

IL RISCHIO BIOLOGICO IN IMPIANTI DI TRATTAMENTO ACQUE REFLUE VALUTATO ATTRAVERSO LA COSTITUZIONE DI UNA RETE DI AZIENDE E L'APPLICAZIONE DI UNA METODOLOGIA MULTIDISCIPLINARE (PROGETTO BIONET626)

Agostino Bazzichi*, Fabrizia Turchi*, Fabrizio Cervelli*, Valeria Bevilacqua*, Agostino Pantani°, Carmelo Liberati^ e Giorgio Valentini*.

*Laboratori ARCHA srl, Ospedaletto (PI)

°Ingenia srl, S.Croce sull'Arno (PI)

^Scuola di Specializzazione Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Pisa

agostino.bazzichi@archa.it

SOMMARIO

Il progetto BIONet626 è uno studio nato per rispondere alla crescente esigenza, da parte delle aziende operanti nel settore della depurazione delle acque reflue, di valutare il Rischio Biologico cui sono esposti i propri dipendenti. La ricerca, che si fonda su un protocollo multidisciplinare, consente alle aziende partecipanti di confrontarsi con realtà simili caratterizzate dalle stesse problematiche fornendo un criterio di giudizio generale che va oltre le caratteristiche specifiche dei singoli impianti. Più in dettaglio, a partire da indagini ambientali che prevedono la ricerca di microrganismi indicatori e patogeni in campioni di aerosol e di campionatori personali, i vari ambienti vengono classificati in base ad elaborazioni statistiche e ad una apposita scala di valutazione dei livelli di contaminazione rendendo più agevole la stesura del documento di valutazione del rischio. I risultati ottenuti mostrano un quadro caratterizzato da alcune situazioni critiche ma, in generale, meno grave di quanto teoricamente atteso.

1. INTRODUZIONE

In un impianto di depurazione delle acque reflue gli aspetti igienico-sanitari dell'ambiente di lavoro, in conseguenza della potenziale esposizione professionale a vari fattori di rischio, assumono una rilevanza significativa di difficile inquadramento in quanto caratterizzata da un'ampia variabilità. Dall'analisi del ciclo produttivo di un impianto di depurazione è possibile rilevare la presenza di contaminanti sia di tipo chimico, che biologico: mentre i primi si possono ricondurre alla formazione (generalmente sporadica) di solfuro di idrogeno e ammoniaca ed il rischio è legato a possibili episodi accidentali legati allo sviluppo di tali gas e/o alla manipolazione di sostanze pericolose, i secondi rappresentano una caratteristica più o meno costante nelle acque reflue. Infatti, queste ultime possono teoricamente contenere una popolazione di microrganismi diversi, da batteri, virus, protozoi, ciascuno con proprie caratteristiche infettive, allergogene e tossigeniche. Se in passato la medicina del lavoro si è maggiormente occupata dei rischi infettivi per le vie di esposizione più classiche, quali quella digestiva e cutanea, più recentemente particolare attenzione è stata rivolta alla esposizione per via inalatoria ad aerosol veicolanti microrganismi. Tale aerosol viene prodotto soprattutto per azione di organi meccanici in movimento o, meglio, ogni qualvolta ci sia turbolenza nel liquame. Degne di attenzione sono la stazione di ingresso/grigliatura, la vasca di ossidazione, lo scarico dei reflui conferiti mediante autobotte, le operazioni di disidratazione dei fanghi e tutte le operazioni di lavaggio, eseguite comunemente con acqua in pressione. La dispersione di aerosol contaminato può coinvolgere tutta l'area di impianto interessando a volte anche locali confinati, quali spogliatoi, uffici e sale mensa, dove si può avere accumulo e ristagno di specie microbiche. Il grado di esposizione degli addetti all'impianto ad aerosol contaminati è inversamente proporzionale alla loro distanza dalla sorgente di diffusione e dipende dalle dimensioni delle particelle aerodisperse [1][2]. Il grado di contaminazione dipende poi dalle modalità operative e gestionali, dalle tecnologie impiantistiche adottate e dal microclima presente in ogni ambito.

Sebbene siano riportati in letteratura alcuni tentativi di approccio al problema [3], non esiste a tutt'oggi una procedura di indagine standardizzata per un monitoraggio dell'esposizione ad aerosol contaminati, così come carenti sono le possibilità di controllo sanitario a scopo preventivo cui sottoporre gli addetti all'impianto. Nella quantificazione del rischio per la salute, l'impossibilità di una valutazione accurata della esposizione ai diversi contaminanti contenuti nelle acque reflue, nonché la difficoltà di stabilire una relazione fra l'esposizione di microrganismi e l'insorgenza di una manifestazione preclinica, unitamente alle differenze esistenti fra le metodiche di ricerca adottate, sta alla base delle discrepanze e delle incertezze che emergono dall'esame della letteratura scientifica sull'argomento. Fra gli effetti dovuti all'esposizione professionale la letteratura cita la cosiddetta Sindrome dei Fognaioli caratterizzata da un malessere generale, astenia, rinite acuta, alterazione dei titoli anticorpali ed una aumentata frequenza di episodi di dissenteria, irritazioni oculari e dermatiti irritative. Altri studi sono stati condotti sugli addetti agli impianti di depurazione, quali la ricerca di anticorpi specifici per la leptospirosi, l'adenovirus, il citomegalovirus, i virus

dell'epatite A e B, ma non sembrano esserci conoscenze conclusive nei riguardi della caratterizzazione dei rischi da esposizione ad agenti infettivi.

Sulla base di quanto detto appare fondamentale, per questo tipo di realtà produttiva, una impostazione ragionata e graduale dell'indagine ambientale finalizzata alla Valutazione del Rischio Biologico (VRB). Nell'ambito di un impianto di depurazione la varietà dei microrganismi, sia di origine ambientale che potenzialmente patogeni, presenti nei reflui è incalcolabile: per questo motivo l'operatore può essere esposto, per contatto diretto o inalazione, a diverse specie che sarebbe impossibile ricercare e classificare singolarmente, a ciò si aggiunga la variabilità legata agli eventi meteorologici e, quotidianamente, quella legata alle varie fasce orarie che influenzano tipologia e qualità dei reflui affluenti all'impianto. Inoltre, è importante sottolineare che, a differenza del rischio chimico, per il rischio biologico (RB) non esistono limiti di esposizione utilizzabili come valori di soglia di riferimento. L'impossibilità di determinare, per la maggior parte dei microrganismi, una dose minima infettante che prescinda dalla soggettività dei singoli individui e le poche informazioni disponibili sull'argomento, sono alla base di una profonda lacuna scientifico/dottrinale. A seguito di queste oggettive difficoltà nella quantificazione del RB, risulta quanto mai opportuno, come per il rischio di natura cancerogena, fare ricorso alla prevenzione come strumento principale di azione alla quale affiancare un'attività di monitoraggio ambientale allo scopo di caratterizzare dal punto di vista biologico l'ambiente indagato.

