati dallo statuto e dalle leggi dello Stato per la tutela dell'ambiente dall'inquinamento, concorre nelle spese sostenute dalle province, dai comuni e loro consorzi per l'installazione, il completamento, il potenziamento e la manutenzione straordinaria delle reti per il rilevamento degli inquinamenti atmosferici e delle caratteristiche dei corpi idrici.

- 7) Legge Regionale 19 maggio 1980, n. 37: *Interventi della regione Emilia-Romagna per la realizzazione di impianti di smaltimento dei rifiuti solidi e dei fanghi* (Boll. Uff. della Regione n. 78 del 22 maggio 1980; G.U. n. 245 del 6 settembre 1980).

La regione Emilia-Romagna, al fine di incentivare più corretti interventi nello smaltimento dei rifiuti solidi e dei fanghi, e di favorire un più razionale uso delle risorse anche a fini energetici, concede finanziamenti a comuni, a loro consorzi costituiti a sensi del testo unico della legge comunale e provinciale ed a consorzi misti, con partecipazione di comuni e privati, per la realizzazione di impianti di smaltimento dei rifiuti solidi e dei fanghi.

- 8) Legge Regionale 17 agosto 1981, n. 22: *Contributi a favore di imprese che realizzano interventi per la depurazione degli scarichi idrici* (Boll. Uff. della Regione n. 97 del 19 agosto 1981; G.U. n. 246 dell'8 settembre 1981).

La Regione, in attuazione dell'art. 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319 e successive modificazioni ed integrazioni, concede contributi in capitale ai titolari di imprese industriali, artigianali ed agricole in attività alla data 1 gennaio 1975, che abbiano realizzato o realizzino interventi diretti all'abbattimento delle sostanze inquinanti dei rispettivi scarichi idrici, secondo i criteri previsti nella presente legge.

TOSCANA

COMPITI DELEGATI ALLA REGIONE.

- 1) Legge Regionale 15 maggio 1980, n. 52: *Norme per l'esercizio delle funzioni attribuite alla Regione dalle leggi 10 maggio 1976, n. 319 e 24 dicembre 1979, n. 650 e delega in materia di tutela delle acque dall'inquinamento* (Boll. Uff. della Regione n. 29 del 23 maggio 1980; G.U. n. 302 del 4 novembre 1980).

L'esercizio delle funzioni attribuite alla Regione dalle leggi n. 319/1976 e n. 650/1979, in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, è disciplinato dalla presente legge.

Il consiglio regionale provvede, su proposta della giunta regionale:

a) all'approvazione del piano regionale di risanamento delle acque;

b) all'approvazione dei programmi relativi alla concessione di contributi ai comuni ed ai consorzi intercomunali per gli interventi di cui all'art. 19 della legge n. 319/1976 ed alle provincie per l'espletamento dei compiti ad esse affidati dagli articoli 5 e 15, settimo comma, della predetta legge, come modificati dalla legge n. 650/1979;

c) all'approvazione dei programmi concernenti la concessione di contributi ad imprese ai sensi dell'art. 20 della legge n. 319/1976;

d) all'approvazione delle tariffe per i servizi di fognatura e depurazione nonché alla fissazione dei modi e termini per la presentazione delle denunce relative alla qualità delle acque scaricate di cui all'art. 16 della legge n. 319/1976.

NORME FINANZIARIE.

- 2) Legge Regionale 5 luglio 1977, n. 37: *Autorizzazione alla contrazione di un mutuo per L. 1.000.000.000 per il finanziamento degli interventi previsti dall'art. 1 della legge regionale 4 settembre 1974, n. 62, concernente contributi in conto capitale per la costruzione, l'ampliamento, il completamento e la sistemazione di acquedotti previsti nel piano regolatore generale degli acquedotti e delle fognature occorrenti per lo smaltimento delle acque di rifiuto* (Boll. Uff. della Regione n. 37 del 12 luglio 1977; G.U. n. 259 del 22 settembre 1977).

