Università degli Studi di Torino
Dipartimento di Scienze della Sanità
Pubblica e Pediatriche

INAIL
DIREZIONE REGIONALE
PIEMONTE

Anaerobic Digestion *Green Jobs*: Biological Risk Assessment

Documento di indirizzo

La presente pubblicazione è stata prodotta dal Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche (DSSPP), Sezione di Igiene, dell'Università degli Studi di Torino (UNITO) su incarico della Direzione Regionale INAIL Piemonte.

Responsabile Scientifico

Giorgio Gilli	Professore Ordinario di Igiene	**DSSPP-UNITO**

Referente INAIL

Alessandra Lanza	Direttore Regionale	**INAIL Piemonte**

Tavolo Tecnico di Coordinamento Tecnico-Scientifico:

Raffaella Degan	Tecnico della Ricerca	**DSSPP-UNITO**
Maria Gullo	Direzione Regionale	**INAIL Piemonte**
Francesca Filippi	Medico del Lavoro	**INAIL Piemonte**
Deborah Traversi	Professore Associato di Igiene	**DSSPP-UNITO**

Collaboratori:

Elisa Anedda	Borsista	**DSSPP-UNITO**
Antonino Bertino	Tesista LM SPSSP*	**DSSPP-UNITO**
Giulia Carletto	Borsista	**DSSPP-UNITO**
Stefania Fornasero	Assegnista di Ricerca	**DSSPP-UNITO**
Ilaria Gorrasi	Tecnico della Ricerca	**DSSPP-UNITO**
Cristina Pignata	Tecnico della Ricerca	**DSSPP-UNITO**
Maria Rosaria Sardella	Direzione Regionale	**INAIL Piemonte**
Greta Vercellino	Borsista	**DSSPP-UNITO**

E' vietata riproduzione integrale e/o parziale anche in formato elettronico senza autorizzazione scritta dell'Università di Torino e di INAIL Piemonte.

Un sentito ringraziamento alle aziende partecipanti.

Pubblicazione: luglio 2017

* Scienze delle Professioni Sanitarie e della Prevenzione

Premessa

Nel contesto europeo ed internazionale prendono corpo le problematiche relative alla diffusione dei "lavori verdi" che seguono la diffusione e l'incentivazione delle produzioni ecosostenibili, richieste dalla programmazione energetica internazionale e necessarie al fine di raggiungere gli ambiziosi obiettivi di sostenibilità ambientale essenziali al sostentamento dell'equilibrio sul nostro pianeta. L'approfondimento delle conoscenze sulle principali cause d'inquinamento ambientale e del relativo impatto sulla salute, attribuisce alla produzione di energia attraverso l'impiego di combustibili fossili, una rilevante responsabilità. D'altra parte, altra priorità ambientale è la riduzione dei rifiuti e degli scarti di produzione, così come l'individuazione di percorsi alternativi ed ecosostenibili per il loro smaltimento. Le aziende che operano nella "*Green Economy*" cercano di trovare soluzioni a queste priorità attraverso la conduzione di una attività imprenditoriale redditizia tale da garantire un numero sempre crescente di posti di lavoro. A livello globale si stimano circa 10 milioni di lavoratori impiegati nella produzione di energia rinnovabile dei quali circa 350.000 nella produzione di biogas[1]. In Italia la crescita della produzione di biogas è stata rilevante negli ultimi 10 anni, in particolare, il numero degli impianti è aumentato, superando le 1500 unità produttive[2] e la produzione in termini di biogas prodotto è cresciuta del 500% nell'arco di tempo che va dal 2007 al 2015. Il 75% degli impianti di digestione anaerobica è collocato in 4 regioni del Nord Italia: Lombardia, Emilia Romagna, Veneto e Piemonte. A seguito di un progetto pilota, terminato nel 2014, a livello nazionale, coordinato da INAIL e finanziato dal Centro Nazionale per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM)[3], in Piemonte si è deciso di approfondire una specifica tematica: la gestione del rischio biologico per i lavoratori impiegati negli impianti di digestione anaerobica. Il problema è tendenzialmente sottostimato ed i dati relativi alla sorveglianza, al momento, non sono in grado di descriverne l'impatto sulla salute. Al fine di implementare la conoscenza e fornire degli strumenti gestionali, potenzialmente utili sia alle aziende che agli addetti al controllo, è stato condotto il presente lavoro, in collaborazione tra INAIL Piemonte ed Università degli Studi di Torino. In particolare, l'INAIL Piemonte ha sovvenzionato al 50% il progetto stesso, oltreché collaborare alla sua espletazione. E' possibile stimare che i lavoratori potenzialmente esposti a rischio biologico negli impianti di digestione anaerobica piemontesi siano circa 800. Il presente documento fornisce ed organizza delle informazioni fondamentali per la valutazione e gestione dei rischi per la salute dei lavoratori connessi all'inquinamento dell'aria da bioaerosol e polveri negli impianti di

digestione anaerobica, inoltre fornisce delle indicazioni tecniche per orientare le azioni di prevenzione e controllo di tali rischi.

Con il documento di indirizzo si è inteso da un lato promuovere la conoscenza sulla presenza e persistenza del rischio biologico nel settore e dall'altro proporre una metodologia e degli strumenti per implementare la valutazione del rischio biologico e raggiungere un'ottimale gestione del rischio.

Il Documento di Indirizzo elaborato si propone di:

- fornire una rassegna delle condizioni che determinano esposizione a bioaerosol e polveri inalabili aero-disperse, con analisi dei principali fattori di rischio;
- evidenziare le situazioni che possono determinare il miglioramento dell' esposizione;
- fornire uno strumento gestionale utile sia alle aziende che agli enti deputati al controllo per la valutazione del rischio biologico;
- fornire una serie di indicazioni tecniche e linee di intervento da mettere in atto per i rischi per la salute.

La realizzazione di questo progetto è stata possibile attraverso una stretta interazione sia tra le diverse istituzioni pubbliche, coinvolte a diverso titolo, nella tutela della salute negli ambienti di vita e di lavoro sia con le aziende che hanno partecipato volontariamente ed attivamente al progetto.

La sostenibilità nelle sue declinazioni, ambientale, economica, sociale, è un obiettivo difficile ma raggiungibile. Questa esperienza testimonia la possibilità di realizzarla, a partire da esperienze e capacità maturate localmente.

Indice

1. INTRODUZIONE 6
1.1. Il modello Green Jobs 6
1.2. Digestione anaerobica e produzione di biogas 6

2. VALUTAZIONE DEL RISCHIO 7
2.1. Rischio biologico 7
2.2. Bioaerosol 9
2.3. Fasi a rischio e vie di esposizione 10
2.4. Metodi di valutazione del rischio biologico 10
2.5. Scopo del lavoro e fasi di progetto 12
2.6. Monitoraggi: Materiali e metodi 13
2.7. Monitoraggi: Risultati 19

3. RISCHIO BIOLOGICO 30
3.1. Matrice dei rischi 30
3.2. Gestione del rischio biologico 37

4. CONCLUSIONI 41

5. BIBLIOGRAFIA 48

1. INTRODUZIONE

1.1. Il modello *Green Jobs*

Il termine *Green Job* si riferisce a tutti i settori occupazionali che, nell'ambito dell'agricoltura, della zootecnia, del manifatturiero, della ricerca e sviluppo, dell'amministrazione e dei servizi, contribuiscono in maniera incisiva a preservare o restaurare la qualità ambientale[4].

I settori afferenti al comparto dei *Green Jobs* risultano essersi formati, nella maggior parte dei casi, dalla riconversione di attività pre-esistenti, quali il settore zootecnico, agricolo, agroalimentare e di gestione dei rifiuti organici a cui sono state fornite finalità differenti a seconda delle diverse tecnologie applicate. Il crescente interesse verso queste applicazioni è stato influenzato dall'aumento dei prezzi dell'energia e delle materie prime, producendo una maggiore pressione nel rendere "verdi" molti aspetti dell'economia e del mercato del lavoro e nell'adottare pratiche e metodi di produzione ecologici che agevolassero la riduzione del riscaldamento globale. Lo sviluppo di mercati con costi energetici minori e gli incentivi per una rivoluzione verde dell'economia porterebbero a ridurre le disuguaglianze attuali dovute al limitato accesso alle fonti energetiche.

Nell'ambito delle strategie europee di incentivo della *Green Economy*, la "Strategia Europa 2020" prevede importanti obiettivi in materia di cambiamenti climatici e produzione di energia ed, in particolare, la riduzione del 20% delle emissioni di gas a effetto serra, l'aumento del 20% del consumo di energia ricavata da fonti rinnovabili ed infine l'aumento del 20% dell'efficienza energetica[5.]

L'introduzione di nuove biotecnologie potrebbe rappresentare un mezzo per ottenere un minor consumo di risorse non rinnovabili, ridurre le emissioni di CO_2 e diminuire la produzione di materiali di scarto[6].

1.2. Digestione anaerobica e produzione di biogas

Tra le biotecnologie sviluppate riconducibili alle categorie dei *Green Jobs*, una delle più rilevanti in termini di occupazione è la digestione anaerobica utilizzata per la conversione di biomasse, precedentemente classificate come scarti produttivi e/o rifiuti, in biogas.

Con il termine digestione anaerobica di biomasse si intende quel processo di degradazione della materia organica operata da microrganismi in condizioni di anaerobiosi, ovvero in assenza di ossigeno[7] o in condizioni di microaerofilia[8].

Il biogas è una miscela costituita per il 50-80% circa da metano[9], unitamente ad anidride carbonica, ossigeno, azoto, idrogeno libero e solforato ed altri componenti in traccia[10,11].

La digestione anaerobica è stata inizialmente pensata in ambito agricolo e zootecnico soprattutto come metodo di valorizzazione dei liquami prodotti negli allevamenti zootecnici, anche in considerazione del vantaggio fornito da questa tecnologia nel controllare le emissioni maleodoranti e nello stabilizzare le biomasse prima del loro utilizzo quali fertilizzanti[3].

Le materie prime che possono essere impiegate nell'ambito del processo in questione sono: residui zootecnici e deiezioni animali, fanghi di depurazione e acque reflue urbane, scarti organici e acque reflue dell'agroindustria, prodotti alimentari e agricoli, residui colturali, foraggi, frutta e vegetali di scarsa qualità o non avviabili alla filiera alimentare, percolati da silos e paglia, oltre che la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU), colture non alimentari a uso energetico (insilati di mais e sorgo zuccherino), scarti civili e produttivi[12].

Ad oggi, si va consolidando la possibilità di trasformare il biogas in biometano (*upgrading*) che possa essere utilizzato per alimentare autoveicoli o immesso nella rete del gas, a seguito di una fase di *cleaning* secondo standard qualitativi in corso di certificazione a livello europeo. Il D.M. 5/12/2013[12] prevede che per la produzione di biometano, il biogas debba subire processi di purificazione e *upgrading*.

2. VALUTAZIONE DEL RISCHIO

2.1. Rischio biologico

I *Green jobs* che trattano biomasse nascono prevalentemente dalla riconversione di attività tradizionali a cui vengono conferite finalità differenti. Essi presentano, dunque, rischi riconducibili a settori occupazionali affini, quali il settore zootecnico, agricolo e di gestione dei rifiuti organici, ma differiscono per entità e modalità di esposizione a seconda della diversa tecnologia applicata. La loro recente introduzione non permette, inoltre, di avere accesso a dati relativi a infortuni e malattie professionali, che siano rappresentativi.

Le maggiori criticità, individuate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, riguardanti i settori occupazionali delle bioenergie sono[13]:

- condizioni di lavoro percepite come “scomode” (lavoro fisico condotto anche all’aperto, condizioni microclimatiche sfavorevoli) da parte dei lavoratori addetti alla manipolazione delle biomasse ed alla manutenzione ordinaria e straordinaria degli impianti;

- insorgenza di problemi respiratori (allergie, reazioni di ipersensibilità, decremento della funzionalità respiratoria) in seguito ad esposizione a particolato e polveri;
- condizioni legate agli impianti quali: alte temperature, rischio incendio ed esplosione;
- implicazioni per la salute prevalentemente a lungo termine per esposizione a sostanze pericolose (compresi i VOCs, H_2S e NH_3) e ad agenti biologici.

L'articolo 17 del Decreto Legislativo 81 del 2008 prevede che, tra gli obblighi del datore di lavoro non delegabili, sia inserita la valutazione di tutti i rischi lavorativi a cui il lavoratore può andare incontro durante l'espletamento della normale attività lavorativa o in caso di incidente[14].

Per gli impianti di digestione anerobica di biomasse è necessario effettuare un processo di valutazione dei rischi che tenga conto di tutti i rischi con particolare riguardo ai rischi emergenti o riemergenti dall'applicazione di nuove tecnologie. Negli impianti che operano digestione anaerobica di biomasse con produzione di biogas sono identificabili, tra gli altri, rischi di natura esplosiva, chimica, rischio incendio e, una particolare attenzione può essere attribuita ai rischi afferenti alla categoria di rischio biologico.

Nello specifico, il Titolo X, del Decreto Legislativo 81 del 2008, tratta il tema dell'esposizione a rischio biologico in relazione a tutte le attività lavorative in cui tale rischio sia rilevabile.

La definizione di agente biologico prevede che sia considerato tale un qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare o endoparassita umano che possa provocare infezioni, allergie o intossicazioni[9].

Il Decreto fa riferimento alla suddivisione qualitativa dei diversi agenti biologici in quattro gruppi sulla base delle loro caratteristiche di pericolosità, ovvero tenendo conto di patogenicità, infettività, trasmissibilità, neutralizzabilità e delle disponibili misure di profilassi e terapia.

I principali organismi riscontrabili in un impianto di digestione anaerobica sono: batteri, funghi e virus, per la maggior parte appartenenti al Gruppo 2, caratterizzati da bassa patogenicità. Oltre a questi è possibile riscontrare anche la presenza di agenti infestanti quali insetti striscianti e volanti, roditori, chirotteri e volatili in genere.

Le maggiori fonti di rischio biologico sono rappresentate dallo stoccaggio ed eventuale pretrattamento di ingenti quantità di biomasse di origine diversa, impiegate nei processi operativi, così come dalla gestione del fango finale in uscita dal digestore. Inoltre, le operazioni di manutenzione ordinaria e straordinaria meritano una particolare attenzione.

L'esposizione avviene attraverso la formazione di bioaerosol e particolati persistenti nelle aree di lavoro.

2.2. Bioaerosol

Il termine bioaerosol si riferisce agli aerosol di origine biologica, ovvero particelle aerodisperse che prendono origine da organismi viventi. Nel bioaerosol è, infatti, riscontrabile una presenza significativa di agenti biologici e, nello specifico, esso può contenere cellule batteriche o fungine, ife fungine, spore, virus, endotossine batteriche, pollini, particelle organiche, escreti e metaboliti, ecc.

Il bioaerosol risulta essere costituito soprattutto da:

- batteri Gram negativi: contaminanti ubiquitari di terreni, acque e organismi viventi che si ritrovano su materiali vegetali come grano, cotone, fieno, legno, ecc. dove crescono come saprofiti. Sono presenti sia nelle polveri di origine animale che in quelle di origine vegetale, nonché negli aerosol provenienti da liquami e rifiuti;
- batteri Gram positivi: polveri di origine animale e materiali vegetali stoccati. Stafilococchi, Streptococchi e Bacillacee;
- Actinomiceti: batteri filamentosi Gram positivi che si possono trovare maggiormente nelle polveri dei materiali vegetali stoccati. Sono generi termofili, tra cui *Streptomyces* e *Rhodococcus*;
- miceti: funghi, muffe e lieviti unicellulari che si ritrovano piuttosto comunemente nei composti vegetali stoccati. Appartengono soprattutto ai generi *Penicillium* e *Aspergillus*;
- virus: rinvenibili soprattutto, nei reflui civili, in deiezioni di origine animale e nei rifiuti solidi urbani.

La componente microbica dei bioaerosoli rappresenta un indicatore primario di rischio biologico, potenzialmente associato all'insorgenza di patologie infettive, respiratorie e fenomeni allergici. Questa può essere veicolata dal particolato e, se inalata, si deposita nei diversi distretti del tratto respiratorio in funzione delle dimensioni delle particelle a cui è associato. Le particelle di dimensioni maggiori si depositano nel primo tratto dell'albero respiratorio, mentre quelle con diametro inferiore a 5 μm possono raggiungere i distretti più profondi e quelle con diametro aerodinamico <2,5 μm possono arrivare fino agli alveoli polmonari. La maggior parte del particolato con diametro superiore a 10 μm viene, invece, bloccata a livello di naso e/o bocca e quindi eliminata, mentre una percentuale variabile tra

il 10% ed il 60% delle particelle con diametro inferiore, che supera la trachea, raggiunge i polmoni[15].