La Normativa attualmente in vigore, in particolare il D.Lgs 626 del 1994, impone alle aziende di predisporre il Documento di Valutazione di Rischio Biologico avvalendosi di tutte le fonti scientifiche a disposizione e di instaurare un sistema di controllo che permetta di valutare, dopo sistematiche rilevazioni, la frequenza con cui si verifica una contaminazione ambientale in un dato punto del sistema produttivo. A tale scopo i risultati delle rilevazioni eseguite sono più facilmente interpretabili qualora si possa far ricorso ad una visione integrata con esperienze analoghe provenienti dagli stessi settori produttivi: da questi presupposti nasce il progetto di ricerca BIONet626, uno studio ideato dalla Laboratori ARCHA S.r.l. nel 1998, che al momento ha monitorato circa 50 impianti di depurazione ed ottenuto più di 4000 risultati analitici. Il grande numero di dati raccolti e le informazioni ottenute attraverso l'elaborazione statistica hanno reso il progetto in grado di fornire una efficace risposta per una gestione mirata del RB e della sua Valutazione. La gestione del progetto si basa su elementi fondamentali atti a costruire un efficiente sistema di gestione della sicurezza e salute sul luogo di lavoro, sviluppandosi attraverso la partecipazione e collaborazione di tutte le parti interessate (operatori, dirigenti, responsabili del Servizio Protezione e Prevenzione) e suggerendo procedure gestionali ed operative sostenute da iniziative di formazione del personale in termini di sicurezza. Da alcuni anni lo studio è gestito in conformità alla Norma ISO9001:2000 (Vision 2000), attenendosi ad uno specifico Piano della Qualità che, in funzione dello scopo della ricerca, permette di pianificare e coordinare le attività raggiungendo gli obiettivi prefissati mediante il costante controllo e la corretta verifica del lavoro svolto.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento degli aerosol

Il campionamento degli aerosol viene effettuato con un apparato Surface Air System (SAS Super90, International PBI). Apposite piastre da batteriologia (Surfair, International PBI) contenenti terreno Plate Count Agar (PC; Oxoid) vengono introdotte nel SAS per campionare volumi variabili di aerosol, a seconda dei livelli presunti di contaminazione ambientale. Dopo il campionamento le piastre sono conservate in un frigorifero portatile e trasportate in laboratorio dove i campioni vengono analizzati entro le 8 ore successive. Al momento del campionamento sono rilevati alcuni parametri ambientali (dati al contorno) ritenuti in grado di influenzare i livelli di contaminazione aerodispersa: temperatura, umidità relativa, pressione atmosferica, velocità e direzione del vento, piovosità.

2.2 Campionatori personali

Per la preparazione dei campionatori personali (CP), quadrati di tessuto di 100 cm² vengono avvolti in carta stagnola e sterilizzati in autoclave a 121°C per 30 minuti. Il tessuto per l'allestimento dei CP è stato selezionato per la similitudine a quello impiegato nella fabbricazione delle tute da lavoro e per la capacità di trattenere i microrganismi (dati non mostrati). Al momento del campionamento, i CP vengono applicati mediante spille da balia sulla tuta dell'addetto e la carta stagnola viene rimossa mediante pinzette sterili. A fine campionamento (generalmente 6-8 ore) i CP sono prelevati con pinzette sterili ed introdotti in buste contenenti 10 ml di soluzione fisiologica sterile: scopo di questa operazione è prevenire la disidratazione e, di conseguenza, danni ai microrganismi campionati. I campioni così allestiti sono conservati in un frigorifero

portatile e trasportati in laboratorio dove i campioni sono analizzati entro le 8 ore successive.

2.3 Analisi microbiologiche

Per le analisi la parte superficiale del terreno di coltura PC contenuto nelle piastre Surfair viene asportata con un bisturi sterile, introdotta in un apposito sacchetto ed addizionata con 20 ml di una soluzione sterile di Acqua Peptonata Tamponata (APT, Oxoid). Dopo omogeneizzazione per 2 minuti ad alta velocità in un apparato digestore Stomacher 400 (International PBI), la soluzione risultante viene trasferita in una provetta, lasciata 20 minuti a temperatura ambiente per consentire la rivitalizzazione dei microrganismi stressati e, successivamente, impiegata per le analisi di laboratorio. I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia per m³ (UFC/m³) di aerosol campionato. Le metodiche analitiche impiegate per la ricerca delle varie specie microbiche sono riassunte in Tabella 1.

Per l'analisi dei CP, vengono aggiunti 40 ml di APT a ciascuna busta contenente il campione. Dopo omogeneizzazione per 2 minuti ad alta velocità in digestore Stomacher, 10 ml di soluzione risultante vengono prelevati ed impiegati per le analisi di laboratorio. Un'aliquota di 25 ml della soluzione rimanente viene utilizzata per la ricerca di *Salmonella spp.* I risultati (*Salmonella spp.* esclusa) sono espressi come Unità Formanti Colonia per cm² (UFC/cm²) di CP e normalizzato dividendo il dato ottenuto per il numero delle ore lavorative. Il risultato della ricerca di *Salmonella spp.* è espresso come Presenza/Assenza del microrganismo nel campione saggiato. Le metodiche analitiche impiegate per la ricerca delle varie specie microbiche sono riassunte in Tabella 1; la tabella riporta anche il significato che assume la ricerca di ciascuno dei parametri selezionati per lo svolgimento del presente studio.

Tabella 1. Metodiche analitiche impiegate per le analisi microbiologiche.

Parametro	Metodica	Significato della ricerca del parametro
Carica Batterica Totale a 36°C	UNICHIM N° 956:2001	Indice di contaminazione generica, non riferibile a nessun patogeno in particolare; risulta comunque inversamente proporzionale alla salubrità dell'ambiente in esame. Sempre ricercata in tutti gli studi di questo tipo, la sua valutazione consente anche un confronto con i dati presenti in letteratura.
Coliformi Fecali	UNICHIM N° 953/1:2001	Indicatori di contaminazione fecale, la loro carica è direttamente proporzionale alla probabilità di ritrovare patogeni di origine fecale
Streptococchi Fecali	UNICHIM N° 954/1:1994	Indicatori di contaminazione fecale, sopravvivono più a lungo dei coliformi e dei batteri patogeni, risultano più resistenti a trattamenti disinfettanti quali la clorazione. Il loro tempo di sopravvivenza è abbastanza lungo da poter essere paragonabile a quello degli enterovirus, importante categoria di patogeni molto resistenti nell'ambiente.
Batteri Gram Negativi	Laitinen et al., 1992 [7]	Classe di microrganismi produttori di endotossine, importante fattore patogenetico legato alla comparsa di disturbi di varia entità che possono manifestarsi sotto forma di semplici allergie o malattie piuttosto serie quali la "sindrome del fognaiolo". La valutazione del numero di questi batteri può dare una stima, seppure approssimata per difetto, della quantità di endotossine presenti nell'aria.
Muffe	ISTISAN 96/35 N° 2	Microrganismi di origine ambientale, importanti per il loro significato patogenetico in quanto implicati in patologie di tipo tossinfettivo ed allergico
Salmonella spp.	APHA 9260 D	Importanti patogeni di origine fecale. A differenza degli altri parametri, tutti indicatori, questi microrganismi costituiscono un fattore di rischio diretto.