Per il finanziamento di una quota della spesa prevista dall'art. 1 della legge regionale 4 settembre 1976, n. 62, la giunta regionale è autorizzata a contrarre, con la sezione autonoma per il finanziamento di opere pubbliche e di impianti di pubblica utilità, uno o più mutui per un totale di L. 1.000.000.

- 3) Legge Regionale 5 luglio 1977, n. 41: *Modifiche alla legge regionale 17 gennaio 1976, n. 5, concernente rifinanziamento della legge regionale 27 maggio 1974, n. 22, riguardante interventi per il reperimento e l'utilizzazione di risorse idriche nonché per lo smaltimento e la depurazione delle acque di rifiuto* (Boll. Uff. della Regione n. 37 del 12 luglio 1977; G.U. n. 259 del 22 settembre 1977).

Per il finanziamento di una quota della spesa indicata al precedente articolo la giunta regionale è autorizzata a contrarre, con la sezione autonoma per il

finanziamento di opere pubbliche e di impianti di pubblica utilità della Banca nazionale del lavoro e/o con la sezione autonoma per il finanziamento di opere pubbliche e di impianti di pubblica utilità del Monte dei Paschi di Siena, uno o più mutui per un importo complessivo di L. 6.500.000.000, ammortizzabili in venti anni con decorrenza dall'esercizio 1977.

4) Legge Regionale 7 aprile 1978, n. 25: *Rifinanziamento art. 6 della legge regionale 17 gennaio 1973, n. 8, riguardante interventi per la costruzione, l'impianto e la sistemazione degli acquedotti previsti nel P.R.G.A., nonché delle fognature occorrenti per lo smaltimento e la depurazione delle acque di rifiuto* (Boll. Uff. della Regione n. 16 del 14 aprile 1978; G.U. n. 197 del 15 luglio 1978).

È autorizzata la spesa di L. 3.000.000.000 per la concessione di contributi in conto capitale previsti dall'art. 6 della legge regionale 17 gennaio 1973, n. 8, riguardante interventi per la costruzione, l'ampliamento e la sistemazione degli acquedotti e delle fognature occorrenti per lo smaltimento delle acque di rifiuto.

5) Legge Regionale 5 settembre 1978, n. 62: *Rifinanziamento della legge regionale 25 maggio 1974, n. 22, per il reperimento e l'utilizzazione di risorse idriche nonché per lo smaltimento e la depurazione delle acque di rifiuto* (Boll. Uff. della Regione n. 46 dell'11 settembre 1978; G.U. n. 336 dell'1 dicembre 1978).

È autorizzata la spesa di L. 7.500.000.000 per interventi a totale carico della Regione per il reperimento e l'utilizzazione di risorse idriche nonché per lo smaltimento e la depurazione delle acque di rifiuto, ai sensi della legge regionale n. 22 del 27 maggio 1974 e dell'art. 2 della legge regionale 4 settembre 1976, n. 62.

6) Legge Regionale 15 maggio 1980, n. 57: *Contributi in conto interesse o in conto capitale per la realizzazione, la modifica, l'adeguamento di impianti di depurazione o di pretrattamento degli scarichi idrici delle imprese industriali ed artigianali di cui alla legge 10 maggio 1976, n. 319 e successive modificazioni* (Boll. Uff. della Regione n. 29 del 23 maggio 1980; G.U. n. 302 del 4 novembre 1980).

La Regione, nell'ambito delle proprie competenze in materia di tutela delle acque dall'inquinamento di cui alla legge 10 maggio 1976, n. 319, e successive integrazioni e modificazioni, concede contributi in conto interesse o in conto capitale ai soggetti indicati dall'art. 2 della presente legge, per le iniziative destinate esclusivamente o prevalentemente all'adeguamento degli scarichi dei rifiuti liquidi ai limiti ed alle prescrizioni previsti dalla legge n. 319/1976 e successive modificazioni ed integrazioni.