La definizione di bioaerosol dell'ACGIH, tuttavia, parla in modo esplicito di frammenti di microrganismi e di particelle derivanti da essi, inserendo quindi nella definizione di agente biologico anche la presenza di particolato organico ed endotossine. Il Titolo X, del D.Lgs. 81/2008 al capo I dell'art. 267, nella definizione di agente biologico non sembra contemplare direttamente le endotossine, che, tuttavia, rappresentano una categoria di derivati di agenti biologici, in quanto componenti strutturali lipopolisaccaridici della membrana esterna della parete batterica dei Gram negativi[14].

2.3. Fasi a rischio e vie di esposizione

Le principali fasi, da considerarsi maggiormente rappresentative del rischio biologico per gli operatori che lavorano negli impianti di digestione anaerobica di biomasse, sono:

- ricevimento e accettazione delle biomasse;
- fasi di stoccaggio temporaneo e movimentazione delle biomasse;
- pre-trattamento dei materiali;
- movimentazione del materiale in uscita dal digestore.

Le principali vie di esposizione di cui tener conto nella valutazione dei rischi sono: inalatoria, da contatto con cute e mucose ed oro-fecale, sebbene non possano essere escluse infezioni per via mista o complessa, a seguito di incidenti quali, per esempio, tagli ed abrasioni. Gli ambienti lavorativi sono spesso caratterizzati dalla presenza di vettori quali insetti e roditori che costituiscono un'ulteriore possibilità trasmissiva.

2.4. Metodi di valutazione del rischio biologico

La valutazione dei rischi prevista nel D.Lgs. 81/08 si fonda su metodi di valutazione qualitativi ed un'interpretazione dei risultati dell'esposizione occupazionale di tipo quantitativo, in relazione agli effetti sulla salute.

L'ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) ritiene che non sia scientificamente sostenibile stabilire limiti di esposizione occupazionale che riguardino i diversi componenti del bioaerosol ciò in ragione della complessità costitutiva del bioaerosol stesso, della variabilità della risposta individuale, dell'assenza di procedure standard di monitoraggio e della scarsità di informazioni in merito alle relazioni dose-risposta[16].

Attualmente, per le valutazioni della qualità microbiologica dell'aria si procede comparando i dati di monitoraggio, non sempre presenti e condotti con metodologie non standardizzate, con livelli soglia di alcuni parametri consigliati in letteratura.

In Italia, Dacarro e collaboratori[17] hanno proposto un sistema di valutazione delle cariche batteriche e fungine ambientali, correlabili ad un giudizio sulla qualità dell'aria, valido per studi in ambienti *indoor* e tale sistema si basa su "indici di contaminazione microbiologica" di seguito descritti:

- Indice Globale di Contaminazione Microbica, IGCM, per la misura complessiva dell'inquinamento microbico ambientale.

  IGCM = UFC (bat) 37°C + UFC (bat) 20°C + UFC miceti

  Le UFC (bat) 37°C e 20°C corrispondono alle unità formanti colonia di batteri per m^3 d'aria, rispettivamente a 37 e 20 °C; mentre le UFC miceti sono le UFC fungine per m^3 d'aria. La valutazione associata ai valori ottenuti indica un rischio di contaminazione microbica "molto basso" per un valore di IGCM/m^3 inferiore a 500, mentre per valori di IGCM/m^3 superiore a 1000 si indica una significativa contaminazione microbica ambientale[18]. L'indice IGCM risulta essere stato formulato per la valutazione in ambienti *indoor*, tuttavia è stato impiegato anche per zone *outdoor*. In questi casi si deve però tenere conto che i valori di contaminazione saranno tendenzialmente inferiori, data la maggiore possibilità di dispersione.
- Indice di Contaminazione dei Batteri Mesofili, ICM, per valutare il contributo fornito da batteri di origine umana e animale all'inquinamento dell'aria, tra i quali possono essere presenti anche specie potenzialmente patogene.

  ICM = UFC (bat) 37°C/UFC (bat) 20°C
- Indice di Amplificazione, IA, per l'analisi delle differenze tra i livelli di contaminazione esterni ed interni, conseguenti all'attività lavorativa svolta (personale, macchine, materiali);

  IA = IGCM/m^3 interno/ IGCM/m^3 esterno.

Per quanto attiene al campionamento microbiologico, è possibile far corrispondere i valori ottenuti dall'indice IGCM/m^3 a categorie di rischio specifiche[18]:

Categoria	IGCM/m^3	Classe			
Molto bassa	< 500				
Bassa	< 1000				
Intermedia	> 1000	A:	IGCM > 1000	ICM < 3	IA < 3
		B:	IGCM > 1000	ICM > 3 o	IA > 3
		C.	IGCM > 1000	ICM > 3	IA > 3
Alta	> 5000	D:	IGCM > 5000	ICM < 3	IA < 3
		E:	IGCM > 5000	ICM > 3 o	IA > 3
		F:	IGCM > 5000	ICM > 3	IA > 3
Molto alta	> 10000	G:	IGCM > 10000	ICM < 3	IA < 3
		H:	IGCM > 10000	ICM > 3 o	IA >3
		I:	IGCM > 10000	ICM > 3	IA > 3

Tabella 1 - Categorie di rischio

Valori inferiori a 500 vengono associati ad una categoria di contaminazione microbica "molto bassa", mentre valori di IGCM/m^3 superiori a 1000 sono collegati ad una significativa contaminazione microbica ambientale[17].

2.5. Scopo del lavoro e fasi di progetto

Scopo del presente progetto è stato promuovere un'attività di approfondimento conoscitivo delle realtà espositive al fine di produrre delle indicazioni che possano essere adottate nella gestione del rischio biologico occupazionale nell'ambito degli impianti di digestione anaerobica di biomasse in Piemonte.

In Figura 1, attraverso un diagramma di Gantt, sono mostrate le principali fasi in cui si articola il progetto:

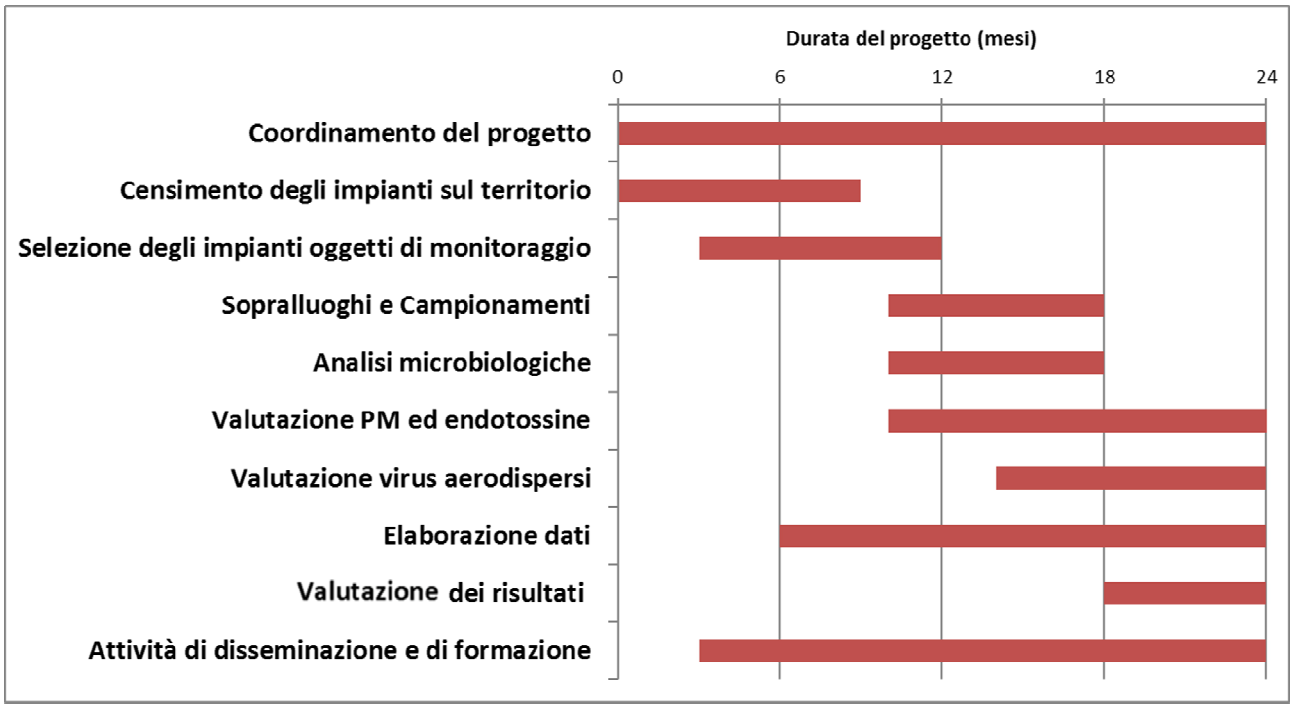


Figura 1 - Durata e fasi del progetto (inizio Luglio 2015)

2.6. Monitoraggi: Materiali e metodi

Il primo passo è stato il censimento degli impianti di digestione anaerobica presenti sul territorio piemontese, ai cui gestori è stata inviata una lettera di partecipazione con la richiesta di adesione al progetto "*Anaerobic digestion Green Jobs: Biological Risk Assessment"* attraverso la compilazione di un questionario online. A partire da maggio 2016, sono stati quindi condotti sopralluoghi in 7 impianti. Sono state, poi, selezionate 5 aziende che hanno aderito volontariamente alla realizzazione del progetto e, tenuto conto della fattibilità nell'ambito del progetto in essere, possono essere ritenute rappresentative della realtà piemontese. Tali aziende risultano essere così caratterizzate:

- trattamento FORSU, con compostaggio di fanghi e altri rifiuti;
- trattamento biomasse derivanti da settori agrozootecnici, includendo principalmente impianti che trattano prevalentemente sia reflui bovini sia reflui suini;
- trattamento acque reflue e fanghi di depurazione (WWTP).

I cicli lavorativi di tali impianti possono essere riassunti come illustrato nelle Figure 2, 3 e 4.

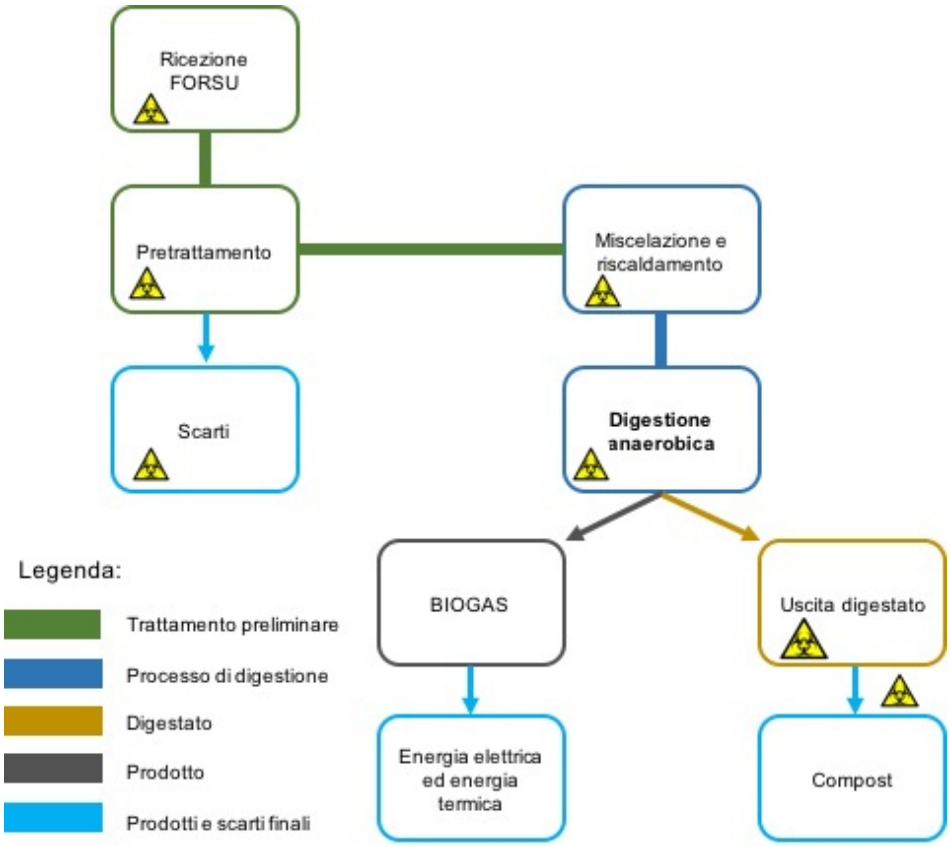


Figura 2 - Esempio dello schema di processo di un impianto che utilizza FORSU

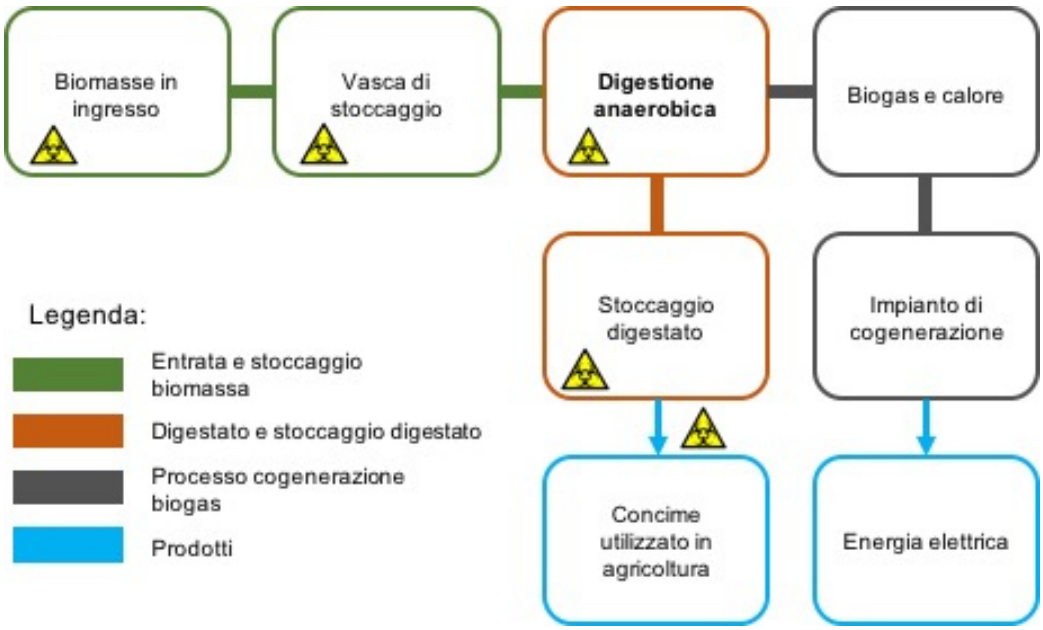


Figura 3 - Esempio dello schema di processo di un impianto che utilizza biomasse di origine agrozootecnica

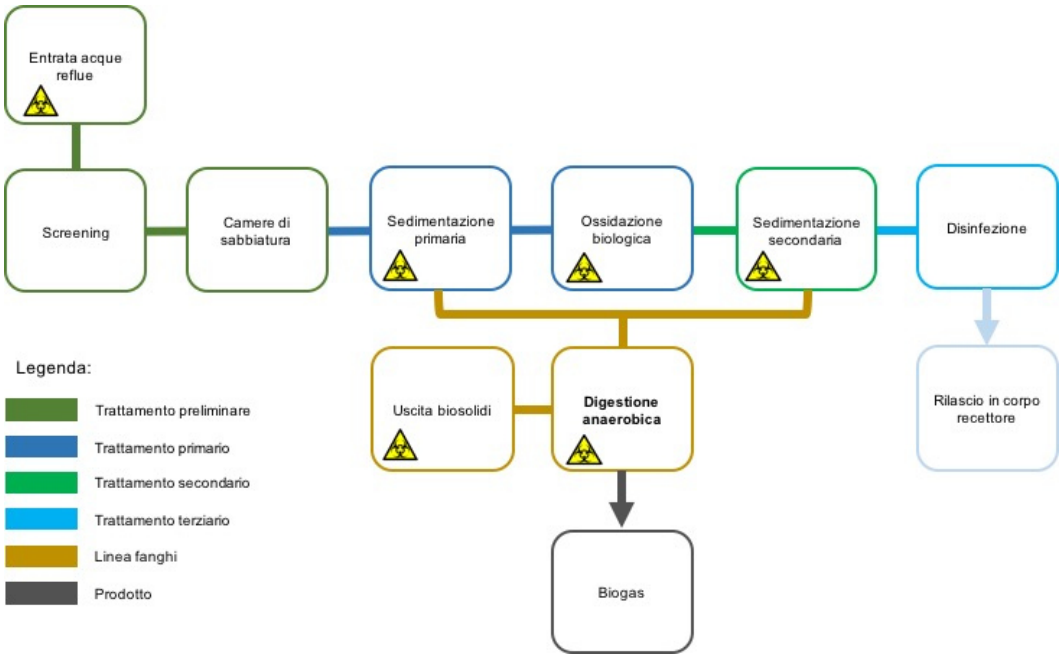


Figura 4 - Esempio dello schema di processo di un impianto che tratta acque reflue e fanghi di depurazione

Nelle aziende scelte come oggetto di studio sono stati effettuati i campionamenti del particolato ambientale PM10 (nelle sub-frazioni 10-7.2; 7.2-3.0; 3.0-1.5; 1.5-0.95; 0.95-0.49 e <0.49 µm) e del bioaerosol su piastra, per la determinazione della componente microbiologica e colturale.