2.4 Analisi statistica dei risultati

Le metodologie statistiche che costituiscono la base dell'interpretazione dei risultati analitici raccolti appartengono a quella branca della statistica che va sotto il nome di "tecniche chemiometriche". Tali tecniche oltre a garantire l'individuazione delle cosiddette "correlazioni" esistenti tra i dati analitici, permettono di dare risposte che, avendo un significato statistico, sono molto più ampie e valide di quanto sarebbe possibile ottenere solo sulla base delle diverse misure effettuate su ogni singolo impianto.

In particolare, con la tecnica denominata Principal Component Analysis (PCA) i diversi casi esaminati vengono descritti come *oggetti* e rappresentati come punti in grafici bidimensionali le cui coordinate, denominate *fattori*, sono ottenute come combinazione lineare delle variabili di partenza (parametri misurati o dichiarati). Su ogni fattore incidono uno o più parametri misurati con la conseguenza che, per la rappresentazione grafica delle situazioni più significative, i casi esaminati, saranno riportati in grafici le cui coordinate sono rappresentate dai Fattori selezionati. Nello spazio cartesiano descritto di volta in volta dai diversi parametri i casi esaminati possono essere classificati in base alla distanza tra i punti: più essi sono vicini tra loro, tanto più simili saranno le situazioni che rappresentano. La presenza di raggruppamenti (clusters) contenenti un elevato numero di casi definisce le situazioni statisticamente più probabili, cioè quelle che possono rappresentare un comportamento da definire *comune* o *usuale*, mentre un grafico che presenta una elevata dispersione testimonia notevoli differenze tra le caratteristiche degli oggetti in esso rappresentati.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Evidenze relative all'analisi degli aerosol

Il metodo da noi allestito per la ricerca dei microrganismi aerodispersi consente un miglior recupero dei germi stressati da fattori ambientali tipici dell'ambiente aereo e ostili alla sopravvivenza dei microrganismi, quali i bassi livelli di umidità oppure i raggi ultravioletti della radiazione solare. Il tentativo di coltivare microrganismi stressati direttamente su terreni di coltura selettivi conduce spesso al fallimento, risultando in una sottostima dei reali valori di contaminazione ambientale. La tecnica da noi sviluppata impiega un terreno non selettivo durante il campionamento e pone, sin da questa prima fase, i microrganismi in condizioni ecologicamente favorevoli, a contatto con una superficie umida. La successiva fase di rivitalizzazione in soluzione nutriente consente un ulteriore miglioramento delle condizioni fisiologiche del microrganismo e, di conseguenza, una resa maggiore in termini di recupero. Prove svolte nel nostro Laboratorio hanno confermato la migliore capacità di recupero di questa metodica rispetto al metodo di campionamento/coltivazione eseguito direttamente su piastre di coltura contenenti terreni selettivi.

Riguardo ai microrganismi ricercati, dalla Tabella 1 si può comprendere come l'approccio da noi studiato copra diversi aspetti riguardanti il RB negli impianti di depurazione delle acque reflue, dall'esposizione a patogeni di origine fecale (Coliformi fecali, Streptococchi fecali, *Salmonella spp.*), al rischio di insorgenza di patologie di origine allergica (Batteri Gram Negativi e Muffe), senza trascurare gli aspetti generali riguardanti la contaminazione ambientale (CBT e Muffe). In sede di progettazione è stato deciso di rinunciare alla ricerca dei virus di origine enterica poiché al protocollo sperimentale sono stati imposti obiettivi graduali, supportati dalla scelta di microrganismi che possono fungere da indicatori anche per questa classe di patogeni e da considerazioni di tipo ecologico riguardanti la presenza discontinua dei microrganismi patogeni; anche motivazioni riguardanti l'economia del progetto depongono a favore di questa scelta, in quanto l'onerosità di queste indagini avrebbe costretto a ridurre drasticamente il numero dei campioni prelevati.

La Tabella 2 riassume come sono stati percentualmente distribuiti i campionamenti di aerosol effettuati nei vari ambienti che compongono gli impianti di depurazione studiati.

Tabella 2. Distribuzione percentuale dei campioni di aerosol prelevati nei vari ambienti.

Aree direttamente coinvolte nel ciclo produttivo	%	Locali di servizio	%
Vasche di ossidazione	24,7	Spogliatoi	9,8
Stazioni ingresso impianto	16,5	Laboratori	7,9
Trattamento fanghi	14,5	Aree consumo alimenti	5,8
Stazioni scarico autobotti	8,4	Uffici	4,0
Altre aree impianto	6,2	Officine meccaniche	2,2

Appare evidente come il 70% circa dei campioni sia stato prelevato nelle aree direttamente coinvolte col ciclo produttivo e, di conseguenza, teoricamente più interessate dalla presenza di bioaerosol contaminati; una buona percentuale dello studio è stata, comunque, dedicata a quegli ambienti di servizio in cui il RB potrebbe essere presente, seppure in misura minore, a causa di effetti di trascinamento della contaminazione o per la presenza di materiali contaminati. In ambienti quali gli spogliatoi, ad esempio, accade che spesso venga sottovalutato l'impatto legato alla presenza di calzature da lavoro o di indumenti utilizzati per l'esecuzione di operazioni "sporche": questi locali costituiscono l'interfaccia con l'ambiente esterno e, quindi, comportano il rischio concreto che la contaminazione venga involontariamente portata fuori dall'impianto.

La Tabella 3 riporta le medie dei valori microbiologici rilevati.

Tabella 3. Medie dei valori microbiologici rilevati nei vari ambienti. I valori sono espressi come UFC/m³; in grassetto i valori più elevati per ciascun parametro. La colonna dei livelli di contaminazione verrà discussa al paragrafo 3.4.