UMBRIA

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

1) Legge Regionale 22 gennaio 1979, n. 9: *Norme integrative e di attuazione della legge 10 maggio 1976, n. 319, relative allo smaltimento dei rifiuti liquidi sul suolo e nel sottosuolo ed alla salvaguardia e tutela delle acque sotterranee dagli inquinamenti* (Boll. Uff. della Regione n. 5 del 24 gennaio 1979; G.U. n. 134 del 17 maggio 1979).

È vietato lo smaltimento dei rifiuti liquidi nel sottosuolo. Lo smaltimento sul suolo adibito ad uso agricolo dei rifiuti liquidi degli allevamenti di animali, potrà essere consentito mediante il ricorso alla pratica della fertirrigazione, assicurando il rigoroso rispetto di determinate condizioni.

2) Legge Regionale 3 agosto 1979, n. 42: *Modifiche ed integrazioni della legge regionale 22 gennaio 1979, n. 9* (Boll. Uff. della Regione n. 38 dell'8 agosto 1979; G.U. n. 277 del 10 ottobre 1979).

Il termine di tre mesi previsto dal secondo comma dell'art. 5 della legge regionale 22 gennaio 1979, n. 9, è prorogato di tre mesi.

Il quarto comma dell'art. 11 della legge regionale 22 gennaio 1979, n. 9, è sostituito dal seguente:

« Nel caso che le opere di cui al comma precedente siano destinate alla ricerca o all'attingimento delle acque pubbliche di cui al regio decreto 11 dicembre 1933, n. 1775, l'autorizzazione è rilasciata dalla giunta regionale sentiti il sindaco nonché il consiglio provinciale di sanità ».

NORME FINANZIARIE.

3) Legge Regionale 29 maggio 1980, n. 61: *Interventi per favorire la realizzazione o la modificazione degli impianti per la raccolta e lo smaltimento dei rifiuti liquidi da parte dei soggetti di cui agli articoli 19 e 20 della legge n. 319/1976 e della legge regionale n. 9/1979, in attuazione della legge n. 650 del 24 dicembre 1979* (Boll. Uff. della Regione ediz. straord. n. 35 del 2 giugno 1980; G.U. n. 264 del 25 settembre 1980).

La regione Umbria per conseguire gli obiettivi della legge n. 319/1976 interviene mediante la erogazione di contributi in conto capitale, per favorire: i lavori di costruzione, ristrutturazione ed ampliamento degli impianti gestiti dai comuni e/o dai loro consorzi, necessari all'espletamento dei servizi pubblici di cui all'art. 5 della legge n. 319/1976, interessanti in particolare modo i piccoli centri abitati.

4) Legge Regionale 23 dicembre 1980, n. 78: *Modifiche alla legge regionale 29 maggio 1980, n. 61* (Boll. Uff. della Regione n. 74 del 31 dicembre 1980; G.U. n. 35 del 5 febbraio 1981).

All'art. 3, primo comma, della legge regionale 29 maggio 1980, n. 61, le parole « entro 90 giorni dalla data di entrata in vigore della presente legge » sono sostituite come segue: « entro il 31 gennaio 1981 ».

All'art. 3, terzo comma, della legge regionale 29 maggio 1980, n. 61, le parole « entro 150 giorni dall'entrata in vigore della presente legge » sono sostituite come segue: « entro il 31 marzo 1981 ».

LAZIO

NORME FINANZIARIE.

1) Legge Regionale 1° ottobre 1979, n. 81: *Canoni per la raccolta, l'allontanamento, la depurazione e lo scarico delle acque di rifiuto: tariffe e relativi massimali, modi e*

termini per la presentazione della denuncia ex art. 17, legge 10 maggio 1976, n. 319 (Boll. Uff. della Regione n. 32 del 20 novembre 1979; G.U. n. 77 del 19 marzo 1980).

Le tariffe per le diverse categorie di utenti ed i relativi massimali vincolanti per gli enti erogatori dei pubblici servizi di raccolta, allontanamento, depurazione e scarico delle acque di rifiuto, sono determinati secondo i criteri dell'Allegato A alla presente legge.