I monitoraggi condotti possono delineare il rischio dell'attività che presenta un profilo gestionale presumibilmente avanzato. Per tale ragione possiamo stimare che le valutazioni espresse in questo documento possano rappresentare la migliore delle situazioni individuabili sul territorio piemontese.

Negli impianti sono stati scelti come punti di campionamento costanti, le aree di ricezione e carico, definite come "aree in entrata" e le aree relative alla gestione del digestato, definite come "aree in uscita". In relazione alle caratteristiche specifiche dell'impianto, inoltre, sono stati aggiunti dei punti di campionamento quali, per esempio, la sala controllo oppure aree in cui avviene il conferimento di matrici particolari o ancora mansioni particolarmente esposte, come quella dei manutentori.

2.6.1. Campionamento ed analisi di particolato ed endotossine

Il campionamento ambientale del PM10 è stato effettuato, per almeno metà del turno lavorativo, utilizzando un campionatore ad alto flusso HVS, modello AIRFLOW PM10,

dotato di flusso di aspirazione di 1,27 m^3/min, conforme alla normativa UNI EN 1234, recepita nel DM 60/2002: si tratta di un campionatore ad impatto ad alto volume, specifico per le polveri di PM10 (6 sub-frazioni 10-7.2 µm; 7.2-3.0 µm; 3.0-1.5 µm; 1.5-0.95 µm; 0.95-0.49 µm e <0.49 µm)[19], il cui funzionamento si basa sulla selezione, a cascata, delle particelle aerodisperse, in funzione delle proprietà aerodinamiche. Solo le particelle più sottili riescono ad attraversare una serie di fenditure parallele nel sistema, andando a depositarsi sui filtri in fibra di vetro. I filtri sono in tutto 6 e conteranno particelle con proprietà aerodinamiche differenti: le particelle con diametro aerodinamico maggiore si depositano sui filtri fessurati di tipo A/E (8"x10", Gelman Sciences, MI, USA), mentre le particelle più fini (<0.49 µm) si depositano su filtri formato A4 (203x254 mm, Pall Corporation, Port Washington, New York, USA). Tali filtri sono stati sottoposti ad una procedura di condizionamento per rendere trascurabile l'interferenza dell'umidità sul peso degli stessi e ad una valutazione gravimetrica, pre- e post-campionamento[19].

Per l'analisi delle endotossine, invece, è stata utilizzata una porzione di ciascun filtro ($1/2$ di filtro "A" e $1/4$ di filtro "B"), precedentemente stoccato a 4°C. L'estrazione delle endotossine batteriche è stata effettuata in terreno RPMI-1640 bianco (Biowest, USA) con l'aggiunta dello 0.025% di Tween-20 (Fluka Sigma-Aldrich, USA) e gli estratti sono, quindi, stati congelati in Falcon da 15 ml, a -20°C, fino all'esecuzione del LAL (Limulus Amebocite Lysate), test *end-point* cromo genico (QLC-1000, Lonza), per la quantificazione delle endotossine. La lettura è stata condotta a 407 nm tramite un lettore di micropiastre (Infinite 200 PRO, Tecan); lo standard impiegato è l'endotossina purificata da *E. coli* 0111:B4 Endotoxin (E50-640).

2.6.2. Campionamento ed analisi microbiologiche

Il campionamento del bioaerosol è stato effettuato, a diversi volumi per ciascun parametro, tramite campionatore a doppia entrata DUO SAS Super 360 (International PBI). I parametri di valutazione utilizzati sono riportati nella Tabella 2[20].

A tutti i terreni (eccetto funghi e lieviti) è stata aggiunta cycloheximide (10 mg/ml) [21].

Parametro ricercato	Tempo incubazione	Temperatura incubazione (°C)	Terreno di coltura
Conta tot 22°C	48 h	22	PCA
Conta tot 37°C	48 h	37	PCA
Conta tot 55°C	48 h	55	PCA
Funghi/lieviti	5-7 gg	25	Sabouraud glucose 4% chloramphenicol agar
Pseudomonacee	18-48 h	37	Cetrimide
Bacillus	24-48 h	30	HiCrome Bacillus agar
Clostridia	18-24 h	44	mCP
Gram negativi	24 h	37	Agar MacConkey
Salmonella/ Shigella	18-24 h	37	XLD
Actinomiceti	5-10 gg	55	Starchcasein agar
Enterococchi	48 h	37	Slanetz+TTC
Stafilococchi	48 h	37	Baird-Parker Agar

Tabella 2 - Parametri microbiologici indagati con riferimento alla tipologia di terreno e alle condizioni di incubazione adottati.

Dopo l'esecuzione dei campionamenti e trascorsi i periodi di incubazione, le piastre sono state osservate per l'effettuazione del conteggio del numero di colonie formate dai microrganismi (UFC) da cui si può risalire al grado di contaminazione microbica dell'aria (MPN/m^3) - schema di conversione fornito dal produttore dello strumento. In seguito si riporterà solo UFC/m^3 quale unità di misura della contaminazione microbica. L'identificazione delle specie batteriche è avvenuta mediante l'uso di gallerie miniaturizzate e standardizzate per test biochimici API *Biomeriuex* specifiche.

2.6.3. Campionamento ed analisi della componente virale

Per quanto riguarda la componente virale, il campionamento è stato condotto sia su piastra sia su filtro. Nel primo caso, è stato utilizzato un agar denominato *Low Melting Agarose* o LMA (Ultra Pure™ LMP Agarose 16520-050 Invitrogen, USA), successivamente trasferito in Falcon sterili da 50 ml, stoccate poi a -80°C prima dell'estrazione. Anche in questo caso, è stato utilizzato l'impattatore DUO SAS SUPER 360 (SAS International Pbi, Italy).

Nel secondo caso, invece, sono state utilizzate delle porzioni dei filtri "B" su cui è depositata la componente del PM <0.49 µm. Per l'estrazione degli acidi nucleici virali da filtro, si è partiti da 1/16 di filtro che corrisponde ad un campionamento di circa 19 m^3 d'aria. Per l'estrazione virale da LMA si è partiti, invece, da 200 µl di terreno che corrispondono a 10 m^3 di aria campionata. Il volume inalato in ambiente lavorativo al

giorno varia da 6,3 m^3 (0,78 m^3/ora) a 12 m^3 (1,50 m^3/ora) a seconda dell'occupazione[22]. Per quanto sopra descritto si può affermare che il campionamento simula un'esposizione reale in termini di dose complessiva giornaliera. Prima di testare i campioni, sono state condotte alcune prove di estrazione da filtro e i risultati ottenuti hanno mostrato una scarsa efficienza estrattiva del metodo applicato, messo a punto con successive prove.

L'estrazione del DNA virale è stata condotta partendo sia da piastre sia da filtri (1⁄16 di filtro) tramite l'apposito kit Power Viral Environmental RNA/DNA (#28000-50 Qiagen, USA), al termine della quale si è proceduto con la quantificazione spettrofotometrica (260 nm) con l'utilizzo della piastra Nano Quant Plate (Tecan Trading AG, Switzerland). Gli estratti sono, quindi, stati congelati a -20°C, fino alla quantificazione tramite PCR Real-Time, con l'utilizzo di *primer* e *standard* specifici[23] per Adenovirus (HAdV-4), scelti in precedenza come indicatori di presenza virale.

2.6.4. Campionamento personale ed analisi

Parallelamente ai monitoraggi ambientali, nelle due aziende che trattano la frazione organica dei rifiuti urbani e i fanghi di depurazione delle acque reflue, sono stati condotti monitoraggi personali. Il personale, scelto sulla base della mansione svolta con particolare attenzione verso gli addetti coinvolti nelle operazioni di manutenzione (straordinaria o pianificata), è stato dotato di un campionatore portatile AIRCHEK XR5000 (5-5000 ml/min, 210-5000, SKC USA). Sono stati somministrati questionari per acquisire informazioni sulle abitudini voluttuarie del lavoratore e per descrivere la durata e la tipologia delle mansioni svolte.

I campionamenti personali hanno consentito di stimare la concentrazione media del PM4,5 alla quale i lavoratori sono esposti durante il turno lavorativo. I filtri utilizzati sono in fibra di vetro con un diametro di 25 mm (Nupore Filtration Systems Pvt. Ltd., India). La procedura di analisi del particolato e delle endotossine avviene utilizzando l'intero filtro disponibile, secondo le stesse modalità impiegate per i filtri del campionatore ambientale del PM10 sub-frazionato.

2.6.5. Analisi dei dati

L'elaborazione statistica dei dati, ottenuti dalle analisi condotte sui campioni, è stata effettuata utilizzando SPSS Package, versione 24.0 (IBM Corp., United States). Prima è stata effettuata una analisi descrittiva dei dati raccolti ed in seguito sono state verificate differenze tra medie e correlazioni utilizzando funzioni non parametriche.

Le funzioni statistiche applicate sono state:

- trasformazione logaritmica dei dati non normalmente distribuiti;
- elaborazione del coefficiente di correlazione Rho di Spearman, utilizzato per valutare relazioni tra le diverse variabili;
- confronto tra medie attraverso l'impiego del T-test per campioni indipendenti;
- uso dell'ANOVA per un'analisi multivariata, seguita da un test Tukey post hoc per una comparazione multipla.

Le differenze tra le medie e le correlazioni sono state considerate statisticamente significative quando il p-value risultava essere inferiore allo 0,05 e altamente significative con un p-value inferiore allo 0,01.

2.7. Monitoraggi: Risultati

Le tabelle seguenti (Tabella 3 e 4) mostrano concentrazione media e deviazione standard di particolato (espresse in µg/m^3 di aria campionata), di endotossine (espresse in EU/m^3 di aria campionata) e della carica microbica (espresse in $\log_{10}$ UFC/m^3 di aria campionata), nelle tre tipologie di impianti oggetto di studio.

		FORSU	Agrozootecnico	WWTP
		Media e dev.st	**Media e dev.st**	**Media e dev.st**
Particolato µg/m^3	**<0.49**	34,71 ± 28,24	32,86 ± 27,77	49,45 ± 11,22
	0.95-0.49	29,04 ± 15,18	6,78 ± 5,64	7,58 ± 2,71
	1.5-0.95	32,41 ± 6,45	8,08 ± 7,02	5,49 ± 5,00
	3.0-1.5	32,25 ± 8,38	7,85 ± 5,15	7,32 ± 5,83
	7.2-3.0	37,91 ± 16,12	7,93 ± 8,14	7,41 ± 5,24
	10-7.2	40,49 ± 20,84	6,21 ± 5,39	6,43 ± 4,10
	PM10	204,87 ± 68,11	69,05 ± 41,12	83,66 ± 26,34
	PM4.5	2197,59 ± 3914,24	-	410,65 ± 314,03
Endotossine EU/m^3	**<0.49**	14,82 ± 21,63	0,57 ± 1,01	4,73 ± 5,53
	0.95-0.49	6,59 ± 11,93	0,17 ± 0,13	1,13 ± 0,94
	1.5-0.95	0,58 ± 0,22	0,31 ± 0,25	1,08 ± 0,70
	3.0-1.5	25,99 ± 30,00	0,46 ± 0,38	0,47 ± 0,26
	7.2-3.0	0,64 ± 0,27	0,78 ± 0,51	0,47 ± 0,15
	10-7.2	14,68 ± 17,62	0,56 ± 0,58	0,09 ± 0,12
	PM10	62,44 ± 67,81	2,85 ± 2,37	7,98 ± 6,99
	PM4.5	4,94 ± 2,93	-	5,16 ± 6,65

Tabella 3 - Media e deviazione standard di particolato ed endotossine nei tre tipi di impianti
(in viola chiaro le sub-frazioni del PM10, in viola scuro il PM10 totale, in azzurro i valori relativi ai campionamenti personali)

	Microbiologico Log UFC/m^3					
	FORSU		AGROZOOTECNICO		WWTP	
	Media	Dev. St	Media	Dev. St	Media	Dev. St
Conta 22°C	3,30	0,93	2,76	0,32	1,51	0,11
Conta 37°C	3,18	0,98	2,59	0,45	2,36	1,23
Conta 55°C	1,85	0,82	1,54	0,07	2,03	1,62
Funghi/Lieviti	2,91	0,63	4,08	0,40	2,54	0,17
Pseudomonacee	1,06	1,49	0,55	0,11	0	0
Clostridia	1,27	0,85	0,84	0,46	0,40	0,32
Bacillus	2,75	0,90	2,23	0,37	1,14	1,15
Gram negativi	1,23	0,78	0,60	0,12	0	0
Salmonella	0,98	1,04	0,23	0,17	0	0
Actinomiceti	2,72	1,01	2,28	0,75	0,27	0,37
Enterococchi	2,41	0,76	0,80	0,58	0,20	0,24
Stafilococchi	2,73	0,54	2,15	0,49	1,01	0,63

Tabella 4 - Medie e deviazioni standard delle conte microbiologiche nei tre tipi di impianti

2.7.1. Particolato

Il grafico riportato in Figura 5, mostra le concentrazioni medie di particolato nelle tre tipologie di azienda oggetto di studio, espresse in µg/m^3: queste sono in media maggiormente abbondanti nella frazione più sottile (<0,49 µm), rispetto alle altre frazioni, che risultano essere, invece, meno rappresentate. Si osserva inoltre che gli impianti che trattano FORSU sono caratterizzati da una concentrazione di particolato significativamente superiore rispetto agli impianti che utilizzano derivati agro-zootecnici e alle WWTP (ANOVA, $p<0.01$).

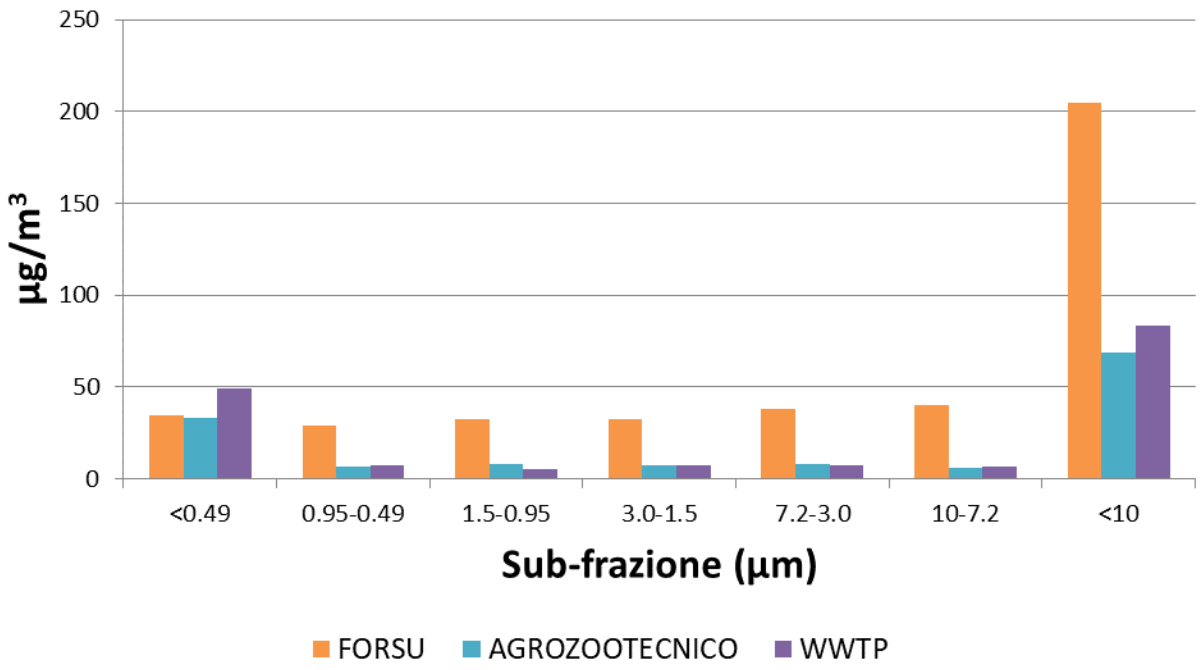


Figura 5 - Concentrazioni medie di particolato PM10 e delle sue sub-frazioni per le 3 tipologie di impianto (medie e deviazioni standard in Tabella 3)

Questo risultato è coerente con la tipologia di impianto, in quanto le aziende che trattato FORSU sono caratterizzate da ambienti confinati nei quali le particelle aerodisperse tendono a disperdersi in maniera minore rispetto alle altre due tipologie di aziende. Infatti, nelle aziende che trattano acque reflue e fanghi di depurazione, gli ambienti sono semi-confinati e nelle aziende che impiegano liquami animali gli ambienti sono non confinati, salvo prescrizioni differenti, quindi si osserva una maggiore dispersione del particolato e del bioaerosol generati.