Ambiente	CBT	Coliformi Fecali	Streptococchi Fecali	Salmonella spp.	Gram negativi	Muffe	Livello di Contaminazione
Stazioni ingresso impianto	1716	26	42	0,0	2464	3319	3,0
Vasche di ossidazione	3260	14	21	0,3	4374	3003	3,6
Stazioni scarico autobotti	828	7	178	0,0	822	969	1,7
Trattamento fanghi	7990	8	110	0,0	5829	1295	4,0
Laboratori	1222	2	11	0,0	553	642	1,6
Aree consumo alimenti	547	1	0	0,0	275	675	1,0
Spogliatoi	684	1	12	0,0	542	1563	1,5
Uffici	375	0	0	0,0	150	400	0,3
Officine meccaniche	223	0	4	0,0	314	1029	0,4
Media campioni	2645	10	45	0,1	2550	1892	2,6

I dati ottenuti dimostrano come i risultati peggiori, in termini di contaminazione batterica, si abbiano in quelle stazioni dove si trovano reflui freschi (ingresso impianto) o grandi quantità di biomassa microbica, come nella vasche di ossidazione e nelle stazioni di disidratazione fanghi. La stazione di scarico autobotte presenta risultati critici solamente riguardo agli streptococchi fecali: i reflui conferiti mediante autobotte provengono, in prevalenza da fosse settiche di civili abitazioni, e rappresentano un concentrato di materiale organico in cui sopravvivono bene solo i microrganismi più resistenti. Nell'ambito dei locali di servizio, i laboratori risultano mediamente più contaminati rispetto ai livelli attesi, probabilmente in conseguenza del fatto che le analisi su campioni di refluo vengono spesso effettuate senza l'ausilio di cabine microbiologiche di sicurezza e, di conseguenza, la contaminazione conseguente alla manipolazione del campione può diffondersi nell'ambiente ed essere un fattore di pericolo per gli addetti. Nei locali spogliatoio è stata frequentemente rilevata la presenza di indicatori di contaminazione fecale, spesso a fronte di valori medi di CBT piuttosto contenuti; dei motivi che comportano la contaminazione di questi locali si è già parlato in precedenza, ma è possibile aggiungere che un'altra fonte di potenziale contaminazione sono le finestre che vengono aperte, soprattutto in estate, per fare fuoriuscire il vapore originatosi dalle docce. Rassicurante è il dato relativo agli uffici ed alle officine meccaniche, locali che spesso si trovano in vicinanza delle varie stazioni del ciclo di depurazione e risultano comunque puliti a dimostrazione del fatto che porte e finestre chiuse costituiscono una efficace barriera alla diffusione della contaminazione.

Nell'ambito delle vasche di ossidazione, un'indagine effettuata a livello strutturale ha dimostrato, ancora una volta, come l'influenza dei fattori impiantistici sia determinante per il contenimento della contaminazione. In Tabella 4 è possibile vedere come i valori di carica microbica originati da vasche caratterizzate da sistemi di aerazione turbolenta, quali le turbine superficiali, siano nettamente superiori a quelli prodotti da impianti ossigenati mediante microbolle o altri sistemi a bassa turbolenza.

Tabella 4. Confronto tra i risultati conseguiti da vasche di ossidazione dotate di diversi sistemi di aerazione

Turbolenza	CBT	Coliformi Fecali	Streptococchi Fecali	Salmonella spp.	Gram negativi	Muffe	Livello di contaminazione
ELEVATA	3686	18	26	0,4	4964	2930	4,0
BASSA	1674	2	6	0,0	2067	3192	2,2

Di queste evidenze si dovrebbe tener conto in sede di progettazione degli impianti di depurazione in quanto la scelta, inizialmente più onerosa, di un sistema di aerazione a microbolle può ripagare sia in materia di sicurezza dei lavoratori, che in termini economici escludendo il ricorso a successivi interventi strutturali per contenere la diffusione dell'aerosol.

3.2 Evidenze relative all'analisi dei campionatori personali

La Tabella 5 riassume come sono percentualmente distribuiti i prelievi di CP applicati nell'ambito delle varie mansioni che interessano gli impianti di depurazione studiati.

Tabella 5. Distribuzione percentuale tra le varie mansioni di CP prelevati nel corso dello studio.

Mansione	%
Turnista	47,8
Laboratorista	11,8
Scarico autobotti	10,3
Capo impianto	8,1
Manutentore	7,3
Meccanico	3,8
Addetto nastropresse	1,5
Altro	9,4

Come per gli aerosol, è stato dato ampio spazio a quelle mansioni ritenute più a rischio, seguendo, comunque, anche un criterio legato al numero di addetti che svolgono una data mansione; ciò spiega le basse percentuali di meccanici ed addetti alle nastropresse, poiché è raro trovare addetti che eseguano esclusivamente questa mansione. Ampio spazio è stato dedicato anche alle attività di servizio, quale il laboratorista, così come si è voluto valutare il rischio cui sono esposte mansioni il cui compito è solo di supervisione, quale il capo impianto. Quest'ultima mansione, non comportando operazioni di tipo manuale e, di conseguenza, rischio di insudiciamento per contatto, funge da indicatrice riguardo ai livelli di esposizione

cui sono soggetti eventuali visitatori o personale esterno che si trovi ad operare sull'impianto; come è possibile dedurre dalla Tabella 6, che riporta le medie dei valori microbiologici rilevati, i livelli di contaminazione microbica riferibili a questa mansione, oltre ad essere pienamente accettabili, sono anche i più bassi tra le attività investigate.

Tabella 6. Medie dei valori microbiologici rilevati sui CP. I valori sono espressi come UFC/cm²; in grassetto i valori più elevati. La colonna dei livelli di contaminazione verrà discussa al paragrafo 3.4.

Mansione	CBT	Coliformi Fecali	Streptococchi Fecali	Gram negativi	Muffe	Livello di Contaminazione
Turnista	823	4	23	321	73	1,8
Capo impianto	92	0	0	5	2	1,0
Scarico autobotti	218	0	1,9	285	47	1,5
Laboratorista	508	0,3	9	308	52	1,7
Meccanico	313	0	0	444	52	1,4
Manutentore	163	0	8,5	272	41	1,4
Addetto nastropresse	138	0	0	64	19	1,0
Media campioni	788	2	11	384	67	1,6

Dall'analisi della Tabella 6 risulta evidente come la mansione di turnista, addetto generico alla gestione dell'impianto, sia quella maggiormente esposta alla contaminazione degli indumenti; il risultato è facilmente spiegabile andando ad esaminare le operazioni svolte dagli addetti nel corso della giornata lavorativa, in quanto è frequente che essi si trovino ad operare in aree fortemente contaminate, ad eseguire interventi su superfici sporche, oppure che siano soggetti a schizzi durante operazioni di lavaggio con acqua a pressione. Il risultato riguardante la figura del laboratorista correla con quanto emerso dall'analisi degli aerosol dei laboratori: il dato è riconducibile alla manipolazione di materiale contaminato in assenza di attrezzature in grado di contenere la diffusione degli aerosol. Ad eccezione di alcuni casi, nell'ambito delle altre mansioni i valori medi sono piuttosto contenuti e, spesso, gli indicatori di contaminazione fecale risultano assenti.

Dai risultati si può anche evincere come un solo turno lavorativo sia, in alcuni casi, sufficiente per sporcare in maniera significativa gli indumenti da lavoro: tale osservazione è risultata di notevole ausilio alle Aziende partecipanti al progetto al fine di determinare la frequenza di ricambio degli indumenti che, talvolta, risultava non adeguata.