2) Legge Regionale 6 giugno 1980, n. 53: *Riapertura dei termini fissati dall'art. 6 della legge regionale 1° ottobre 1979, n. 81 e rettifiche al testo della legge stessa* (Boll. Uff. della Regione n. 23 del 20 agosto 1980; G.U. n. 346 del 18 dicembre 1980).

Sono riaperti i termini per la presentazione delle denunce di cui all'art. 6, primo comma, della legge regionale 1° ottobre 1979, n. 81.

Il tempo utile per la presentazione delle denunce di cui al comma precedente è fissato al sessantesimo giorno successivo all'entrata in vigore della presente legge.

3) Legge Regionale 9 novembre 1981, n. 30: *Modalità di finanziamento degli interventi previsti dall'art. 4 della legge 24 dicembre 1979, n. 650, in materia di tutela delle acque dall'inquinamento* (Boll. Uff. della Regione n. 33 del 30 novembre 1981; G.U. n. 10 del 12 gennaio 1982).

La regione Lazio, per le finalità di cui alla legge 10 maggio 1976, n. 319, svolge studi e ricerche con le modalità di cui all'art. 4 della legge 24 dicembre 1979, n. 650, avvalendosi anche di enti ed istituti pubblici privati a mezzo di apposite convenzioni.

ABRUZZO

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

1) Legge Regionale 15 settembre 1981, n. 43: *Disciplina degli scarichi della pubblica fognatura* (Boll. Uff. della Regione n. 34 del 30 settembre 1981; G.U. n. 305 del 5 novembre 1981).

La presente legge è parte integrante del piano di risanamento regionale delle acque ed ha per oggetto la disciplina degli scarichi effluenti da sistemi fognanti gestiti da comuni, consorzi intercomunali, comunità montane.

NORME FINANZIARIE.

2) Legge Regionale 9 settembre 1981, n. 40: *Interventi regionali in attuazione degli articoli 19 e 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319, recante: «Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento», integrata e modificata dalla legge 24 dicembre 1979, n. 650* (Boll. Uff. della Regione n. 33 del 29 settembre 1981; G.U. n. 305 del 5 novembre 1981).

In attuazione dell'art. 19 della legge 10 maggio 1976, n. 319, integrata e modificata dalla legge 24 dicembre 1979, n. 650, la Regione concede contributi in conto

capitale ai comuni, ai consorzi intercomunali e alle comunità montane, per la costruzione e l'ammodernamento degli impianti necessari all'espletamento dei servizi pubblici di cui all'art. 6 della legge n. 319/1976, nonché per le spese relative agli impianti di cui al punto c) dello stesso articolo.

MOLISE

CENSIMENTO DEI CORPI IDRICI E PIANO DI RISANAMENTO DELLE ACQUE.

1) Legge Regionale 21 maggio 1980, n. 17: *Norme per il censimento ed il catasto in materia di tutela delle acque dall'inquinamento* (Boll. Uff. della Regione n. 11 del 31 maggio 1980; G.U. n. 259 del 20 settembre 1980).

La regione Molise in attuazione dell'art. 3 dello Statuto dei principi generali delle leggi dello Stato in materia e nel rispetto delle competenze proprie degli Enti locali territoriali, opera il censimento dei corpi idrici ed istituisce il catasto regionale delle acque al fine di accertare e garantire la disponibilità qualitativa e quantitativa delle risorse idriche e per il loro uso plurimo.

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

2) Legge Regionale 3 giugno 1980, n. 27: *Norme integrative e di attuazione dei criteri e delle norme generali di cui al punto e), n. 2 e 3, della legge 10 maggio 1976 n. 319, in materia di liquami e fanghi* (Boll. Uff. della Regione n. 12 del 16 giugno 1980; G.U. n. 262 del 24 settembre 1980).

È regolato dalla presente legge lo smaltimento finale e non finale, diretto o indiretto:

a) dei liquami provenienti da insediamenti produttivi sul suolo e negli strati superficiali del suolo o in ogni altro settore finale diverso dalle acque superficiali o dalle fognature;

b) dei fanghi residuati dai cicli di lavorazione e dai processi di depurazione o potabilizzazione;

c) dei fanghi o residui ad essi assimilabili a base non acquosa, salva l'applicabilità di disposizioni integrative da impartirsi per i singoli casi.