Anche dai campionamenti personali, effettuati nelle aziende che trattano FORSU e nelle WWTP, si evince che le concentrazioni di particolato sono maggiori nella prima tipologia di impianto rispetto alla seconda. Le aziende che trattano la frazione organica dei rifiuti urbani presentano una maggiore superficie di esposizione della biomassa rispetto agli impianti di depurazione, nei quali la matrice liquida è confinata in cicli prevalentemente chiusi.

Paragonando le concentrazioni medie di particolato tra le aree di campionamento, per ciascuno dei tre tipi di aziende, soltanto negli impianti che trattano FORSU la concentrazione di particolato è maggiore nelle aree di ricezione e carico rispetto alle aree relative alla gestione del digestato (T-test, $p<0.01$). Invece, nelle aziende che impiegano derivati agrozootecnici e in quelle che trattano acque reflue e fanghi di depurazione, le

concentrazioni medie di particolato, nelle diverse aree campionate, non mostrano differenze significative. Negli impianti che trattano matrici agro-zootecniche, in generale, possiamo osservare che le aree in cui avviene lo stoccaggio della biomassa ed il carico della tramoggia sono spesso adiacenti alle vasche di stoccaggio del digestato. Ciò comporta una parziale sovrapposizione della contaminazione a prescindere dall'origine, sia della biomassa in entrata sia del fango in uscita.

Il valore limite fissato, dalla ACGIH, per le polveri PNOC (Particulate Not Otherwise Classified) respirabili è di 3 mg/m^3 in ambienti lavorativi, mentre quello per le polveri inalabili è di 10 mg/m^3. Riguardo al rischio associato a polveri di diversa origine, di seguito, si riporta una tabella esplicativa dei valori limite ad oggi proposti (Tabella 5) [24]. È auspicabile che le polveri, generate in questi ambienti, possano essere caratterizzate, al fine di escludere o circoscrivere la presenza di polveri a più alto rischio per la salute umana. Ricordiamo, inoltre, che esistono dei valori limite per la qualità dell'aria ambientale stabiliti dalla Comunità Europea, a tutela della salute della popolazione generale e recepiti con normativa nazionale[25], che prevedono un limite per il PM10 di 50 µg/m^3 come media giornaliera e per il PM2.5 di 25 µg/m^3 come media annuale. Esistono, inoltre, dei valori guida per la qualità dell'aria indicati dal WHO che sono ulteriormente più restrittivi e pari a 20 µg/m^3 (media giornaliera) e 10 µg/m^3 (media annuale) rispettivamente per il PM10 e per il PM2.5[26].

Classificazione delle polveri	TLV-TWA ACGIH, 2014
Polveri di carbone bituminoso respirabili	0,9 mg/m^3
Polveri di carbone antracite respirabili	0,4 mg/m^3
Polvere di cereali, frazione inalabile	4 mg/m^3
Polvere di farina, frazione inalabile	0,5 mg/m^3
Polveri silice libera cristallina respirabili	0,025 mg/m^3
Polveri di legno	1 mg/m^3
Polvere di legno di cedro rosso	0,5 mg/m^3
PNOC (Particulate Not Otherwise Classified) inalabili	10 mg/m^3
PNOC (Particulate Not Otherwise Classified) respirabili	3 mg/m^3

Tabella 5 -TLV-TWA relativi a polveri di diversa origine

Pur non raggiungendo i valori di TLV-TWA (*Threshold Limit Value - Time-Weighted Average*) proposti per le polveri in ambiente lavorativo[24], il PM10 raggiunge valori considerevoli, con una elevata prevalenza di polveri respirabili ad alto rischio (PM3 fino a circa 60% del PM10); in particolare, tale evidenza è chiara nelle aziende che trattano FORSU.

2.7.2. Endotossine

Il grafico in Figura 6 riporta le concentrazioni medie di unità endotossiche per m^3 di aria campionata suddivise in relazione alla tipologia di impianto in cui è avvenuto il campionamento. Anche per questo contaminante, le concentrazioni di endotossine più elevate si riscontrano nelle aziende che impiegano FORSU rispetto alle aziende che trattano biomasse agrozootecniche e alle WWTP. Tale evidenza è coerente con la tipologia di impianto, caratterizzato da ambienti lavorativi confinati e dal trattamento di una tipologia di biomassa a carattere prevalentemente solido.

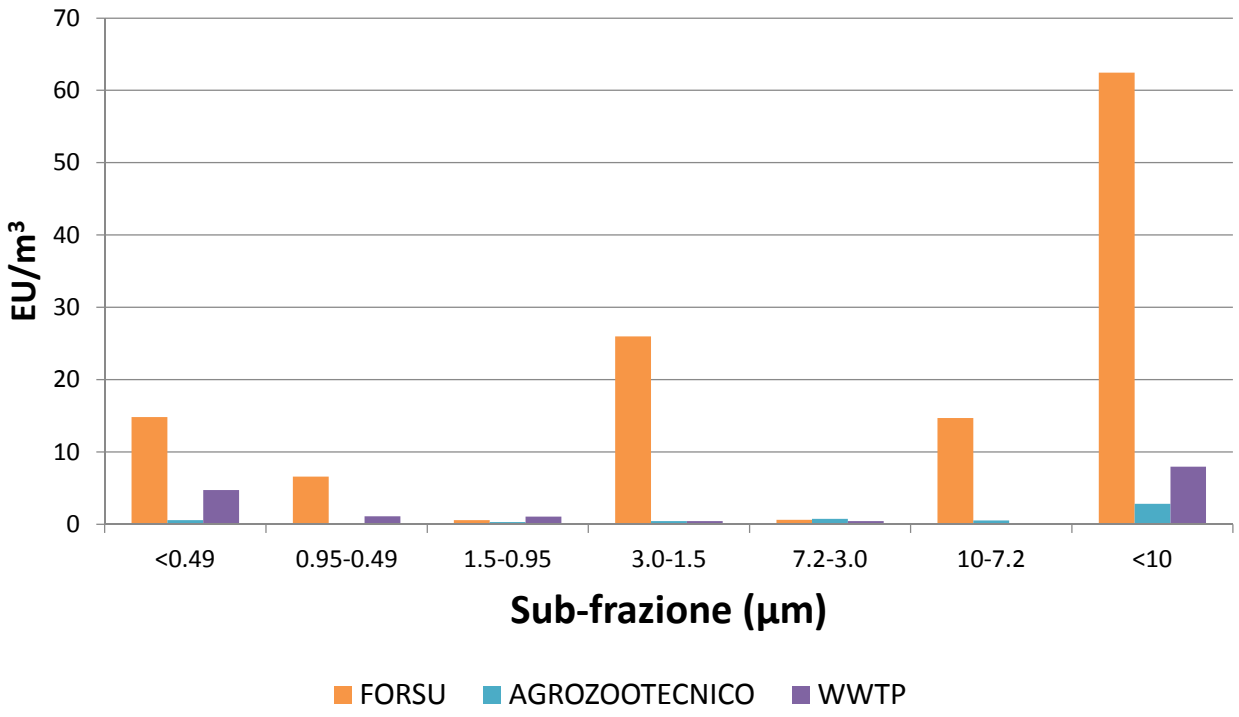


Figura 6 - Concentrazioni medie delle unità endotossiche delle sub-frazioni di PM10 per le 3 tipologie di impianti (medie e deviazioni standard in Tabella 3)

Nel primo tipo di impianto (FORSU) si registrano concentrazioni maggiori di endotossine per alcune sub-frazioni di PM10 (3.0-1.5 µm, 10-7.2 µm, <0,49 µm) (T-test, $p < 0,05$). Non

si evidenziano sostanziali differenze nelle concentrazioni di endotossine nelle diverse sub-frazioni nel secondo tipo (Agrozootecnico) e terzo tipo (WWTP) di impianto coinvolto.
Si evince poi che, nelle aziende che trattano FORSU, i livelli di endotossine totali, registrati nel PM10, sono maggiori se paragonati alle altre due tipologie di aziende (ANOVA, $p<0.01$).
Le concentrazioni di unità endotossiche, rilevate durante i campionamenti personali effettuati nelle aziende che trattano FORSU e nelle WWTP, non mostrano differenze significative.
Paragonando le concentrazioni medie di endotossine tra le aree di campionamento, è possibile osservare come, negli impianti che impiegano FORSU, le concentrazioni di unità endotossiche siano più elevate nelle aree in ingresso rispetto alle aree in uscita (T- test, $p <0,05$), mentre nelle altre tipologie di impianti le concentrazioni di endotossine sono molto basse e non mostrano differenze in relazione al sito di campionamento.
Il Comitato dell'ACGIH per i bioaerosoli non propone limiti di riferimento per le concentrazioni ambientali di endotossine vista, soprattutto, la difficoltà di stabilire una relazione dose-effetto. La *International Commission on Occupational Health* ha pubblicato linee-guida che propongono un valore di 20 ng/m^3 relativo ai cotonifici ed un valore di 470 ng/m^3 relativo ai comparti di produzione di mangimi animali. Un valore limite di esposizione professionale mediato su 8 ore è stato proposto in Olanda ed è pari a 90 EU/m^3 [27].
Il rischio di esposizione ad endotossine connesso ad impianti di digestione anaerobica è trattato in due lavori: il primo, condotto in Finlandia nel 2006, ha evidenziato una maggiore stabilità in termini di sicurezza occupazionale del processo anaerobico di stabilizzazione dei biosolidi rispetto al processo aerobico di compostaggio. Ciononostante, nei locali vicini al bio-reattore, durante i lavori di manutenzione, i livelli di endotossine aerodisperse sono mediamente pari a 10,650 EU/m^3, un valore circa 118 volte superiore al valore proposto come limite in Olanda. [28]
Un secondo lavoro pubblicato nel 2010, valuta, invece, la risposta infiammatoria su colture cellulari: dallo studio, si evince che la tossicità associata è maggiore negli impianti di compostaggio, seguita dagli impianti di digestione anaerobica in regime termofilo e dagli impianti in regime mesofilo. Tale evidenza sembra principalmente associata ad una differente dispersione dei metalli, mentre i livelli di endotossine sembrano essere pressoché costanti in prossimità dei vari impianti. [29]

In generale, i valori di EU/m^3 osservati in questo lavoro sono contenuti rispetto ai limiti proposti: è stato ipotizzato un limite al di sotto del quale, per soggetti normali, non ci sarebbe una risposta di tipo acuto e tale limite corrisponderebbe ad una concentrazione aerea di 500 EU/m^3 ($\cong$ 50 ng/m^3) per circa 8-10 ore di esposizione[25]. Analizzando i dati raccolti in questo progetto emerge che solo in area ricezione e pretrattamento della FORSU, considerando il PM10 totale, si osserva una contaminazione da endotossine potenzialmente dannosa, superiore al limite sopracitato (90 EU/m^3) proposto in Olanda.

2.7.3. Indagine microbiologica

Comparando le tre tipologie di impianto di digestione anaerobica, è stata osservata una maggiore contaminazione negli impianti che trattano FORSU per quanto riguarda la conta a 22°C (ANOVA, $p<0,01$) e la conta a 37°C, seguiti dagli impianti che trattano biomasse di origine agrozootecnica e dalle WWTP (Tabella 4). Nelle aziende che trattano reflui agrozootecnici è stata riscontrata una contaminazione da funghi e lieviti più elevata rispetto alle altre tipologie di impianto (ANOVA, $p<0,01$).

I livelli di contaminazione microbica, suddivisi per sito di campionamento in ciascuna tipologia di azienda, sono riportati in Figura 7. Si osserva che i valori più elevati sono associati ai seguenti parametri:

- per gli impianti che trattano FORSU, le conte batteriche a 22 e a 37°C per le aree in entrata;
- per gli impianti che impiegano biomasse derivanti da settori agrozootecnici, la conta batterica a 22°C nelle aree in entrata; i funghi e lieviti in entrambe le aree;
- per le aziende che trattano acque reflue e fanghi di depurazione, la conta batterica a 55°C, senza particolari differenze tra i due siti.

La contaminazione da Actinomiceti è comparabile nei due siti nelle tre tipologie di impianti. Negli impianti di trattamento delle acque reflue la contaminazione da Actinomiceti, secondo il monitoraggio effettuato, è trascurabile.

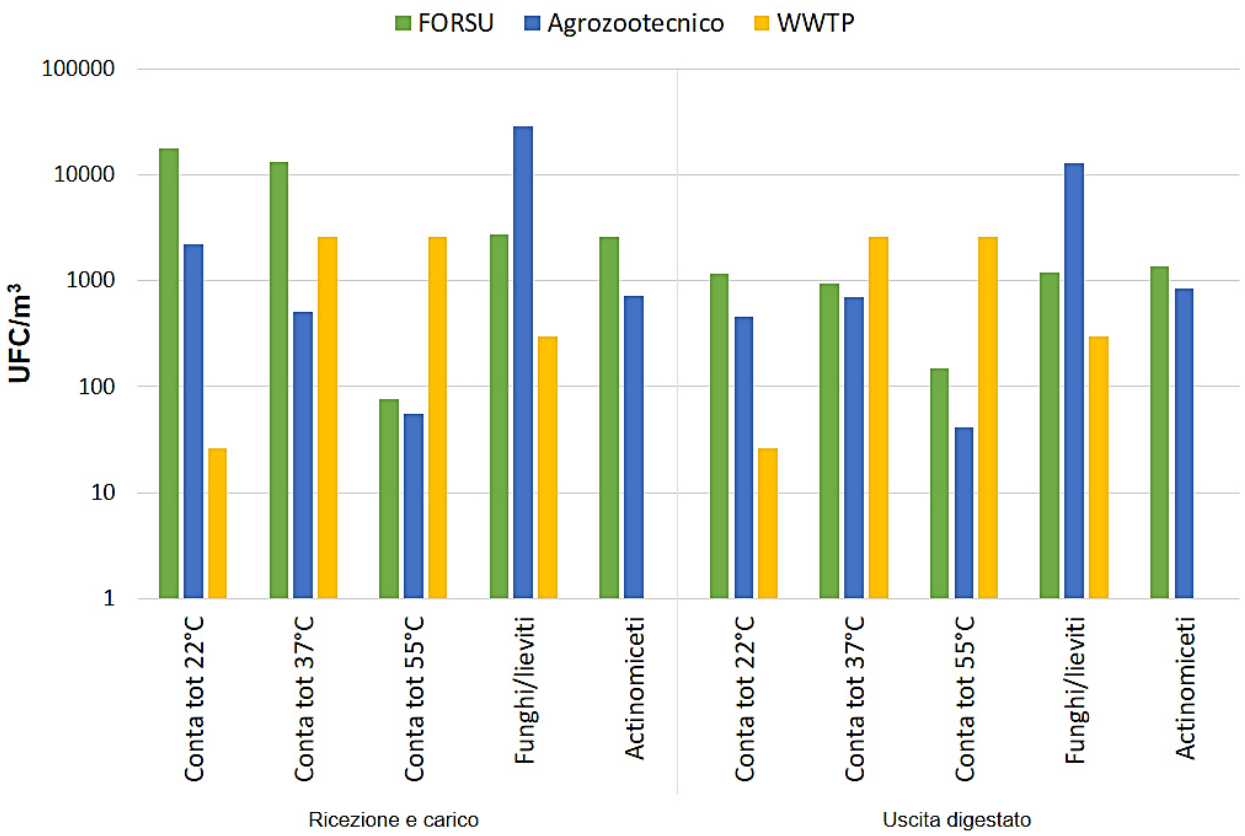


Figura 7 - Concentrazioni medie delle conte microbiologiche nelle 3 tipologie di impianti (medie e deviazioni standard in Tabella 4)

Si sottolinea l'elevato numero di funghi e di microrganismi appartenenti al genere *Bacillus*, fra i quali numerosi *Bacillus subtilis,* produttori potenziali di subtilisine e di idrolasi simili. Per quanto riguarda la crescita fungina non è stata effettuata alcuna caratterizzazione (non prevista dal progetto iniziale) per cui non si hanno informazioni sulla presenza ed abbondanza relativa di *Aspergillus*, sebbene anche questo sia un aspetto rilevante nella valutazione del rischio biologico per gli impianti. L'osservazione morfologica delle colonie ha comunque consentito di individuare numerose colonie filamentose prima bianche poi verdi, marroni o nere associabili a *A. fumigalis*, *A. flanis* o *A. niger*, rispettivamente.