3.3 Analisi statistica dei risultati

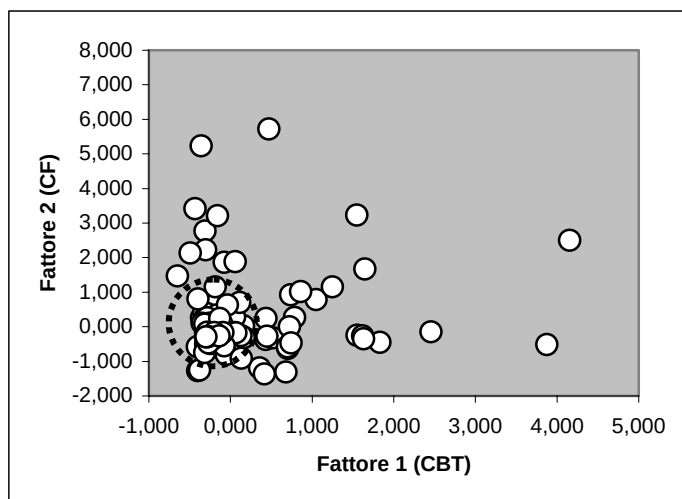
L'analisi chemiometrica dei risultati ha permesso di evidenziare che realtà così complesse ed eterogenee come quelle degli impianti di trattamento reflui, rispondono a regole comuni: questo è stato il risultato più importante che ha confermato l'intuizione iniziale e ha permesso di costruire un metodo oggettivo per la VRB. Un importante risultato ottenuto dalle elaborazioni statistiche è stato anche quello di evidenziare, sia per gli aerosol che per i CP, una strettissima e costante correlazione tra i risultati conseguiti dai due tipi di CBT (a 22°C e 36°C) ricercate nelle fasi iniziali dello studio. Infatti, all'analisi chemiometrica è apparso da subito evidente come il risultato conseguito dalla ricerca di uno dei due parametri consentisse di prevedere l'andamento dell'altro: tale evidenza ha permesso di interrompere la ricerca della CBT a 22°C con un notevole risparmio di risorse economiche e umane. Un risultato analogo è stato conseguito elaborando i dati riferiti ad altri due parametri, i CF ed i Coliformi Totali (CT).

La scelta dei parametri da confermare nel protocollo di indagine è stata effettuata sulla base di considerazioni fisio-patologiche, in quanto la CBT a 36°C è rappresentativa di microrganismi che possono crescere alla temperatura del corpo umano, mentre nell'ambito dei batteri coliformi i CF sono più rappresentativi di contaminazione umana rispetto ai CT che possono avere anche altre origini. Altre correlazioni sono emerse occasionalmente nel corso della ricerca, ma riguardavano sempre situazioni o ambienti particolari da cui non era possibile trarre regole generali, né indicazioni di particolare utilità. Contrariamente a quanto riportato da altri Autori [4], nessuna correlazione è mai emersa tra i parametri microbiologici e quelli meteo-climatici presi in esame: tale risultato è probabilmente da collegare alla notevole variabilità degli ambienti esaminati ed alla prevalenza dei fattori impiantistici, che riescono ad influenzare il sistema in misura maggiore, rispetto ai fattori ambientali che svolgono un ruolo importante nei "sistemi naturali".

L'elaborazione multifattoriale dei dati mediante la tecnica PCA ha consentito di evidenziare che realtà molto eterogenee, caratterizzate da una notevole variabilità per soluzioni impiantistiche, dimensioni, tipologia dei reflui trattati, abitudini lavorative, seguono comunque, in termini microbiologici, una "regola"

generale che le accomuna. Tale fenomeno appare in tutta la sua pienezza quando si proiettano in un grafico cartesiano i risultati dell'elaborazione mediante PCA in modo da valutare il comportamento di ciascun caso nei confronti dei parametri indagati (Figura 1).

Figura 1. Rappresentazione grafica dei risultati dell'elaborazione in PCA della totalità dei campioni di aerosol prelevati durante il progetto di ricerca. Ciascun caso (ambiente) è rappresentato da un punto bianco.



L'area racchiusa nel cerchio tratteggiato è quella del cluster principale che comprende circa il 90% dei casi esaminati. Come detto in precedenza, il grafico riportato in Figura 1 riguarda la totalità dei campioni, ma anche andando ad analizzare i risultati delle elaborazioni riguardanti le singole stazioni (es. vasche di ossidazione) si evidenzia sempre l'esistenza di un grappolo principale che racchiude quelle che, a nostro avviso, possono essere definite "situazioni normali", in quanto più usuali, in riferimento alle realtà in oggetto. I casi che emergono dal cluster sono caratterizzati da una criticità legata a valori anormali di uno o più parametri microbiologici indagati. Un vantaggio di questo tipo di rappresentazione grafica emerge soprattutto quando si vanno a studiare singolarmente le varie stazioni, in quanto consente di mostrare, alle aziende partecipanti allo studio, dove si vanno a collocare i propri ambienti di lavoro rispetto a quelli degli altri partecipanti (peraltro presentati in forma anonima), offrendo loro la possibilità di un confronto con realtà simili caratterizzate dalle stesse problematiche e uno strumento univoco per giudicare oggettivamente la propria realtà in termini di sicurezza sul luogo di lavoro.

3.4 Interpretazione biologica dei risultati analitici

Nel corso degli anni di svolgimento del progetto Bionet626, la gran mole di dati analitici entrati a far parte del database ha permesso di elaborare ed affinare una Scala di Valutazione del livello di Contaminazione microbica (SVC) degli aerosol presi in esame. Tale scala, strutturata su considerazioni di microbiologia clinica ed ambientale supportate dalle evidenze emerse in seguito alle elaborazioni statistiche, permette di quantificare il livello di contaminazione (LC) relativo a ciascun ambiente studiato. La scala offre un criterio di misura della contaminazione e, di conseguenza, fornisce uno strumento che risponde in maniera concreta alle esigenze che emergono durante la stesura di una VRB, associando le potenziali fonti di pericolo ad un giudizio che ne riassume un adeguato livello di attenzione. La classificazione gerarchica degli ambienti risulta un elemento indispensabile alla redazione di un documento che deve tenere conto delle evidenze emerse dalle indagini ambientali e coniugarle a quelle riguardanti le procedure di lavoro, di sicurezza e di protezione esistenti in ciascuna azienda.