Lo scarico di liquami in acque superficiali o fognature è regolamentato dal piano regionale di risanamento idrico.

NORME FINANZIARIE.

3) Legge Regionale 29 dicembre 1978, n. 34: *Progetto regionale di sviluppo-Finanziamento di un programma straordinario triennale (1978-80) di reti idriche e fognanti ed impianti di depurazione* (Boll. Uff. della Regione n. 24 del 30 dicembre 1978; G.U. n. 67 dell'8 marzo 1979).

È autorizzata la spesa di lire 15 miliardi negli esercizi finanziari 1978, 1979, 1980, per la concessione di contributi in capitale ai comuni della Regione nella misura del 100% della spesa necessaria per la costru-

zione, il completamento, l'ampliamento e miglioramento delle reti idriche e fognanti e degli impianti di depurazione a servizio degli abitati nei centri capoluogo, nelle frazioni e nelle borgate.

- 4) Legge Regionale 3 giugno 1980, n. 28: *Norme per la determinazione delle tariffe relative ai servizi di fognatura e depurazione delle acque di rifiuto di cui alla legge n. 319 del 10 maggio 1976 e successive modificazioni* (Boll. Uff. della Regione n. 12 del 16 giugno 1980; G.U. n. 262 del 24 settembre 1980).

L'importo del canone dovuto ai comuni o ai loro consorzi intercomunali o alle comunità montane per i servizi relativi alla raccolta, l'allontanamento, la depurazione e lo scarico delle acque di rifiuto, è determinato ai sensi della legge n. 319 del 10 maggio 1976 e successive modificazioni ed integrazioni, in conformità alle Tabelle A, B e C.

CAMPANIA

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

- 1) Legge Regionale 24 aprile 1980, n. 24: *Art. 14 della legge 24 dicembre 1979, n. 650. Designazione autorità competente a rilasciare l'autorizzazione agli scarichi nelle acque del mare* (Boll. Uff. della Regione n. 27 del 5 maggio 1980; G.U. n. 196 del 18 luglio 1980).

In adempimento a quanto disposto dall'art. 14 della legge 24 dicembre 1979, n. 650, recante disposizioni in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, quali autorità competenti a rilasciare autorizzazioni agli scarichi diretti alle acque del mare, sono designate le provincie competenti per territorio.

PUGLIA

COMPITI DELEGATI ALLA REGIONE.

- 1) Legge Regionale 6 marzo 1979, n. 13: *Norme per la realizzazione di impianti di depurazione dei liquami di fogna dei centri urbani e per l'utilizzo delle acque reflue a scopo irriguo* (Boll. Uff. della Regione n. 17 del 10 marzo 1979; G.U. n. 181 del 4 luglio 1979).

Gli impianti di depurazione dei liquami di fogna dei centri urbani, appartenenti a comuni diversi, comprese le condotte intercomunali e le opere per il loro smaltimento o utilizzazione, a servizio di più abitati (impianti collettivi), sono opere di competenze regionali.

NORME FINANZIARIE.

- 2) Legge Regionale 4 marzo 1980, n. 15: *Tariffe per i servizi di raccolta, allontanamento, depurazione e scarico delle acque di rifiuto* (Boll. Uff. della Regione n. 19 del 20 marzo 1980; G.U. n. 144 del 28 maggio 1980).

Sino all'entrata in vigore della legge regionale in materia di « tutela ed uso delle risorse idriche », la Regione, con la presente legge, dà attuazione a quanto

disposto dagli articoli 16 e 17 della legge n. 319/1976, riguardanti la determinazione delle tariffe per i servizi di raccolta, depurazione e scarico delle acque di rifiuto, ed il pagamento del relativo canone.

BASILICATA

NORME FINANZIARIE.