Inoltre, sono stati osservati alti livelli di Bacilli e Pseudomonacee negli impianti FORSU, se comparati con le altre due tipologie di impianto (correlazione di Spearman = 0,894; $p<0,01$). In particolare, la contaminazione maggiore si registra nei siti adibiti alla ricezione e al carico della biomassa. Invece, nelle aziende che impiegano derivati agrozootecnici si riscontrano elevati livelli di Bacilli nelle aree in entrata. Nessuna particolare differenza, tra le aree in entrata e in uscita, è stata riscontata per quanta riguarda gli impianti WWTP (Tabella 4).

Nella Tabella 6 vengono riportati i microrganismi identificati nel corso dei campionamenti (fondo azzurro), nonché quelli ritenuti potenzialmente presenti e non trascurabili a livello di letteratura (fondo arancio)[30]. I microrganismi indicati con un asterisco sono stati identificati durante i campionamenti e sono quelli che presentano frequentemente antibiotico resistenza.

Microrganismo	Gruppo
Borrelia bergdorferi	2
Brucella spp.	3
Campylobacter	2
Chlamydophilia psittaci	3,2
Clostridium perfringens	2
Clostridium tetani	2
Coxiella burnettii	3
Enterobacter cloacae	2
Enterobacter sakazaki	2
*Enterococcus avium**	2
*Enterococcus faecalis**	2
*Enterococcus faecium**	2
*Escherichia coli**	2
Helicobacter pylori	2
*Klebsiella pneumoniae**	2
Leishmania spp	2
Leptospiro ictterohaemorrhagiae	2
Mycobacterium bovis	3
Proteus mirabilis	2
Pseudomonas aeruginosa	2
Salmonella spp	2
*Staphilococcus aureus**	2
Streptococcus bovis II	2
Streptococcus suis	2
Strongyloides stercoralis	2
Toxocara canis	2
Toxoplasma gondii	2

Tabella 6 – Microrganismi presenti/potenzialmente presenti e relativi Gruppi di appartenenza, secondo Allegato XLVI. Microrganismi identificati nel corso dei campionamenti (fondo azzurro), ritenuti non trascurabili in letteratura (fondo arancio); che presentano frequentemente antibiotico resistenza (asterisco).

In letteratura i microrganismi rintracciabili in ambienti indoor sono: *Aeromonas* spp., Actinomiceti, Enterococchi, Streptococchi fecali, *E. Coli*, *Legionella*, Mycobatteri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. I virus potenzialmente presenti sono: Rhinovirus, Enterovirus, Coronavirus, Adenovirus, Norovirus[31].

In Germania il BAUA, l'istituto federale per la tutela e la promozione della salute dei lavoratori, ha stabilito un limite per l'esposizione occupazionale di 50.000 CFU/m^3 di funghi, tra cui *Aspergillus* spp., per la frazione respirabile[32].

I limiti per alcune specie fungine e per gli Actinomiceti, adottati in Russia, variano da 10^3 a 10^4 cellule per m^3, tuttavia, la documentazione scientifica alla base della definizione di tali limiti non è facilmente rintracciabile[33]; di recente è stato proposto un LOEL (*Lowest Observed Effect Level*) di 100.000 spore per m^3 per le specie fungine non patogene e non produttrici di micotossine, considerando l'induzione di effetti infiammatori a livello respiratorio[34].

Per gli impianti di compostaggio, i livelli di contaminazione da bioaerosol, proposti come sicuri per garantire sia la salute dei lavoratori che delle popolazioni residenti in aree limitrofe (> 250 m dall'impianto) [35], sono:

- 1000 UFC/m^3 per i batteri totali;
- 300 UFC /m^3 per i batteri Gram negativi;
- 500 UFC /m^3 per *Aspergillus fumigatus;*
- 50.000 UFC /m^3 per la conta mesofila fungina;
- 90 EU/m^3 per le endotossine in 8 ore.

Attraverso il calcolo dell'indicatore IGCM, sono stati ottenuti valori specifici per tipologia di azienda, i quali vengono riportati in Figura 8. I valori di IGCM relativi alle aziende che trattano FORSU e a quelle che trattano reflui agrozootecnici raggiungono livelli superiori alla soglia di 10000, identificata come livello di contaminazione MOLTO ALTO; mentre i valori di IGCM relativi alle WWTP, si attestano su livelli di soglia >1000 e, quindi, ad una categoria di rischio INTERMEDIA.[18] E' importante tenere presente che generalmente, nelle aziende che trattano biomasse agrozootecniche, le aree in cui avvengolo le fasi a rischio non sono confinate, nelle aziende che trattano FORSU, invece, tali aree sono confinate e nelle WWTP sono parzialmente confinate.

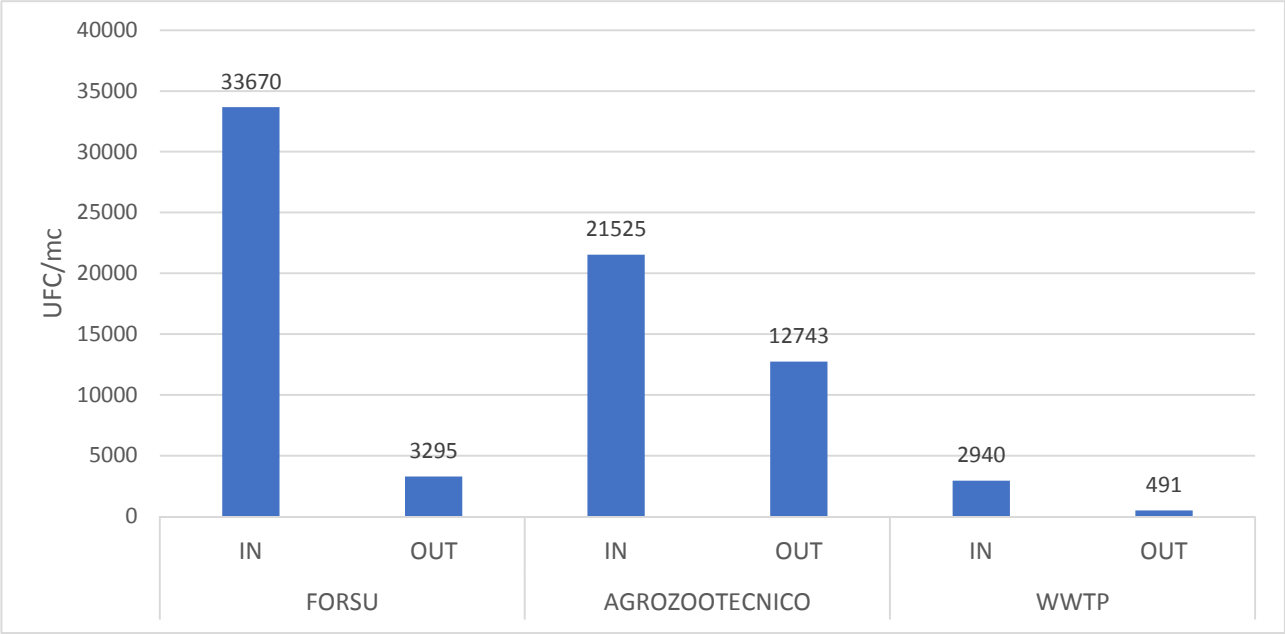


Figura 8 - Valori medi di IGCM (UFC/m^3) nelle 3 tipologie di impianti

2.7.4. Virus

I campioni di DNA virale estratto da filtri e dalle piastre con LMA sono stati quantificati con l'utilizzo della piastra Nano Quant Plate (Tecan Trading AG,Switzerland) che permette la quantificazione degli acidi nucleici, in questo caso DNA a doppio filamento (dsDNA), attraverso la lettura spettrofotometrica a 260 nm dei campioni. La quantificazione del DNA ha dato esiti positivi, ottenendo una concentrazione sufficiente per applicare successive analisi biomolecolari (>1 ng/µl di DNA). In Tabella 7 sono riportate le medie e le deviazioni standard delle quantificazioni da filtro e Low Melting Agar. Tenendo conto che sul filtro utilizzato per l'estrazione erano concentrati un numero quasi doppio di m^3 rispetto al LMA, le concentrazioni di acido nucleico estratto risultano simili (paired T-test>0.05).

	Concentrazione DNA virale ng/µl		
	FORSU	**Agrozootecnico**	**WWTP**
	Media e dev.st	**Media e dev.st**	**Media e dev.st**
Filtro	4,1 ± 0,63	4,64 ± 1,34	3,33 ± 1,38
LMA	2,25 ± 0,66	1,65 ± 0,60	2,45 ± 1,21

Tabella 7 - Medie e deviazioni standard delle quantificazioni del DNA virale estratto da filtro e da piastra

Successivamente, gli estratti sono stati utilizzati per una PCR Real-Time quantitativa per indagare la presenza di Adenovirus 4 umano (HAdV4). Tutti i campioni di DNA virale estratto, sia da filtro sia da LMA, hanno una concentrazione inferiore al LOQ (limite di quantificazione del metodo: 250 *gene copies*/m^3); per i campioni da LMA non si è potuto valutare neanche il Cq.

Questi risultati mostrano l'assenza di Adenovirus 4, ma non si esclude la presenza di altri virus aerodispersi, che potrebbero causare disturbi di varia natura. Una concentrazione inferiore al LOQ suggerisce un rischio molto basso di esposizione ad Adenovirus 4 (28 $TCID_{50}$)[36], che non dovrebbe mettere a repentaglio la salute dei lavoratori dell'impianto. Per avere un quadro più completo dei virus aerodispersi sarebbero necessarie ulteriori indagini quantitative con l'utilizzo di nuovi target virali o con l'utilizzo di *primer* generici che possano identificare famiglie di virus, come è già possibile fare con Batteri e Archea[37,38]. I virus appartenenti alla stessa famiglia potrebbero per esempio avere una stessa sequenza funzionale, ma ad oggi non esistono *primer* universali.

Un ulteriore approfondimento dello studio virale da bioaerosol è rappresentato dalla metagenomica, il sequenziamento del DNA virale, che nonostante l'elevata sensibilità presenta alcuni svantaggi: il costo elevato, l'eccessiva mole di dati ottenuti e la necessità di competenze bioinformatiche. Inoltre, esistono alcune criticità per l'applicazione della metagenomica[39] nello studio del bioaerosol: necessità di ottenere elevate concentrazioni di acidi nucleici da campioni ambientali, campionamenti ancora poco efficaci e la mancanza di metodiche standardizzate.

Lo studio del bioaerosol ambientale è un nuovo campo della ricerca che, con le tecniche innovative sviluppate negli ultimi anni, potrà essere approfondito e sarà un ottimo strumento per il monitoraggio ambientale e per la salvaguardia della salute dei lavoratori e dei cittadini.

3. RISCHIO BIOLOGICO

3.1. Matrice dei rischi

Per la valutazione del rischio nel presente progetto abbiamo applicato l'algoritmo riferito al metodo "a matrice" utilizzato per la valutazione semi-quantitativa dei rischi occupazionali, proposto dall'ISPRA[40]. Nella matrice, per il calcolo del rischio sono inseriti due elementi:

- **P** = probabilità di accadimento di un evento dannoso
- **D** = danno conseguente all'evento qualora accada

Dalla relazione P x D si ottiene un valore **R** che esprime il livello di rischio presente nell'attività considerata.

$$R = P \times D$$

Il fattore di probabilità P è calcolato attraverso la seguente formula, integrata da alcuni fattori correttivi:

$$\mathrm{P} = \mathrm{C} \times \left[\sum_{1}^{9} \mathrm{F}_1 + 1\right] / 10$$

dove:

- **C** indica la contaminazione presuntiva stimabile nel bioaereosol, espressa dal coefficiente ricavato sulla base di dati sperimentali acquisiti. In particolare C è, un valore numerico, frutto del rapporto tra l'indice di contaminazione ambientale totale (IGCM UFC/m^3) come precedentemente proposto in letteratura[15] ed il numero di specie patogene per l'uomo (ABP) identificate (presenza) secondo quanto proposto nel seguente schema a 2 entrate (Tabella 8).

Indice di contaminazione			Fattore C			
10000 < IGCM	***2***		2	4	5	6
10000 ≥ IGCM > 5000	***1.5***		1,5	3	3,75	4,5
5000 ≥ IGCM ≥ 1000	***1***		1	2	2,5	3
1000 > IGCM	***0.5***		0,5	1	1,25	1,5
			1	***2***	**2,5**	**3**
			1 > ABP	1 ≤ ABP ≤ 5	5 < ABP ≤ 9	ABP > 9
			Agenti Patogeni identificati			

Tabella 8 - Calcolo del fattore C in relazione all'IGCM e al numero di agenti biologici patogeni identificati

- **F** indica il coefficiente che deriva dall'analisi delle modalità operative, delle caratteristiche ambientali e della formazione degli operatori.

Il coefficiente C è stato determinato come funzione della contaminazione totale delle specie patogene riconosciute nel bioaerosol, utilizzando i dati raccolti. E' differente dalla contaminazione presuntiva stimata nella matrice trattata. Diviene pertanto una stima della concentrazione presuntiva di agenti biologici totali ed agenti biologici potenzialmente dannosi nel bioaerosol dei vari impianti, secondo quanto osservato nel presente studio.

I coefficienti F presi in considerazione sono:

- **F1**: indica la quantità di sostanza manipolata, ovvero la quantità di biomassa in ingresso e può assumere valori di 0 (basso = 5.000-20.000 t/anno), 0.5 (medio = 20.000-80.000 t/anno), 1 (alto = > 80.000 t/anno);
- **F2**: indica la frequenza di contatto diretto con le matrici che espongono l'operatore ad agenti biologici (ad esempio manutenzione straordinaria e/o interventi di pulizia dei piazzali) e può assumere valori di 0 (bassa = almeno mensile), 0.5 (media = 1 o poche volte a settimana), 1 (alta = almeno giornaliera);
- **F3**: indica il numero di addetti relativi ad una specifica mansione per turno lavorativo e può assumere valori di 0 (alto = > 10 addetti), 0.5 (medio = 2-5 addetti), 1 (basso = 1 addetto);
- **F4**: rappresenta l'eterogeneità della matrice in ingresso ai vari impianti e può assumere valori di 0 (basso = omogeneo), 0.5 (medio = intermedio), 1 (alto = eterogeneo);
- **F5**: rappresenta la superficie di biomassa a diretto contatto con l'aria durante gli stoccaggi ed i trattamenti e può assumere valori di 0 (bassa = < 25 m^2), 0.5 (media = 25-100 m^2), 1 (alta = > 100 m^2);
- **F6**: rappresenta le caratteristiche strutturali e i DPC e può assumere valori di 0 (adeguate = 100% voci applicabili), 0.5 (parzialmente adeguate = ≥ 66%), 1 (non adeguate = < 66%). Le voci applicate a seconda della tipologia di biomassa impiegata saranno in seguito esplicitate;
- **F7**: indica le norme di buona prassi, utili nella prevenzione e protezione del rischio biologico. Può assumere valori di 0 (adeguata = esistenti e diffuse a tutto il personale esposto), 0.5 (parzialmente adeguata = esistenti, ma non sempre correttamente applicate), 1 (non adeguata = non esistenti);

- **F8**: rappresenta i DPI specifici per il rischio biologico e può assumere valori di 0 (adeguata = tutto il personale è dotato e utilizza correttamente tutti i DPI necessari), 0.5 (parzialmente adeguata = tutto il personale è dotato, ma non li utilizza sempre correttamente), 1 (non adeguata = meno della metà del personale è dotato dei DPI idonei oppure non sono stati forniti DPI);
- **F9**: rappresenta la formazione degli operatori sul rischio biologico, il cui programma deve riguardare le procedure e i sistemi di prevenzione e protezione, il loro corretto utilizzo dei DPC e dei DPI, la corretta gestione dei rifiuti a rischio biologico e le procedure da applicare in caso di emergenza. Può assumere valori di 0 (adeguata = tutto il personale esposto a rischio biologico ha ricevuto la formazione e informazione specifica), 0.5 (parzialmente adeguata = tutto il personale esposto ha ricevuto la formazione/informazione specifica, ma non sempre sa applicarla), 1 (non adeguata = meno della metà del personale esposto ha ricevuto la formazione e informazione specifica).

Il fattore D è direttamente correlato alla classificazione di pericolosità degli agenti biologici secondo l'allegato XLVI del D.lgs. 81/08[41]. Assume i valori indicati in Tabella 9.

Agente biologico	D
Non classificato	1
Gruppo 2	2
Gruppo 3	3
Gruppo 4	4

Tabella 9 - Valori del danno dei microorganismi in relazione alla classificazione di pericolosità.

Di seguito riportiamo graficamente il modello di matrice matematica utilizzato, con 4 valori di probabilità ed i 4 valori di danno (Tabella 10).