Per formulare la SVC è stato ritenuto scientificamente valido un approccio all'interpretazione dei risultati ottenuti nel corso del progetto che parta da quegli indicatori che più degli altri possono funzionare come elemento di confronto: le CBT. I livelli di contaminazione generica, evidenziati dalla CBT, pur non rivestendo nessun ruolo di indicatore per la eventuale presenza di patogeni, possono comunque fornire uno strumento di valutazione preliminare dei risultati ottenuti. Esiste, infatti, una gran mole di dati di letteratura riguardanti la salubrità degli ambienti determinata in base ai valori di CBT: seppure talvolta i dati siano contrastanti tra loro, la maggior parte degli Autori sembra concorde sul fatto che un ambiente possa essere considerato salubre quando tali valori non superano le 500-1000 UFC/m³. Vari Autori individuano come accettabili, per ambienti particolari come le sale parto, il nido per lattanti e le sale operatorie dei Pronto Soccorso, valori di CBT di 70 [5] oppure 125 UFC/m³ [6]. Per un impianto di depurazione un primo

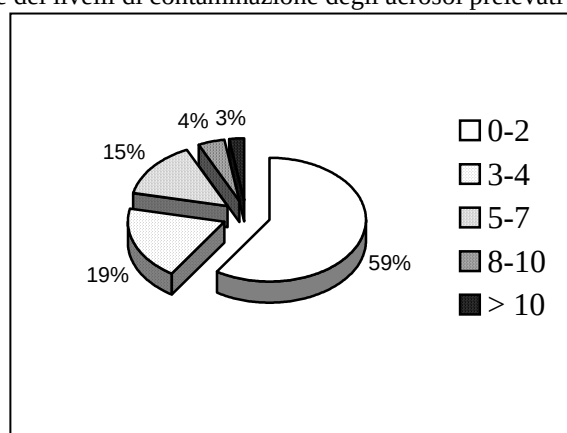
ragionevole valore soglia lo si può individuare intorno a 1000 UFC/m³, ritenendo di buona qualità l'aria contenente 1000 microrganismi riconducibili esclusivamente ad una carica microbica non specifica e tollerabili valori che non superino le 5000 UFC. Questo primo tipo di approccio può essere utilizzato quando la CBT sia il solo parametro microbiologico indagato. In presenza di altre parametri è possibile un approccio più complesso che permetta di integrare tutti i risultati ottenuti. Un passo avanti è rappresentato dalla combinazione di valori crescenti di CBT alla presenza di indicatori di contaminazione fecale aerodispersa. Come già accennato in Tabella 1, la presenza di tali indicatori può significare un pericolo di esposizione a patogeni di origine fecale e, di conseguenza, comporta un aggravamento della contaminazione di base rappresentata dalla CBT. Per gli stessi motivi la presenza di un patogeno quale la *Salmonella* viene considerata assai più grave di quella degli indicatori. Il passaggio successivo è stato quello di considerare gli effetti legati alla presenza di microrganismi in grado di causare reazioni allergiche: il valore additivo di 1 punto, individuato alla soglia di 1000 UFC/m³ per gli stessi batteri Gram Negativi e per le Muffe, è legato alle proprietà allergeniche di questi microrganismi. Il valore "soglia" di 7.000 UFC/m³ di Gram Negativi, per il quale viene attribuito un valore additivo di 3 punti, corrisponde a 30 ng/m³ di endotossine ed è stato scelto sulla base dell'unico caso a noi noto in cui la letteratura scientifica proponga un limite espositivo per parametri biologici nell'ambito delle otto ore lavorative [7].

Tabella 7. Scala di valutazione del livello di contaminazione degli aerosol

Livello di contaminazione microbica	Valore
Solo Carica Batterica Totale (CBT) <500 UFC/m ³	0
Solo 500<CBT<1000	1
Solo 1000<CBT<5000	2
CBT < 500, presenti anche coliformi o streptococchi fecali	3
Solo CBT >5000	4
500<CBT <1000, presenti anche coliformi o streptococchi fecali	4
1000<CBT<5000, presenti anche coliformi o streptococchi fecali	5
CBT >5000, presenti anche coliformi o streptococchi fecali	7
Presenza di microrganismi patogeni (es. <i>Salmonella</i> spp.)	9
Fattori additivi	Valore
Muffe > 1000 UFC/m ³	+ 1
Gram Negativi > 1000 UFC/m ³	+ 1
Gram Negativi > 7000 UFC/m ³	+ 3

Sulla base della Tabella 7 è stato possibile classificare i risultati analitici riferibili a tutti gli aerosol campionati sugli impianti da noi studiati. Per quanto detto in precedenza, giudicando *accettabile* una contaminazione inferiore a 2 punti della SVC, appare evidente dalla Figura 2 come circa il 60% degli aerosol analizzati meriti questo giudizio. Lo scenario che ne deriva appare quindi assai meno drammatico di quanto teoricamente ci si potrebbe aspettare da attività produttive che comportano la depurazione di acque reflue.

Figura 2. Distribuzione dei livelli di contaminazione degli aerosol prelevati nel corso dello studio.



Per capire meglio il risultato ottenuto è necessario, comunque, analizzare i contributi dei singoli ambienti facenti parte degli impianti di depurazione, come mostrato in Tabella 8.

Tabella 8. Percentuale di casi di contaminazione accettabile per i singoli ambienti

Ambienti	Percentuale casi accettabili
Officine meccaniche	100,0
Uffici	100,0
Aree consumo alimenti	81,3
Stazioni scarico autobotti	78,3
Spogliatoi	70,4
Laboratori	68,4
Stazioni ingresso impianto	54,5
Trattamento fanghi	44,2
Vasche di ossidazione	44,1

L'andamento dei vari ambienti ricalca quello delle medie dei risultati microbiologici e altro non potrebbe essere dal momento che la SVC è sviluppata a partire da quei valori. Questa coincidenza di conclusioni potrebbe trarre in inganno e far sorgere dubbi sull'effettiva utilità della SVC: ricordiamo che le potenzialità dello strumento da noi sviluppato si esplicano soprattutto nella collocazione relativa dei singoli casi e nell'esprimere dei livelli quantitativi di contaminazione; per ovvi motivi la presente trattazione si limita agli aspetti generali senza poter scendere in maggiore dettaglio.

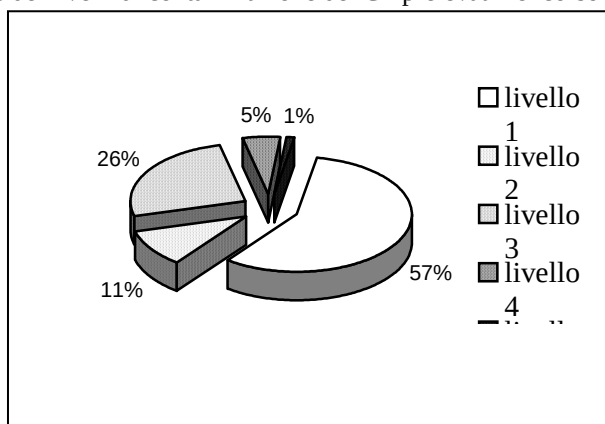
Analogamente a quanto fatto per gli aerosol, è stata sviluppata una Scala di Giudizio Qualitativo anche per i CP (Tabella 9).

Tabella 9. Scala di Giudizio Qualitativo dei CP.