- 1) Legge Regionale 29 maggio 1980, n. 47: *Denuncia della quantità e qualità delle acque scaricate e determinazione dei massimali relativi alle tariffe per i servizi di raccolta, allontanamento, depurazione e scarico delle acque di rifiuto, in applicazione degli articoli 16 e 17 della legge 10 maggio 1976, n. 319 e 25 della legge 24 dicembre 1979, n. 650* (Boll. Uff. della Regione n. 19 del 1° giugno 1980; G.U. n. 154 del 6 giugno 1981).

La corresponsione dei canoni per i servizi relativi alla raccolta, allontanamento, depurazione e scarico delle acque di rifiuto decadenti dalle superfici e dai fabbricati privati e pubblici, ivi compresi gli stabilimenti e opifici industriali, ai sensi degli articoli 16 e 17 della legge n. 319/1976, viene determinata in base all'applicazione di tariffe derivanti dalle formule-tipo di cui al D.P.R. 24 maggio 1977, e secondo i criteri dell'Allegato A della presente legge.

Le tariffe di cui al presente articolo sono determinate per le diverse categorie di utenti ed esprimono il massimale vincolante per gli erogatori dei servizi e riscuotitori del canone, ai sensi del secondo comma dell'art. 17 della legge n. 319/1976.

- 2) Legge Regionale 25 agosto 1981, n. 28: *Contributi per la realizzazione, la modifica, l'adeguamento di impianti di depurazione o pretrattamento degli scarichi idrici delle imprese industriali ed agricole, di cui alla legge 10 maggio 1976, n. 319, e successive modifiche ed integrazioni* (Boll. Uff. della Regione n. 28 del 1° settembre 1981; G.U. n. 286 del 17 ottobre 1981).

La Regione, in attuazione dell'art. 20 della legge 10 maggio 1976, n. 319 e successive modifiche ed integrazioni, concede contributi in conto capitale ai soggetti indicati dall'art. 2 della presente legge, per la costruzione, il completamento e l'ampliamento di impianti, di trattamento o pretrattamento, che abbiano il fine di adeguare gli scarichi dei rifiuti liquidi ai limiti ed alle prescrizioni previsti dalla legge 10 maggio 1976, n. 319 e successive modificazioni ed integrazioni.

- 3) Legge Regionale 22 febbraio 1982, n. 5: *Norme per la concessione di contributi ventennali finalizzati alla integrale attuazione del primo programma di risanamento delle acque di cui all'art. 1 della legge 24 dicembre 1979, n. 650* (Boll. Uff. della Regione n. 5 del 1° marzo 1982; G.U. n. 117 del 29 aprile 1982).

Al fine di assicurare l'attuazione di tutti gli interventi previsti nel primo programma di risanamento delle acque, redatto ai sensi dell'art. 1 della legge 24 dicembre 1979, n. 650, che non è possibile realizzare nella sua interezza in dipendenza delle insufficienti disponibilità finanziarie derivanti dagli stanziamenti disposti dalla stessa legge n. 650/1979, la Regione è

autorizzata a concedere a favore degli enti interessati contributi costanti ventennali nella misura del 7% sulla spesa riconosciuta necessaria.

SICILIA

CENSIMENTO DEI CORPI IDRICI E PIANO DI RISANAMENTO DELLE ACQUE.

- 1) Legge 18 giugno 1977, n. 39: *Norme per la tutela dell'ambiente e per la lotta contro l'inquinamento (G.U. della Regione n. 27 del 21 giugno 1977; G.U. n. 300 del 3 novembre 1977).*

Il comitato regionale per la tutela dell'ambiente: predispose, entro tre anni dall'entrata in vigore della presente legge, lo schema del piano generale per la tutela dell'ambiente nella Regione, e le successive modifiche ed aggiornamenti; predispose lo schema del piano regionale di risanamento delle acque di cui all'art. 8 della legge n. 319/1976.