Probabilità				
4 alta	4	8	12	16
3 media	3	6	9	12
2 bassa	2	4	6	8
1 molto bassa	1	2	3	4
0,5 estremamente bassa	0,5	1	1,5	2
	1 molto basso	2 basso	3 medio	4 alto

Danno

Colore	Valore numerico	Livello di rischio	Misure di prevenzione e protezione
	0,5 < R ≤ 1	**Accettabile**	Norme igieniche generali
	1 < R ≤ 2	**Basso**	Norme igieniche generali
	2 < R ≤ 8	**Medio**	Norme igieniche generali + Misure specifiche di prevenzione e protezione
	8 < R ≤ 10	**Alto**	Misure specifiche di prevenzione e protezione urgenti
	10 < R ≤ 16	**Inaccettabile**	Sospensione temporanea dell'attività a rischio e realizzazione immediata degli interventi

Tabella 10 - Matrice del rischio (prima parte) ed interpretazione proposta (seconda parte)

Si riporta, quindi, l'esempio di applicazione della matrice agli impianti che gestiscono rifiuti, acque reflue e derivati dal settore agrozootecnico come biomasse in ingresso (Flowchart in Allegato A).

Nella tabella 11, per assegnare un valore alla contaminazione presuntiva ***(C)***, sono stati comparati i valori medi, dell'indice di contaminazione ambientale totale (IGCM UFC/m^3) con il numero di specie di agenti biologici patogeni per l'uomo (presenza), suddiviso per entrata e uscita del materiale dall'impianto. I valori sono individuati per le principali attività svolte dal personale impiegato nelle tre tipologie di impianti (addetti al caricamento ed alla pulizia dei piazzali ed addetti alla manutenzione) suddivisi per biomassa; rifiuti (FORSU), acque reflue (WWTP) ed i sottoprodotti del settore agro zootecnico.

Matrice	Parametro	Entrata – *In*	Valore	Uscita – *Out*	Valore
FORSU	**IGCM**	**33.370**	**6**	**2.420**	**2**
	Microrganismi patogeni	**14**		**5**	
WWTP	**IGCM**	**2940**	**2**	**491**	**0,5**
	Microrganismi patogeni	**4**		**0**	
AGROZOOTECNICO	**IGCM**	**18.670**	**4**	**12.986**	**4**
	Microrganismi patogeni	**4**		**5**	

Tabella 11 - Classificazione dei valori mediati indice di contaminazione totale e numero di agenti biologici patogeni

Nella tabella 12 che segue sono stati comparati i coefficienti utilizzati per il calcolo del fattore di probabilità ***(P)*** suddivisi per le principali attività svolte dal personale impiegato nelle tre tipologie di impianti. Inoltre è stato calcolato il fattore ***(P)*** tenuto conto del coefficiente ***C*** e $F_{tot.}$ (Tabella 14).

	FORSU		**WWTP**		**AGRO ZOOTECNICO**	
Fattore	A*	B**	A*	B**	A*	B**
F1	1	1	0	0	0.5	0.5
F2	1	0.5	1	0.5	1	0.5
F3	0	0	0.5	0.5	1	1
F4	1	1	1	1	0.5	0.5
F5	1	1	0	0	0.5	0.5
F6 (v. tabella 13)	1	1	1	1	1	1
F7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
F8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
F9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
F_{tot}	0.75	0.70	0.60	0.55	0.70	0.65

Tabella 12 - Sommatoria del coefficiente F suddiviso per mansione
*** addetti al caricamento e alla pulizia piazzali ; ** addetti alla manutenzione**

Caratteristica strutturale/impiantistica	presenti
presenza di pavimenti e pareti lisce e lavabili	No
adeguato ricambio d'aria naturale o artificiale, presenza di biofiltri o sistemi per abbattimento degli odori	Sì
illuminazione adeguata	Sì
presenza di spogliatoi e armadietti con compartimenti separati	Sì
presenza di tutte le attrezzature necessarie sul luogo di lavoro	Sì
assenza di vettori	No
assenza di zona ad elevata umidità	No
assenza di formazione di aerosol connesso con l'attività principale	No
assenza di zone non controllate (ambiente naturale)	No (solo aziende agrozootecniche)
% caratteristiche presenti	**<66%**

Tabella 13 - Coefficiente F6, caratteristiche strutturali

	FORSU				WWTP				AGROZOOTECNICO			
F_{tot}	A*		B**		A		B		A		B	
	0.75		0.70		0.60		0.55		0.70		0.65	
C	*In*	*Out*	*In*	*Out*	*In*	*Out*	*In*	*Out*	*In*	*Out*	*In*	*Out*
	6	2	6	2	2	0.5	2	0.5	4	4	4	4
P = C x Ftot	4.5	1.5	4.2	1,4	1.2	0.3	1.1	0.27	2.8	2.8	2.6	2.6

Tabella 14 - Calcolo del fattore (*P*) tenuto conto delle mansioni prese in esame
*** addetti al caricamento e alla pulizia piazzali ** addetti alla manutenzione**

I microrganismi patogeni e patogeni opportunisti identificati a livello di specie sono non classificati o sono classificati nel gruppo 2 del D.Lgs. 81/08, allegato XLVI. Tutti i patogeni e patogeni opportunisti identificati nello studio sono stati contati (tabella 11). Il valore 2 è stato utilizzato come riferimento per il valore di danno (***D***) (tabella 9) ed è stato utilizzato per il calcolo del livello di rischio. Si precisa che 1) nel presente lavoro non sono stati identificati microrganismi di classe 3, 2) non è stata effettuata la caratterizzazione della contaminazione fungina né una analisi esaustiva sulla contaminazione virale presente.

Ai fini cautelativi per il calcolo del coefficiente di rischio (Tabella 15), rispetto al parametro ***In*** e ***Out*** si è tenuto conto del fattore ***(P)*** più alto nelle due mansioni.

Tutti i valori si collocano in un livello di rischio **medio** dove sono previste l'adozione di norme igieniche generali e delle misure specifiche di prevenzione e protezione. Nella matrice FORSU in entrata ***(In)*** per entrambe le mansioni di addetto al *"caricamento e alla pulizia piazzali*" e *"alla manutenzione"* il coefficiente di rischio si colloca ad un livello **alto** dove sono previste misure specifiche di prevenzione e protezione da programmare con urgenza.

	FORSU		**WWTP**		**AGRO ZOOTECNICO**	
Mansione	A*	B**	A*	B**	A*	B**
P	4.5	4.2	1.2	1.1	2.8	2.6
D	2	2	2	2	2	2
R = P x D	9.0	8.4	2.4	2.2	5.6	5.2

Tabella 15 - Calcolo finale del rischio
*** addetti al caricamento e alla pulizia piazzali ** addetti alla manutenzione**

3.2 Gestione del rischio biologico Dall'esame dei dati elaborati, a fini didattici, è stata creata una tabella cromatica (Tabella 16) che tiene conto dei pericoli presi in considerazione nello studio condotto, per valutare il rischio ed esattamente il particolato, le endotossine e gli agenti microbiologici.

Per ogni parametro analizzato è stato fissato un *range* a cui è stato fatto corrispondere il livello di contaminazione osservato e un colore differente per valutare in modo intuitivo il potenziale rischio biologico nelle diverse realtà lavorative prese in esame, in assenza di contenimento specifico.

Colore	**Livello di rischio**	**Valore numerico**		
		Particolato PM 10 (μg/m^3)	Endotossine (EU/m^3)	Rischio infettivo
	Molto basso	**< 20**	**< 10**	**0,5 < R ≤ 1**
	Basso	**20 ÷ 50**	**10 ÷ 20**	**1 < R ≤ 2**
	intermedio	**50 ÷ 200**	**20 ÷ 50**	**2 < R ≤ 8**
	Alto	**200 ÷ 500**	**50 ÷ 90**	**8 < R ≤ 10**
	Molto Alto	**> 500**	**> 90**	**10 < R ≤ 16**

Tabella 16 - Livello di rischio in relazione alle concentrazioni rilevate per i tre parametri analizzati

Dopo aver fissato il parametro da osservare sono stati presi in esame i punti di campionamento all'entrata e all'uscita della biomassa nelle tre matrici principali (valore medio), per la matrice zootecnica è stato usato il valore della contaminazione presuntiva ***(C)*** ed è stata costruita la sottostante tabella cromatica (Tabella 17).

PARAMETRO	FORSU		WWTP		AGRO ZOOTECNICO	
	ENTRATA	USCITA	ENTRATA	USCITA	ENTRATA	USCITA
PM10	256,75	155,76	58,57	97,80	73,06	65,04
Endotossine (solo nella frazione inalabile)	121,45	5,12	2,23	13,71	3,26	2,46
Concentrazione presuntiva C	9.0	8.4	2.4	2.2	5.6	5.2

Tabella 17 - Valutazione predittiva del rischio biologico formulata a seguito del progetto

La valutazione del rischio proposta nella tabella ci porta ad evidenziare una sottostima del rischio microbiologico nelle attività agro zootecnico ed in tutta la filiera del rifiuto FORSU.
Sulla base della tabella proposta (Tabella 16) è possibile individuare misure igieniche di prevenzione e protezione degli operatori impiegati nei processi di digestione anaerobica di biomasse, con riferimento al Decreto Legislativo 81 del 2008[14]. La protezione da agenti biologici è trattata al Titolo X e, nello specifico, tra gli obblighi del datore di lavoro l'articolo 271 prende in esame la valutazione del rischio biologico, inserita all'interno del documento di valutazione dei rischi (DVR) e che deve includere: le caratteristiche e la classificazione degli agenti biologici che presentano o possono presentare un pericolo per la salute umana (Allegato XLVI), la attuale conoscenza sulle malattie che possono essere contratte e sui potenziali effetti allergici e tossici, la descrizione delle fasi che caratterizzano il procedimento lavorativo, caratterizzate da un rischio di esposizione ad agenti biologici, il numero di lavoratori addetti alle diverse fasi individuate, i metodi e le procedure lavorative adottate, le misure preventive e protettive applicate e il programma di emergenza.
All'articolo 272 sono descritte le misure tecniche, organizzative e procedurali che devono essere messe in atto, tra le quali figurano: la limitazione al minimo del numero di lavoratori esposti o potenzialmente esposti, l'adozione di misure di protezione collettive individuali,

l'apposizione del segnale di rischio biologico, l'elaborazione di idonee procedure per prelevare, manipolare e trattare biomasse, la definizione di procedure di emergenza.
All'articolo 273 sono descritte le misure igieniche che prevedono: la presenza di servizi sanitari adeguati (provvisti di docce, lavaggi oculari e rubinetti con pedane e fotocellula elettrica), la dotazione di indumenti protettivi (da riporre in armadietti a doppio scomparto) e di dispositivi di protezione individuale, il divieto di assumere cibi e bevande, fumare in tutte le aree di lavoro, in cui sia presente un rischio di esposizione.
L'informazione e la formazione dei lavoratori devono avvenire prima che essi siano adibiti alle attività in questione e ripetute con frequenza almeno quinquennale.
E' necessario predisporre nelle aree di lavoro, dispositivi di protezione collettiva (DPC) che, nel caso specifico, comprendono gli impianti di aerazione provvisti di filtri HEPA; i dispositivi di protezione individuale (DPI) di cui devono essere dotati tutti i lavoratori, possono essere di I, II e III categoria ed includono dispositivi di protezione del viso (occhiali e maschera facciale filtrante con pittogramma di rischio biologico e filtri FFP3, dispositivi di protezione delle mani (guanti) e dispositivi di protezione del corpo (tuta, calzari). Nell'introdurre misure di prevenzione e protezione dei lavoratori, si deve tenere conto della priorità delle misure collettive rispetto a quelle individuali.
Al capo III del Titolo X del Decreto legislativo 81/2008 vengono esplicitate le modalità di svolgimento della sorveglianza sanitaria per i lavoratori esposti a rischio biologico: essa è affidata al medico competente, responsabile nel conferire le idoneità dei singoli operatori a svolgere le proprie mansioni[14]. Al medico competente sono demandati i compiti di informare i lavoratori circa il controllo sanitario cui sono sottoposti e la necessità di sottoporsi ad accertamenti sanitari anche dopo la cessazione dell'attività che comporta rischio di esposizione a particolari agenti biologici. La vaccinazione degli operatori deve essere presa in considerazione sulla base della frequenza con cui si viene a contatto con l'agente biologico, dell'incidenza di contagio, della gravità della malattia, del numero di lavoratori che possono venirne a contatto, della sicurezza ed dell'efficacia del vaccino.
Sulla base di quanto previsto dal Decreto Legislativo 81/08, sono state individuate misure di prevenzione e protezione specifiche per gli impianti che effettuano digestione anaerobica con particolare attenzione alle aree di ingresso (aree di ricezione e carico delle biomasse) e alle aree di uscita (gestione del digestato).
Per quanto concerne le aree di entrata, la zona adibita allo stoccaggio e al carico delle biomasse è stata scelta come oggetto di campionamento, in quanto maggiormente interessata da un rischio biologico; le misure proposte per la gestione del rischio sono:

- minimo tempo di stazionamento degli operatori nelle aree a rischio;
- impiego di automezzi provvisti di cabina con sistema di filtrazione dell'aria specifico per il rischio biologico o, in alternativa, dotazione di mascherine facciali con filtro (FFP3) per il personale operante sui mezzi;
- pulizia dei mezzi ad umido e lavaggio in uscita dall'area di ricezione e carico delle ruote;
- dotazione di DPI per gli operatori che accedono all'area, comprendenti maschera facciale filtrante, guanti, tuta, calzari;
- trasporto delle biomasse in ingresso in contenitori impermeabili e chiusi;
- dotazione di strutture chiuse per i pre-trattamenti a carico delle biomasse.

Alle strutture di stoccaggio devono essere adeguate le seguenti misure: collocazione in locali chiusi, copertura con teli, sistemi di aspirazione in prossimità della struttura stessa (garantendo 2 ricambi/ora o 4 qualora sia previsto l'ingresso di personale addetto), pavimentazione idonea, pulizia, recupero di eventuali sversamenti/reflui per evitare imbrattamenti, utilizzo di mezzi o sistemi automatici per il rivoltamento delle biomasse. Le strutture di stoccaggio, quali trincee, sili o vasche devono essere diversificate a seconda della tipologia di biomassa e avere dimensioni che possano contenere una quantità di biomassa di 2-5 giorni. Le biomasse devono essere stoccate in strutture diverse a seconda della tipologia di biomassa, inoltre, non devono sostare per più di 15 giorni e le altezze dei cumuli non devono superare l'altezza delle pareti della vasca di stoccaggio, per evitare sversamenti.

Per quanto riguarda le aree di uscita, invece, la zona maggiormente interessata da un rischio biologico è quella relativa allo stoccaggio del digestato in uscita; esso deve essere predisposto in ambienti chiusi ed in depressione provvisti di sistemi di aspirazione e trattamento dell'aria provvisti di filtri. La porzione solida del digestato deve essere incorporata nel terreno entro 24 ore, mentre quella liquida può essere gestita con iniezione diretta nel suolo o attraverso spandimento superficiale a bassa pressione, con interramento entro 24 ore.

Gli scarichi derivanti dal processo lavorativo dovrebbero avvenire su superfici impermeabilizzate, dotate di sistemi di drenaggio e di raccolta delle acque reflue di processo, da inviare a depurazione o da riutilizzare nel ciclo di compostaggio; nello specifico, nel caso delle acque meteoriche di dilavamento dei piazzali, esse devono essere convogliate ad un sistema di trattamento o raccolta ed essere recuperate per il

rinvio al processo di digestione, nel caso di acque reflue domestiche, invece, esse devono essere trattate mediante sistemi di depurazione.

Tutti i materiali classificabili come rifiuti devono essere posti in depositi temporanei provvisti di contenitori chiusi; nel caso di liquidi, essi devono essere inseriti in contenitori provvisti di un bacino di contenimento per evitare fenomeni di sversamento.

Ulteriori misure applicabili per il contenimento del rischio biologico prevedono l'automatizzazione degli impianti e la compartimentazione degli ambienti lavorativi, al fine di ridurre al minimo le possibili contaminazioni tra ambienti; l'utilizzo di impianti di aspirazione con filtri HEPA, da installarsi nelle aree *indoor* soggette a rischio biologico, in quanto dispositivi di protezione collettiva (DPC) e da sottoporre a periodiche operazioni di manutenzione degli impianti. Per la pulizia delle superfici, relative ai locali indoor, è necessario procedere all'eliminazione dei vettori, attraverso l'impiego di insetticidi, acaricidi, rodenticidi e metodi di lotta biologica, devono, inoltre, essere condotte campagne di disinfezione e disinfestazione. La manutenzione e la pulizia degli attrezzi deve essere effettuata ad umido.

In aggiunta alle misure generali precedentemente identificate, da declinare nelle varie realtà produttive, si riportano, in Tabella 18, alcuni ulteriori accorgimenti applicabili e specifici per tipologia di azienda.