Scala di Giudizio	Livello
CBT, GN o Muffe < 1000	1
CBT, GN o Muffe >1000	2
Presenza di contaminanti fecali	3
Alti valori di fecali (>100 UFC/cm ²)	4
Presenza di patogeni	5

La successiva Figura 3 mostra la distribuzione dei LC dei CP prelevati durante la ricerca: l'andamento è molto simile a quello degli aerosol, con il 57% di casi *accettabili* (livello 1) e pochi casi contaminati a livelli elevati.

Figura 3. Distribuzione dei livelli di contaminazione dei CP prelevati nel corso dello studio.



Ritenendo *accettabili* anche quei campioni di Livello 2, caratterizzati da CBT, GN o Muffe superiori alle 1000 UFC/cm² ma privi di contaminanti fecali e patogeni, la percentuale di casi accettabili sale addirittura al 68%. La Tabella 10 riporta la percentuale di casi accettabili nell'ambito delle varie mansioni lavorative; da notare che tale percentuale è sempre superiore al 53% con punte del 90% per capi impianto e manutentori. Anche in questo caso l'andamento ricalca quanto emerso dai valori microbiologici medi di Tabella 6; nella stessa tabella è possibile rilevare come i LC medi di tutte le mansioni siano compresi tra 1,0 ed 1,8.

Tabella 10. Percentuale di casi di contaminazione accettabile per le singole mansioni

Mansione	Percentuale casi accettabili
Capo impianto	90,0
Manutentore	80,0
Addetto nastropresse	80,0
Laboratorista	62,5
Meccanico	60,0
Scarico autobotti	57,1
Turnista	53,4

Le difficoltà di valutare in termini quantitativi il livello di rischio a cui sono esposti i lavoratori che operano nel settore ambientale, ove sia possibile un'esposizione a microrganismi e loro prodotti, risiedono da una parte nella mancanza di limiti di esposizione, dall'altra, nell'enorme variabilità degli agenti biologici presenti, sia in termini di tipologia che come concentrazione nel tempo e nei diversi ambienti. Da ciò scaturisce la difficoltà di esprimere con certezza un "limite di esposizione" utile a fornire uno strumento prevenzionistico per tutte quelle situazioni definibili a "rischio", di cui non si conosca a fondo l'entità e, di conseguenza, la gravità. L'individuazione di una tecnica appropriata per una corretta interpretazione dei risultati ha fornito il valido supporto per l'ottenimento di risultati gestibili e utilizzabili per una stima del RB. Riguardo alla SVC, lo strumento da noi allestito ha il pregio di integrare i dati relativi a tutti i parametri microbiologici, coniugando il peso dei singoli elementi anziché limitarsi a prendere in considerazione le singole specie microbiche ed i relativi limiti espositivi. Tale strumento ha rivelato notevoli potenzialità in sede di stesura dei documenti di VRB in quanto ha permesso di catalogare le varie aree degli impianti in base agli effettivi LC, che si sono dimostrati un utile supporto nel valutare le aree difficilmente classificabili su base teorica. Se l'impatto biologico di una vasca di ossidazione dotata di turbine superficiali risulta facilmente prevedibile lungo il suo perimetro, è pressoché impossibile prevedere teoricamente quanto la contaminazione da essa generata si diffonda alle altre aree dell'impianto; la SVC da noi sviluppata costituisce un valido strumento alternativo ad una soluzione estrema, quale quella suggerita da alcuni Autori, di classificare l'intero impianto come possibile oggetto di contaminazione biologica aerodispersa.

3.5 Effetti della stagionalità sui livelli di contaminazione

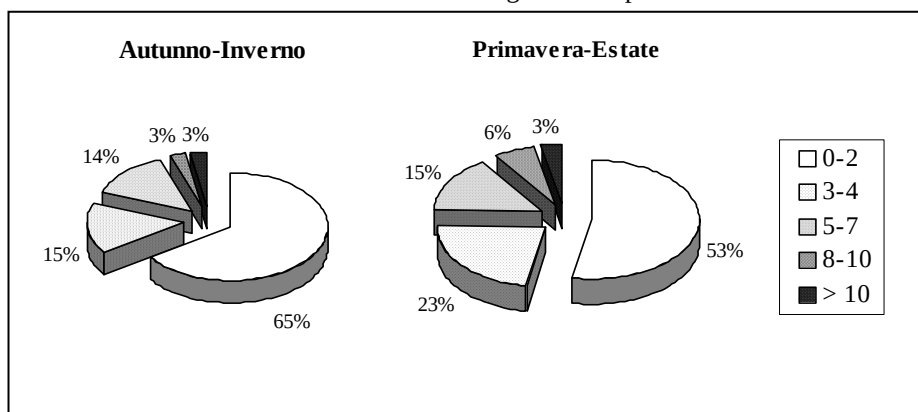
Un ultimo aspetto emerso durante l'analisi dei risultati è quello legato all'effetto del clima sulla contaminazione ambientale. I test di igiene indicano il periodo caldo come il più favorevole per l'insorgenza di malattie infettive a ciclo oro-fecale; tra le varie spiegazioni di questo fenomeno c'è anche la teoria per cui nel periodo caldo-umido la sopravvivenza dei patogeni risulta favorita dalle alte temperature, simili a quella del loro habitat. Tale ipotesi sembra essere confermata dai dati raccolti nel presente studio e riassunti nel presente paragrafo.

Tabella 11. Valori medi dei parametri microbiologici riferiti agli aerosol suddivisi in base al periodo del campionamento.

Periodo di campionamento	CBT	Coliformi Fecali	Streptococchi Fecali	Gram negativi	Muffe	Temperatura	Livello di contaminazione
PRIMAVERA-ESTATE	2337	8	35	2831	2490	26,1	3,0
AUTUNNO-INVERNO	1391	6	22	2047	1130	16,5	1,9

Dalle medie riportate in Tabella 11 potrebbe sembrare che la contaminazione dell'aerosol sia quasi equamente distribuita tra stagione calda e stagione fredda. Tale risultato è dovuto ad alcuni campioni con valori di carica microbica molto elevati che si ripercuotono sulle medie del periodo invernale rendendole paragonabili a quelle del periodo estivo; osservando le medie dei LC emerge che l'aerosol prelevato nel periodo caldo è mediamente assai più critico a causa di una maggior presenza di specie microbiche potenzialmente patogene, le quali sopravvivono meglio in condizioni di temperature più vicine a quelle del corpo umano. Tutto ciò si può evidenziare nei grafici (Figura 4) che riportano la suddivisione percentuale dei LC, derivanti dalla SVC, tra stagione calda e fredda: nella statistica riguardante il periodo primavera-estate i casi pienamente accettabili risultano il 53% contro il 65% del periodo autunno-inverno.