- 2) Legge 4 agosto 1980, n. 78: *Modifiche ed integrazioni alla legge regionale 18 giugno 1977, n. 39, riguardante norme per la tutela dell'ambiente e per la lotta contro l'inquinamento (G.U. della Regione n. 36 del 9 agosto 1980; G.U. n. 5 del 7 gennaio 1981).*

Il piano regionale di risanamento delle acque di cui all'art. 8 della legge 319/1976 e successive modificazioni, è adottato entro il 30 giugno 1982, con decreto del Presidente della Regione su proposta dell'Assessore regionale per il territorio e l'ambiente, prevista delibera della giunta regionale, sentita la competente commissione legislativa dell'assemblea regionale.

REGOLAMENTAZIONE DEGLI SCARICHI.

- 3) Legge 30 dicembre 1980, n. 161: *Modifiche ed integrazioni alla legge regionale 4 agosto 1980, n. 78, sulla tutela dell'ambiente e lotta contro l'inquinamento (G.U. della Regione n. 1 del 3 gennaio 1981; G.U. n. 95 del 6 aprile 1981).*

Il termine di due mesi di cui al primo comma dell'art. 2 della legge 24 dicembre 1979, n. 650, per la presentazione del programma di adeguamento, ove previsto, alla Tabella C della legge 10 maggio 1976, n. 319, è prorogato, per i mattatoi comunali, al 28 febbraio 1981.

- 4) Legge 29 dicembre 1981, n. 181: *Proroga dei termini di cui agli articoli 2, 15 e 16 della legge 24 dicembre 1979, n. 650 e modifiche ed integrazioni delle leggi regionali 18 giugno 1977, n. 39, 4 agosto 1980, n. 78, in materia*

Ricevuto e accettato l'8 giugno 1982.

di tutela delle acque dall'inquinamento (G.U. della Regione n. 1 del 2 gennaio 1982; G.U. n. 45 del 16 febbraio 1982).

Entro un mese dall'entrata in vigore della presente legge potranno essere presentate motivate domande di proroga dei termini fissati per l'attuazione dei programmi di cui agli articoli 2, 15, 16 della legge 24 dicembre 1979, n. 650.

NORME FINANZIARIE.

- 5) Legge 30 dicembre 1977, n. 117: *Interventi urgenti a favore dei comuni della Regione per fronteggiare l'aggravarsi dei problemi igienico-sanitari (G.U. della Regione n. 1 del 7 gennaio 1978; G.U. n. 104 del 15 aprile 1978).*

L'assessore regionale per la sanità, al fine di consentire l'attuazione di interventi straordinari per la profilassi nei comuni della Regione, atti ad eliminare gravi carenze igienico-sanitarie, è autorizzato a concedere ai comuni dell'Isola fondi: per la costruzione, il riattamento e la manutenzione straordinaria di impianti di smaltimento di rifiuti liquidi, ivi compresa la realizzazione di tratti di rete idrica fognaria e di pozzi IMOF, secondo le norme di cui alla legge 10 maggio 1976, n. 319.

SARDEGNA

NORME FINANZIARIE.

- 1) Legge Regionale 11 novembre, 1976, n. 53: *Interpretazione autentica dell'art. 9 della legge regionale 1° agosto 1973, n. 16, recante modifica ed integrazioni alla legge regionale 20 aprile 1955, n. 6, concernente la protezione delle acque pubbliche contro l'inquinamento (Boll. Uff. della Regione n. 46 del 26 novembre 1976; G.U. n. 335 del 17 dicembre 1976).*

Il terzo comma dell'art. 9 della legge regionale 1° agosto 1973, n. 16, deve intendersi nel senso che, per lo scopo di cui al primo comma, l'amministrazione regionale è autorizzata, oltre che alla concessione di contributi agli organismi pubblici in esso indicati, alla erogazione di fondi direttamente, ovvero mediante l'affidamento di incarico, tramite convenzioni, ed esperti singoli od associati per studi, ricerche, programmi e convegni.

Gli Autori ringraziano il Sig., Tommaso Proietti dipendente del Centro Elettronico Documentazione della Corte di Cassazione, per la collaborazione prestata nel reperire la normativa regionale.