Misure specifiche applicabili	Tipologia di azienda
Confinamento della biomassa in locali o sistemi chiusi	FORSU, WWTP
Pastorizzazione a 70°C della frazione organica della biomassa	FORSU
Durante il pre-trattamento: utilizzo di macchinari con paratie ed aspiratori applicati sulle vasche	FORSU
Copertura con paratie e teli della biomassa stoccata e della tramoggia di carico	Agrozootecnico
Utilizzo di setti paraspruzzi ai terminali delle tubazioni o di tubazioni sommerse e protette	WWTP

Tabella 18 - Misure specifiche proposte per la gestione del rischio

4 CONCLUSIONI

Il documento di indirizzo proposto si configura come uno strumento di supporto nella valutazione del rischio biologico per gli addetti operanti negli impianti di digestione

anaerobica e comprendere la realtà lavorativa legata agli emergenti settori del comparto verde.

Le indicazioni relative alla gestione del rischio occupazionale da agenti biologici, hanno permesso di elaborare una tabella di comparazione tra una situazione di gestione ideale e la realtà riscontrata a livello delle aziende prese in considerazione nel presente progetto (Tabella 19).

Situazione ideale	Situazione reale
Minimo numero di lavoratori esposti	Sì
Misure di protezione collettive e individuali	Sì
Misure igieniche (servizi sanitari, docce, spogliatoi, armadietti a doppio scomparto)	Sì
Segnale di rischio biologico	Sì
Procedura di corretta manipolazione delle biomasse	Sì
Procedure di emergenza	Sì
Informazione e formazione dei lavoratori	Sì
Sorveglianza sanitaria per i lavoratori	Sì (periodicità eterogenea a discrezione del medico competente)
Minimo tempo di stazionamento operatori nelle aree a rischio	Non uniformemente rispettato
Impianti di aerazione con filtri HEPA	Non uniformemente adottato
Manutenzione impianti e pulizia attrezzi ad umido	Non sempre adeguato
Idoneo ricambio di aria nei locali	Sì
DPI (tuta, guanti, calzari, maschere facciali FFP3,occhiali)	Utilizzo non sempre idoneo
Compartimentazione ambienti lavorativi	Sì
Stoccaggio in vasche coperte e senza sversamenti	No
Minimo tempo di stazionamento biomasse e digestato	Non sempre adeguato
Pavimentazione facilmente lavabile	No
Sistemi automatici rivoltamento biomasse	No
Disinfezione	No
Pulizie e disinfestazioni periodiche	Sì
Automatizzazione impianti e processi lavorativi	Sì
Paratie antivento e sistemi antipolvere	No
Cabina automezzi con impianto di filtrazione	Sì

Tabella 19 - Comparazione dei principali fattori che differiscono tra una situazione gestionale ideale e reale

Dalla tabella 19 è possibile desumere che non tutte le misure suggerite possano essere adottate in egual modo da tutte le aziende, in ragione della tipologia, della dimensione e della disponibilità economica dei diversi impianti. Nello specifico, le principali criticità,

riscontrate durante la presente indagine, relative all'aspetto strutturale dell'impianto, riguardano: un posizionamento non sempre adeguato degli impianti di aerazione, dal momento che essi risulterebbero essere poco efficienti, qualora venissero collocati ad una distanza non sufficientemente prossima alla fonte di pericolo; un utilizzo non sempre idoneo dei DPI, presumibilmente imputabile ad una ridotta percezione dell'entità del rischio biologico.

Una criticità legata, invece, all'organizzazione del lavoro stesso è rappresentata dall'esposizione a rischio biologico, per tutta la durata della giornata lavorativa, di alcuni operatori: una problematica che in alcune aziende è stata ovviata attraverso l'introduzione di un sistema di turnazione per garantire una diminuzione del tempo di stazionamento degli operatori nelle aree a rischio. E', tuttavia, opportuno sottolineare che tale soluzione sebbene diminuisca il tempo di esposizione per il singolo individuo, aumenta il numero di esposti da sottoporre a sorveglianza sanitaria.

In conclusione, la tabella 20 riassume i dati desunti dai campionamenti e dalle analisi effettuate e dalle misure di protezione e prevenzione individuate.

AREE DI LAVORO ESPOSTE AD AGENTI BIOLOGICI			
• entrata (ricezione e carico) • uscita (gestione del digestato)			
IDENTIFICAZIONE DELLE FONTI DI PERICOLO			
• biomasse in entrata • digestato in uscita • bioaerosol			
INDIVIDUAZIONE DELLEATTIVITA' CRITICHE			
• ricevimento, accettazione biomasse • fasi di stoccaggio temporaneo e movimentazione delle biomasse • pre-trattamento dei materiali • movimentazione del materiale in uscita dal digestore • manutenzione ordinaria e straordinaria			
IDENTIFICAZIONE DEGLIAGENTI BIOLOGICI POTENZIALMENTE PRESENTI secondo il piano di monitoraggio promosso nella fase conoscitiva del presente studio			
AGENTI BIOLOGICI (AB)	**GRUPPO(ALLE GATO XLVI D.Lgs81/08)**	**VIE DI ESPOSIZIONE**	**PRINCIPALI POTENZIALI EFFETTI SULLA SALUTE**
Funghi/lieviti	2 e 3	Inalatoria, contatto	Patologie respiratorie, reazioni allergiche

Pseudomonaceae	2	Inalatoria, contatto	Infezioni polmonari, infezioni oculari, cutanee e dell'orecchio
Clostridia	2	Contatto, oro-fecale	Patologie gastrointestinali
Bacilli		Inalatoria, oro-fecale	Patologie gastrointestinali, infezioni
Gram negativi: (includono per esempio) - Salmonella/ Shigella	2 2	 Oro-fecale	Infezioni Infezioni sistemiche, shigellosi
Actinomiceti	2	Inalatoria, contatto	Infezioni polmonari
Stafilococchi	2	Inalatoria,oro-fecale	Patologie gastrointestinali
Enterococchi	2	Oro-fecale	Infezioni a organi vitali, patologie gastrointestinali
Streptococchi	2	Inalatoria	Infezioni a organi vitali
Virus	2	Inalatoria,oro-fecale	Patologie respiratorie, patologie gastrointestinali
IDENTIFICAZIONE DEGLIAGENTI BIOLOGICI POTENZIALMENTE PRESENTI NON TRASCURABILI			
AGENTI BIOLOGICI (AB)	**GRUPPO (ALLEGATO XLVI D.Lgs 81/08)**	**VIE DI ESPOSIZIONE**	**POTENZIALI EFFETTI SULLA SALUTE**
Influenza virus	2	Inalatoria e contatto	Influenza
Brucella spp.	3	Inalatoria, ingestione e contatto	Brucellosi
Campylobacter spp.	2	Inalatoria, ingestione e contatto	Infezioni
Mycobacterium bovis	2	Inalatoria	Tubercolosi

Coxiella burnettii	3	Inalatoria	Febbre Q
Helicobacter pylori	2	Oro-fecale	Patologie gastrointestinali
Hepatitis virus (A,B,C,E)	3	Endovenosa, parenterale, sessuale e oro-fecale	Epatite

IDENTIFICAZIONE DEGLI ESPOSTI

Soggetti potenzialmente esposti e mansioni svolte	**Categorie sensibili**	**Frequenza esposizione**
Addetti all'attività di autotrasporto Addetti alle attività di gestione delle vasche di stoccaggio Addetti alla sala controllo Addetti a controllo/manutenzioni/riparazioni Addetti a pulizia/disinfestazioni/derattizzazioni	Donne in gravidanza Condizioni individuali di ipersuscettibilità	Costante o periodica

MONITORAGGIO AMBIENTALE

Nel caso di particolari situazioni di rischio dovute alla presenza di artropodi di interesse sanitario (insetti, zecche) o serbatoi (roditori e altri animali selvatici), coinvolti nella circolazione di agenti patogeni in una determinata area, può essere necessario attivare un piano di monitoraggio per il controllo e la valutazione dell'emergenza da attuare con la collaborazione di esperti del settore

MISURE DI PREVENZIONE E PROTEZIONE

- Informazione e formazione (anche sul rischi da punture di zecche e vespe)
- uso di indumenti protettivi e DPI (tute, pantaloni lunghi, guanti resistenti, scarpe e stivali, eventuali DPI per le vie respiratorie, viso, occhi)
- misure igieniche personali (es. lavaggio delle mani, docce, presenza di spogliatoi e armadietti a doppio scomparto)
- misure igieniche ambientali esterne e interne (es. corretto smaltimento dei reflui, bonifica di terreni, pulizia e disinfezione di locali, attrezzature, oggetti, ecc.)
- misure di emergenza in caso di punture di insetti imenotteri e sulla corretta rimozione delle zecche, se visibili
- limitazione dell'inalazione di polvere
- controllo dei vettori
- sorveglianza sanitaria: corretto protocollo sanitario, individuazione categorie sensibili, vaccinazioni (es. antitetanica)

ULTERIORI MISURE CAUTELATIVE

- sistemi rivoltamento biomasse
- paratie paravento macchinari

• minimo tempo di stazionamento operatori nelle aree a rischio • cabina con sistema di filtrazione aria • ricambi aria locali • compartimentazione ambienti lavorativi • biomasse coperte con teli e l'altezza dei cumuli non deve superare l'altezza delle vasche • tempo minimo di stoccaggio • pavimentazione idonea al lavaggio

Tabella 20 - Sintesi complessiva

Gli attuali metodi di valutazione del rischio biologico per i lavoratori del comparto *Green*, sono basati sull'individuazione di indicatori microbiologici e su scale qualitative, che non consentono di stabilire dei tempi di esposizione limite al di sotto dei quali considerare il rischio accettabile[43].

La metodologia quantitativa di valutazione del rischio biologico (*Quantitative Microbial Risk Assessment*, QMRA), già applicata all'acqua potabile e agli alimenti, potrebbe rivelarsi un utile strumento per valutare il rischio di esposizione a bioaerosol nei luoghi di lavoro, al fine di determinare livelli di rischio tollerabili ed individuare le adeguate misure di prevenzione e protezione.[44] Tale approccio si basa sul paradigma già consolidato nella valutazione del rischio chimico ed è una procedura adattata al rischio biologico composta di quattro fasi:[43]

1) identificazione dei pericoli, che consiste nell'individuare quali siano i microrganismi patogeni potenzialmente pericolosi in un'attività per i lavoratori;
2) valutazione della relazione dose-risposta, ossia la relazione fra la dose assunta da un lavoratore in un determinato tempo e la probabilità di infezione;
3) valutazione dell'esposizione, fase per la quale è necessario conoscere la concentrazione nell'ambiente del patogeno indice e il tasso d'inalazione per unità di tempo. Occorre considerare che una frazione dell'inalato viene ingerita[45] e può dare luogo a infezioni gastrointestinali mentre la restante viene respirata e può causare infezioni respiratorie;
4) caratterizzazione del rischio, fase in cui viene stimato il rischio come funzione dell'esposizione, in base alla curva dose-risposta. Il risultato è poi comparato con un valore di "rischio accettabile" per poter valutare la necessità di interventi di riduzione/eliminazione del rischio.

Carducci e collaboratori, in un lavoro del 2016[46] hanno adottato questa metodologia utilizzando come patogeno indice Human Adenovirus (HAdV), al fine di proporre uno

strumento innovativo per la valutazione dell'esposizione a virus aerodispersi nei luoghi di lavoro. Tale studio rappresenta uno dei primi tentativi sperimentali di stabilire un livello critico di esposizione a bioaerosol utilizzando il modello QMRA; infatti, per l'innovatività dell'approccio, deve essere considerato con prudenza.

Sulla base dei risultati ottenuti attraverso il campionamento della componente virale del bioaerosol, per avere un quadro più completo sarebbero necessarie ulteriori indagini quantitative con l'utilizzo di nuovi target virali o con l'utilizzo di *primer* generici che possano identificare famiglie di virus, come è già possibile fare con batteri e Archaea[47,48]. I virus appartenenti alla stessa famiglia potrebbero per esempio avere una stessa sequenza funzionale, ma ad oggi gli unici *primer* generici disponibili identificano la specie e/o i genotipi, come per il virus dell'epatite B[49] e il virus dell'influenza A[38]. Un ulteriore approfondimento dello studio virale da bioaerosol è rappresentato dalla metagenomica, il sequenziamento del DNA virale e grazie alle nuove tecniche di sequenziamento ad alta risoluzione è possibile applicarla anche al DNA a singolo filamento e all'RNA virale[49]. Nonostante l'elevata risoluzione delle moderne piattaforme, queste presentano alcuni svantaggi: costo elevato, sequenze ottenute corte, eccessiva mole di dati per sequenziamento e conoscenze bioinformatiche per l'analisi dei dati. Esistono alcune criticità della metagenomica[50], che ne hanno limitato la sua applicazione a campioni ambientali, quali il bioaerosol:

- La necessità di sufficienti quantità di DNA/RNA (1 ng/µl) che sono difficili da ottenere dai campionamenti di bioaerosol;
- Campionamenti poco efficienti per l'estrazione di acidi nucleici virali dall'aria;
- Approcci e metodiche non standardizzate;
- Ricostruzione del genoma "de novo" che richiede competenze bioinformatiche approfondite.

Lo studio del bioaerosol ambientale rappresenta un campo della ricerca in rapida evoluzione che, attraverso l'applicazione delle tecniche innovative sviluppate negli ultimi anni, potrà divenire un ottimo strumento per il monitoraggio ambientale e per la salvaguardia della salute dei lavoratori e dei cittadini. A tal proposito, sarebbe necessario approfondire i rischi esistenti, ad oggi considerati marginali, anche perché poco conosciuti, non solo in ambito occupazionale, come precedentemente trattato, ma anche per le popolazioni che abitano le zone limitrofe agli impianti.

5 BIBLIOGRAFIA

1. IRENA. *REthinking Energy*. *REthinking Energy 2017: Accelerating the global energy transformation* 55, (2017).

2. GSE. *Energia da fonti rinnovabili in Italia*. (2014).

3. INAIL. *Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile*. (2014).

4. UNEP. *Green Jobs : Towards decent work in a sustainable, low-carbon world*. (2009).

5. Commissione europea. *Europa 2020: Una strategia per una crescita intelligente, sostenibile e inclusiva*. (2010).

6. Aisec. Economia circolare. Available at: http://www.aisec-economiacircolare.org/che-cos-e/.

7. Pauli, G. Blue Economy.

8. Díaz, I., Pérez, S. I. & Ferrero, E. M. Bioresource Technology Effect of oxygen dosing point and mixing on the microaerobic removal of hydrogen sulphide in sludge digesters. 102, 3768–3775 (2011).

9. Itabia e CRPA. *Impianti a biocombustibili gassosi per la produzione di energia elettrica*.

10. Piccinini, S., Bonazzi, G., Fabbri, C., Sassi, D., Schitt, M. C., Soldano, M., Verzellesi, F. *Energia dal biogas*. *Associazione Italiana Energie Agroforestali* (2008).

11. Dipartimento di sanità pubblica di Bologna e Imola e Arpa Sezione provinciale di Bologna. Progetto biogas: Protocollo operativo di vigilanza e controllo sugli impianti a biogas alimentati a biomasse della Provincia di Bologna.

12. Ministero dello Sviluppo Economico. Decreto ministeriale 5 dicembre 2013: Modalita' di incentivazione del biometano immesso nella rete del gas naturale. 1–20 (2013).

13. APAT. *Manuali e Linee Guida 13/2005 - Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi*. (2005).

14. D.lgs. 9 aprile 2008, n. 81. (2008).

15. WHO. Air quality guidelines. Global update 2005. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 3, 23–23 (2006).

16. ACGIH. TLVs and BEIs, Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. *Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists;* (2006).

17. C. Dacarro, E. Grignani, L. Lodola, P. G. and D. C. Proposed microbiological indexes for the assessment of air quality in buildings. *G Ital Med Lav Ergon 22* 229–235 (2000).

18. INAIL. *Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro Campionamento e analisi*. (2010).

19. Traversi, D. *et al.* Green job bio-aerosol exposure during anaerobic digestion for biomass energetic valorisation. *Environ. Res.* 138, 425–431 (2015).

20. UNI EN 13098:2002. (2002).

21. Fracchia S1, Aranda A, Gopar A, Silvani V, Fernandez L, G. A. Mycorrhizal status of plant species in the Chaco Serrano Woodland from central Argentina. *Mycorrihiza* 19(3):205-14 (2009).

22. U.S Environmental Protection AgencyNational Center for Environmental Assessment, Washington DC, I. O. & Moya, J. Exposure Factors Handbook. 21–23 (2011).

23. Ziros, P. G., Kokkinos, P. A., Legaki, E. & Vantarakis, A. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis. *Virol. J.* 8, 369 (2011).

24. ACGIH. Valori limite di soglia Indici biologici di esposizione. (2014).

25. *Decreto Legislativo 13 agosto 2010, n. 155 Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa.* 1, (2010).