Figura 4. Distribuzione dei livelli di contaminazione tra gli aerosol prelevati nel corso dell'anno

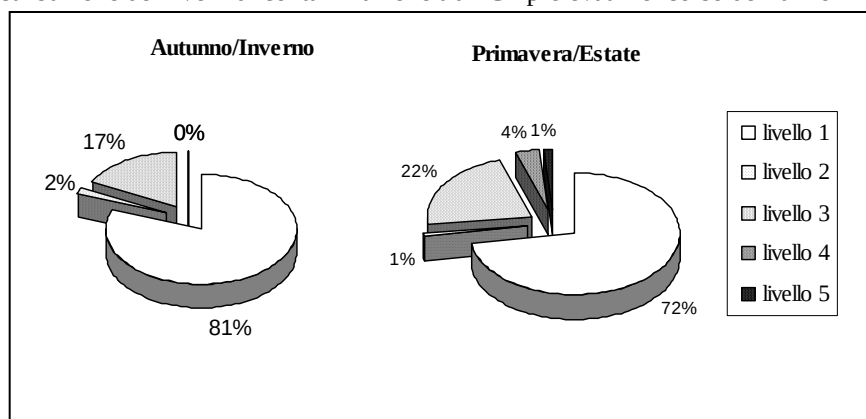


Le stesse considerazioni emergono dai CP dove differenze tra i due periodi appaiono ancor meno marcate rispetto agli aerosol (Tabella 12). Andando ad analizzare il dettaglio dei LC (Figura 5) risulta evidente, anche per questa matrice, come il periodo caldo sia caratterizzato da un minor numero di casi accettabili e un 5% di casi classificabili con i LC 4 e 5, livelli mai riscontrati nel periodo più freddo.

Tabella 12. Valori medi dei parametri microbiologici riferiti ai CP suddivisi in base alla data di campionamento

Periodo di campionamento	CBT	Coliformi Fecali	Streptococchi Fecali	Gram negativi	Muffe	Ore di esposizione	Livello di contaminazione
PRIMAVERA-ESTATE	322,2	0,1	2,7	263,2	40,4	5,1	1,4
AUTUNNO-INVERNO	182,1	0,1	0,8	132,5	61,0	4,9	1,2

Figura 5. Distribuzione dei livelli di contaminazione tra i CP prelevati nel corso dell'anno



4. CONCLUSIONI

La Valutazione del Rischio Biologico affrontata con sistemi convenzionali presenta notevoli elementi di imbarazzo per la esistenza di numerose situazioni non codificate e poco note al mondo scientifico.

Il quadro si può paragonare in qualche modo alla situazione di un medico che avesse un solo paziente da curare; ad esso potrebbe dedicare moltissime attenzioni, ma non riuscirebbe a dare interpretazione dei sintomi premonitori se non avesse almeno la possibilità di elementi di riferimento costituiti da numerosi altri pazienti, i cui comportamenti siano stati studiati con la finalità di codificarli per ricavarne indicazioni di tipo generale, utilizzabili per l'interpretazione dei singoli casi.

Per il positivo svolgimento del suo ruolo il medico può trarre elementi ed informazioni da un mondo scientifico che è in grado di supportarlo, spesso in maniera più che esauriente.

La novità del "sistema" BIONet626 consiste nell'aver creduto nella necessità di uscire dagli schemi convenzionali che vogliono i fenomeni di esposizione ad agenti biologici sfuggire, per lo più, a possibilità di modellizzazione e razionalizzazione.

Un approccio di tipo sistematico al monitoraggio biologico di un singolo impianto, basato sulla ripetizione, con elevata frequenza, di un elevato numero di determinazioni analitiche per la ricerca ed il dosaggio di svariate specie sarebbe risultato impraticabile sotto il profilo economico, e poco efficace in mancanza di altri termini di riferimento.

Le problematiche di cui si occupa BIONet626 sono legate a situazioni in cui l'esperienza scientifica, manca di elementi di verifica sul campo e richiede quindi di essere ampliata applicando, in maniera mirata e razionale, metodologie di indagine adatte a realizzare una significativa crescita dello status conoscitivo.

BIONet626 supera le difficoltà suddette e si dimostra una metodologia capace di fornire risposte efficaci ed adeguate rispetto alle esigenze normative.

In aggiunta attraverso le sue componenti culturali, tecniche ed operative già ampiamente comprovate, il progetto ha dimostrato di poter fornire utili elementi per una gestione più sensibile e consapevole delle attività di depurazione acque per quanto riguarda gli aspetti igienico-sanitari e di sicurezza.

5. ELENCO ABBREVIAZIONI

RB	Rischio Biologico	CF	Coliformi Fecali
VRB	Valutazione del Rischio Biologico	CT	Coliformi Totali
APT	Acqua Peptonata Tamponata	SF	Streptococchi Fecali
PC	Plate Count Agar	PCA	Principal Component Analysis
CP	Campionatori Personali	LC	Livello di Contaminazione
UFC	Unità Formanti Colonia	SVC	Scala di Valutazione del livello di Contaminazione microbica
CBT	Carica Batterica Totale		
GN	Batteri Gram Negativi		

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bernagozzi M., Maccolini R., Romano G.C., Stampi S., Tonelli E., Ricerche sull'aerodiffusione microbica di un impianto di depurazione ossidativi di liquami urbani: rapporti con i fattori meteorologici, *Igiene e Sanità Pubblica*, pp.193-210 (1984)
- [2] Carducci A., Rischio biologico aerodisperso nelle aree degli impianti di depurazione: stato dell'arte e misure di tutela, *Rivista Italiana d'Igiene*, n° 5-6 (2001)
- [3] Vazzoler M., Rischio biologico aerodisperso negli impianti di depurazione. Strategie di campionamento nella valutazione del rischio biologico in impianti di depurazione, *Rivista Italiana d'Igiene*, vol.61, pp. 103-112 (2001)
- [4] Teltsch, B., Katzenelson, E. Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 35 pp. 290-296 (1978)
- [5] Jensen P.A., Todd W.F., Davis G.N., Scarpino P.V., Evaluation of Eight Bioaerosol Sampler Challenged with Aerosol of Free Bacteria, *American Industrial Hygiene Association*, 53 (10), pp.660-667 (1992)
- [6] Orpianesi C., Cresci A., La Rosa F., Saltalamacchia G., Tarsi R., Valutazione dell'inquinamento microbico in un ambiente ospedaliero. Confronto tra il sistema S.A.S. (Surface Air System), *Nuovi Annali di Igiene e Microbiologia*, vol. 34, pp. 171-185 (1983)
- [7] Laitinen S., Nevalainen A., Kotimaa M., Liesivuori J., Martikainen P.J., Relationship between Bacterial Counts and Endotoxin Concentrations in the Air of Wastewater Treatment Plants, *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 3774-3776 (1992)

7. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano vivamente tutte le Aziende che hanno creduto nel presente studio ed hanno permesso che un Progetto nato con grandi ambizioni sia potuto diventare una concreta realtà. Il ruolo delle Aziende partecipanti è stato tutt'altro che passivo e senza la positiva collaborazione di persone che da molti anni vivono, conoscono ed amano il loro lavoro, difficilmente i risultati conseguiti avrebbero raggiunto un tale livello di concretezza e di effettiva utilità pratica.