26. M. Krzyzanowski and A. Cohen. Update of WHO air quality guideline. *Air Qual Atmos Health,* 1:7-13 (2008).

27. DECOS. Endotoxins-health-based recommended occupational exposure limit. *The Hague* (2010).

28. Tolvanen, O. K. & Hänninen, K. I. Mechanical-biological waste treatment and the associated occupational hygiene in Finland. *Waste Manag.* 26, 1119–1125 (2006).

29. Viau, E., Levi-Schaffer, F. & Peccia, J. Respiratory Toxicity and Inflammatory Response in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Biosolids, Animal Manure, and Agricultural Soil Particulate Matter. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3142–3148 (2010).

30. Haagsma, J. A., Tariq, L., Heederik, D. J. & Havelaar, A. H. Infectious disease risks associated with occupational exposure : a systematic review of the literature. 140–147 (2012). doi:10.1136/oemed-2011-100068

31. Bonadonna, L. *et al. Strategie di monitoraggio dell'inquinamento di origine biologica dell'aria in ambiente indoor*. (2013).

32. Douglas, P. *et al.* Respiratory hospital admission risk near large composting facilities. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 219, 372–379 (2016).

33. Rao, C. Y., Burge, H. a & Chang, J. C. Review of quantitative standards and guidelines for fungi in indoor air. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 46, 899–908 (1996).

34. Eduard, W. *139 Fungal spores. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risk from Chemicals*. *Arbete och Hälsa* 21, (2006).

35. Pearson, C. *et al.* Exposures and Health Outcomes in Relation to Bioaerosol Emissions From Composting Facilities: A Systematic Review of Occupational and Community Studies. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* 18, 43–69 (2015).

36. Couch, R. B., Knight, V., Douglas, R. G., Black, S. H. & Hamory, B. H. The minimal infectious dose of adenovirus type 4; the case for natural transmission by viral aerosol. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 80, 205–11 (1969).

37. Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700 (1993).

38. G. W. Nicol, Glover, A. L. and & Prosser, J. I. The impact of grassland management on archaeal\n community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* 5, 152–162 (2003).

39. Behzad, H., Gojobori, T. & Mineta, K. Challenges and opportunities of airborne metagenomics. *Genome Biol. Evol.* 7, 1216–1226 (2015).

40. Ansorge, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. *N. Biotechnol.* 25, 195–203 (2009).

41. ALLEGATO XLVI D.Lgs 81/2008 ELENCO DEGLI AGENTI BIOLOGICI CLASSIFICATI. (2008).

42. ARPA & INAIL. *Criteri ed indirizzi per la tutela della salute e sicurezza in tema di valutazione del Richio Biologico nelle attività istituzionali delle Agenzie per la Protezione dell'Ambiente*. (2013).

43. Annalaura Carducci, Gabriele Donzelli, M. V. A. *QMRA (Quantitative MicrobialRiskAssessment): un approccio innovativo per la valutazione e la gestione del rischio biologico occupazionale.* (2014).

44. Donzelli G, Verani M, Mastroeni G, Cioni L, C. A. Si. *Valutazione quantitativa del rischio biologico (QMRA) da bioaerosol in vari ambienti lavorativi.* (2015).

45. Paolo Stellacci, Lorenzo Liberti, Michele Notarnicola, C. N. H. Hygienic sustainability of site location of wastewater treatment plants. A case study. II. Estimating airborne biological hazard. *Desalination* 106–111 (2010).

46. Carducci A., Donzelli G., Cioni L., verani M. Quantitative microbial risk assesment in occupational settings applied to the airborne human adenovirus infection. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* (2016).

47. Masclaux, F. G., Hotz, P., Gashi, D., Savova-Bianchi, D. & Oppliger, A. Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. *Environ. Res.* 133, 260–265 (2014).

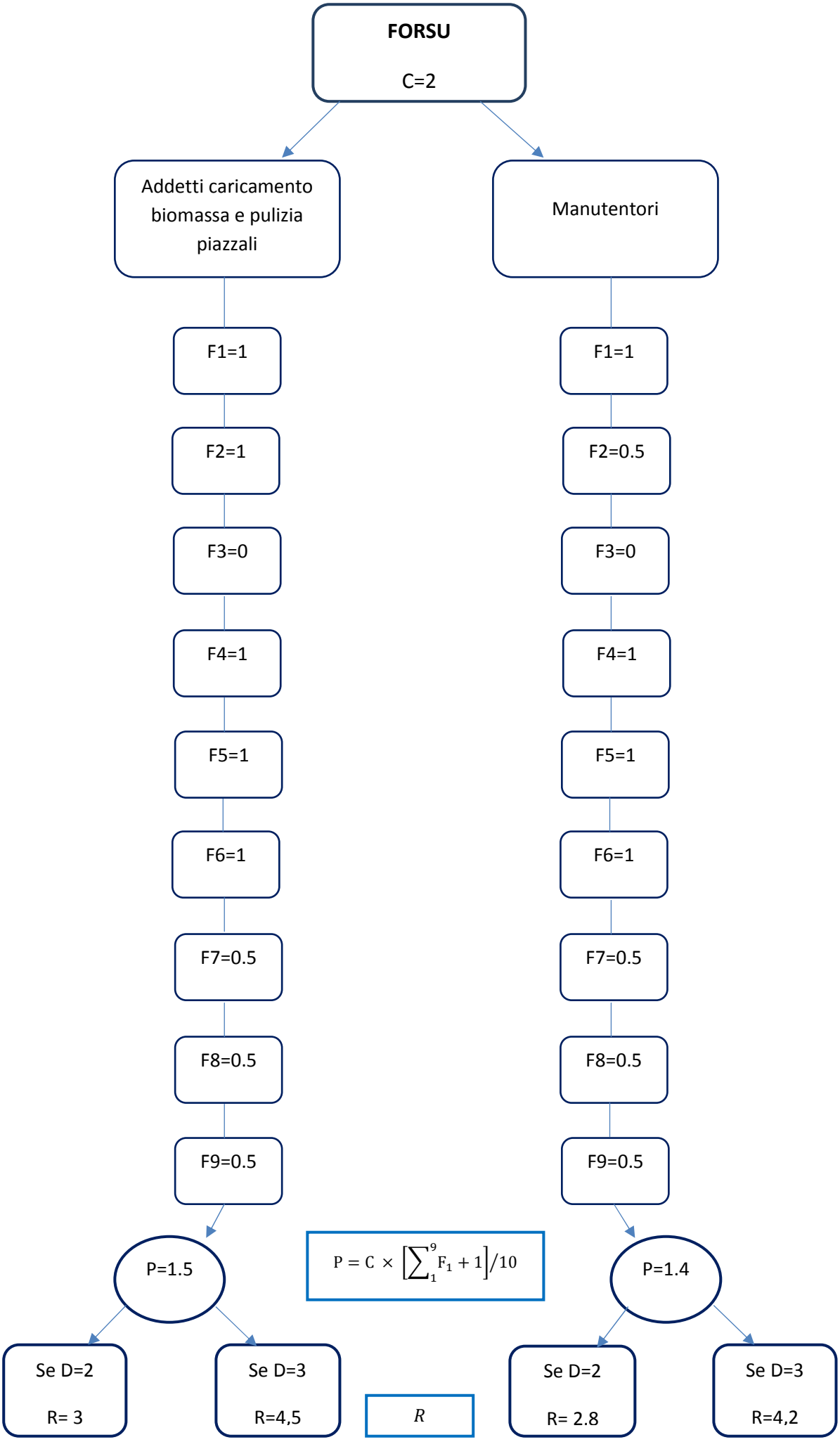
48. Uhrbrand, K., Schultz, A. C., Koivisto, A. J., Nielsen, U. & Madsen, A. M. Assessment of airborne bacteria and noroviruses in air emission from a new highly-advanced hospital wastewater treatment plant. *Water Res.* 112, 110–119 (2017).

49. Chook, J. B. *et al.* Universal primers for detection and sequencing of hepatitis B virus genomes across genotypes A to G. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1831–1835 (2015).

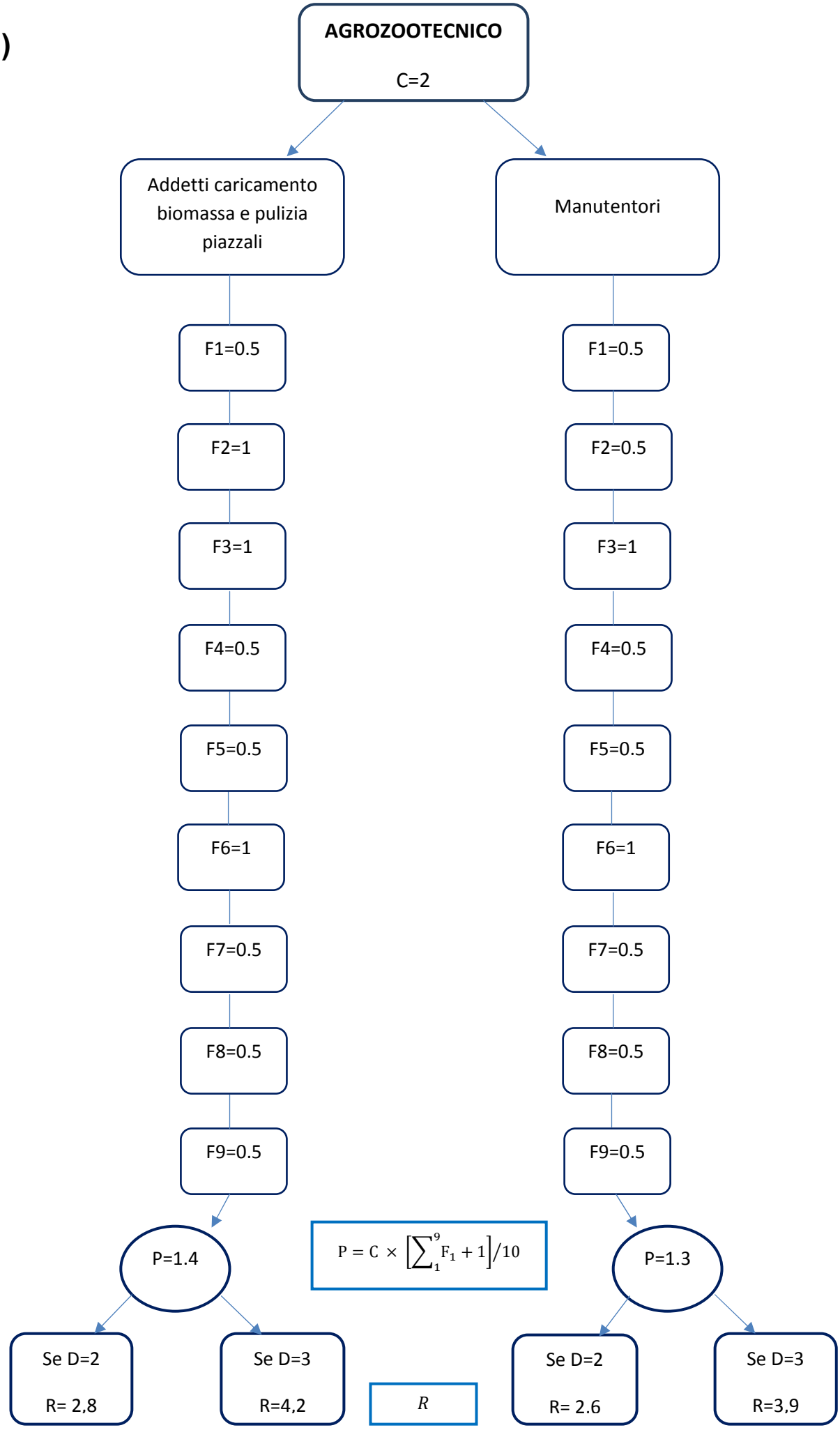
50. Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G. & Perez, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146, 2275–2289 (2001).

ALLEGATO A

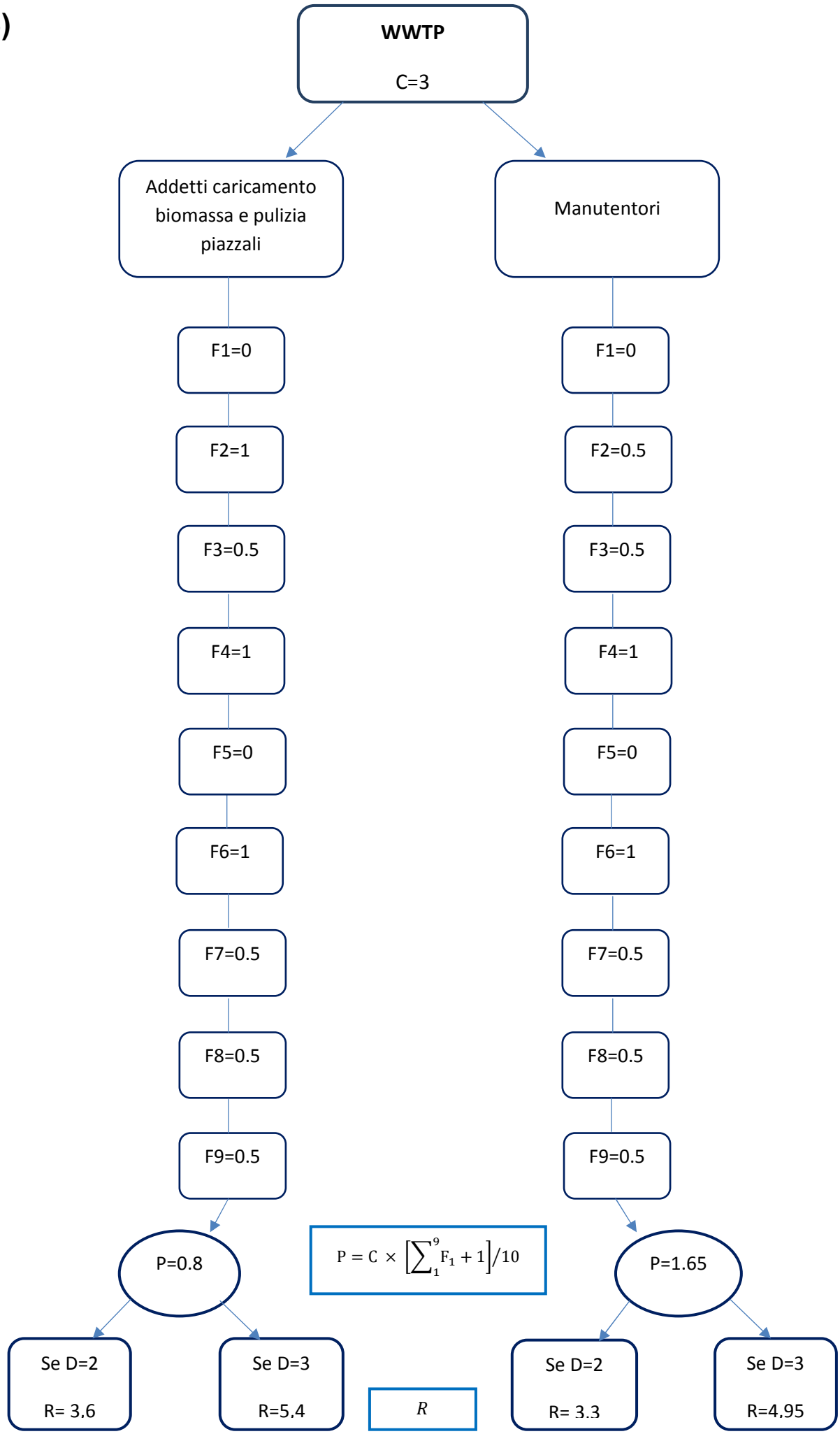
1)


FORSU
C=2
Addetti caricamento biomassa e pulizia piazzali
Manutentori
F1=1
F2=1
F3=0
F4=1
F5=1
F6=1
F7=0.5
F8=0.5
F9=0.5
F1=1
F2=0.5
F3=0
F4=1
F5=1
F6=1
F7=0.5
F8=0.5
F9=0.5
P=1.5
$P = C \times \left[\sum_{1}^{9} F_1 + 1\right]/10$
P=1.4
Se D=2
R= 3
Se D=3
R=4,5
R
Se D=2
R= 2.8
Se D=3
R=4,2

2)


AGROZOOTECNICO
C=2
Addetti caricamento biomassa e pulizia piazzali
Manutentori
F1=0.5
F2=1
F3=1
F4=0.5
F5=0.5
F6=1
F7=0.5
F8=0.5
F9=0.5
F1=0.5
F2=0.5
F3=1
F4=0.5
F5=0.5
F6=1
F7=0.5
F8=0.5
F9=0.5
P=1.4
P=1.3
$P = C \times \left[\sum_{1}^{9} F_1 + 1\right]/10$
Se D=2
R= 2,8
Se D=3
R=4,2
R
Se D=2
R= 2.6
Se D=3
R=3,9

3)



$$P = C \times \left[\sum_{1}^{9} F_1 + 1\right]/10$$

$$R$$